DOI:10.16016/j.1000-5404.201411057

论著

慢性牙周炎患者唾液中 miR-146a 的表达及临床意义

赵家珍[1,2],闫文娟[1],吴补领[1] (510515 广州,南方医科大学南方医院口腔科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院口腔科[2])

[摘要] **目的** 通过检测慢性牙周炎患者唾液中 miR-146a 的表达,以探讨 miR-146a 在慢性牙周炎发病中的作用及意义。**方法** 选取2012年1月至2013年8月期间第三军医大学西南医院口腔科收治的48例慢性牙周炎患者(其中男性28例,女性20例,平均年龄42岁)。同时选择20名性别、年龄匹配的健康志愿者作为对照组。采用实时荧光定量 PCR 技术检测上述人员唾液上清中 miR-146a 的表达水平。对治疗组患者(32例)进行牙周基础治疗,分别记录治疗前和治疗6周后患者的探诊深度(probing depth,PD)、临床附着丧失(attachment loss,AL)及菌斑指数(plaque index,PLI),并检测治疗后唾液上清液标本中 miR-146a 的表达。**结果** 慢性牙周炎患者唾液上清液中 miR-146a 的表达水平(2.52±0.87)显著高于健康对照组(0.81±0.58)($P<0.01$)。治疗组患者经过治疗后的牙周临床指数、唾液中 miR-146a 表达水平均显著降低($P<0.05$)。唾液中 miR-146a 水平与 PD($r=0.574$, $P<0.05$)、AL($r=0.629$, $P<0.01$)及 PLI($r=0.758$, $P<0.01$)均呈正相关。**结论** 慢性牙周炎患者唾液上清中 miR-146a 表达水平明显高于正常人,并在牙周基础治疗后显著下降,提示唾液 miR-146 可作为牙周病防治及疗效评估的潜在靶分子。

[关键词] 慢性牙周炎;唾液;微小 RNA;miR-146a
[中图法分类号] R446.19; R781.42 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of saliva miR-146a in patients with chronic periodontitis

Zhao Jiazhen[1,2], Yan Wenjuan[1], Wu Buling[1] ([1]Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [2]Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of miR-146a in saliva of patients with chronic periodontitis and investigate its clinical value. **Methods** Forty-eight chronic periodontitis patients admitted in stomatology of Southwest Hospital from January 2012 to August 2013 were investigated (including 28 males and 20 females at a mean age of 42 years) and 20 age- and sex-matched healthy volunteers were enrolled as healthy controls. Real-time PCR was performed to detect the expression of saliva miR-146a in these subjects. Thirty-two patients with chronic periodontitis were treated with basic periodontal therapy for 6 weeks. Their probing depth (PD), attachment loss (AL) and plaque index (PLI) were recorded before and after treatment. **Results** The expression of saliva miR-146a were higher in chronic periodontitis patients than in the healthy controls (2.52±0.87 *vs* 0.81±0.58, $P<0.01$). After basic periodontal therapy, the MiR-146a expression and all periodontal indexes were reduced ($P<0.05$). Positive correlation was found between saliva miR-146a expression with periodontal PD ($r=0.574$, $P<0.05$), AL ($r=0.629$, $P<0.01$) and PLI ($r=0.758$, $P<0.01$). **Conclusion** MiR-146a expression is obviously stronger in saliva of patients with chronic

[通信作者] 吴补领, E-mail:bulingwu@smu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150121.1030.005.html(2015-01-21)

periodontitis than in healthy people, and significantly decreased after initial therapy, indicating that miR-146a may be considered as a potential target for prevention and treatment of chronic periodontitis.

[**Key words**] chronic periodontitis; saliva; microRNA; miR-146a

Corresponding author: Wu Buling, E-mail: bulingwu@smu.edu.cn

牙周炎是发生于牙周支持组织的炎症破坏性疾病。牙周炎的发病机制涉及多种因素,目前认为,宿主对菌斑细菌及其产物的过度免疫应答在牙周组织的破坏及疾病的慢性迁延中起重要作用[1]。近年来,微小RNA(microRNA,miRNA)被发现在许多疾病中异常表达,其在慢性炎症发病过程中的作用成为该领域的研究热点[2]。miRNA是一类高度保守的小分子非编码RNA,通过与靶基因mRNA互补配对,降解mRNA或抑制翻译,从而负性调节转录后基因表达。在已发现的众多与慢性炎症发病过程有关的miRNA中,miR-146a的作用尤为引人关注[3-5]。Xie等[6]采用基因芯片技术发现,慢性牙周炎患者牙龈组织中miR-146a表达上调,提示miR-146a可能参与了慢性牙周炎的发病过程。鉴于唾液是比较容易得到的样品,从唾液中寻找疾病生物标志物(biomarkers)一直以来是人们研究的热点[7]。本研究以miR-146a为切入点,比较慢性牙周炎患者及健康对照者唾液上清中miR-146a的表达水平,并比较牙周基础治疗前后唾液上清中miR-146a的变化,分析其与牙周临床指标的相关性,探讨唾液miR-146a在牙周炎中的发病作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2012年1月至2013年8月于第三军医大学西南医院口腔科就诊的慢性牙周炎患者(牙周炎组)48例,其中男性28例,女性20例,平均年龄42岁。牙周炎组纳入标准:确诊为慢性牙周炎,诊断标准参照文献[8]。同时选择本院体检的健康志愿者20例作为健康对照组,包括男性12例,女性8例,平均年龄40岁。排除标准:①身体有其他局部炎症,如慢性扁桃体炎、慢性咽炎等;②3个月内使用过抗生素类药物、免疫抑制剂及其他影响白细胞的药物;③1年内有牙周炎药物及手术治疗史,或伴有其他口腔感染性疾病的原发病例;④女性在妊娠、哺乳及月经期;⑤接受过正畸治疗。

1.2 主要试剂

Trizol试剂(Invitrogen公司,美国);mirVana PARIS Kit(Ambion公司,美国);One Step PrimeSeripp miRNA cDNA Synthesis反转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);SYBR Premix *Ex Taq*™PCR反应试剂盒(TaKaRa公司,日本)。

1.3 口腔检查

全部受试者接受口腔检查,由同一位医师完成。用William牙周探针检查牙齿6个位点的探诊深度(periodontal probing depth, PD)、附着丧失(clinical attachment loss, AL)水平,采用Silness和Löe的方法测定菌斑指数(plaque index, PLI)。

1.4 牙周基础治疗及复查

治疗前对纳入分析的慢性牙周炎患者进行口腔卫生宣教及口腔卫生指导,然后治疗组患者行全口超声龈上洁治术、龈下刮治及根面平整术,嘱患者治疗结束6周后进行复诊。复诊时采集患者唾液上清,通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测唾液上清中miR-146a的表达,并检测PD、AL及PLI各项牙周临床指标。

1.5 miR-146a检测

1.5.1 唾液标本的采集及处理 清晨采集受试对象的唾液,采集前4 h受试者必须禁食、禁饮、不能漱口。用棉签蘸取2%的柠檬酸多次擦拭口腔,待唾液流出时,用2支无菌无RNA酶1.5 mL离心管(AXGEN公司)收集唾液,每只离心管收集大约1.5 mL唾液;将收集好的唾液4 ℃,3 000 r/min,离心15 min,收集唾液上清。将收集好的上清冻存于-80 ℃备用。

1.5.2 总RNA提取及纯化 采用Ambion公司mirVana PARIS Kit提取和纯化唾液上清中的总RNA,提取步骤参照试剂盒说明书进行。Bio-Rad公司Smartspec plus分光光度仪检测总RNA浓度和质量,检测合格后将RNA于-80 ℃冻存待用。

1.5.3 miRNA反转录 采用TaKaRa公司One Step PrimeSeripp miRNA cDNA Synthesis反转录酶试剂盒对提取的总RNA中的miRNA反转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。反转录产物于-80 ℃冻存待用。

1.5.4 RT-qPCR检测 在ABI StepOne Plus实时定量PCR仪上按照SYBR Premix *Ex Taq*™ PCR反应试剂盒(TaKaRa公司)进行RT-qPCR检测。以miR-16为内参[9],反应总体积为20 μL:SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ 10 μL,ROX Reference Dye Ⅱ 0.5 μL,cDNA模板2 μL,miR-146a或miR-16上下游引物各0.5 μL,

RNase Free dH_2O 6.5 μL。PCR反应条件:95 ℃ 15 min预变性,95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,反应40个循环。每个标本做3个复孔。计算各标本平均循环阈值(cycle threshold,Ct),将miR-146a的Ct值减去miR-16 Ct值作为△Ct值。采用相对定量法对RT-qPCR结果进行分析,计算标准化后的$2^{-\triangle Ct}$值表示miR-146a的相对表达含量。

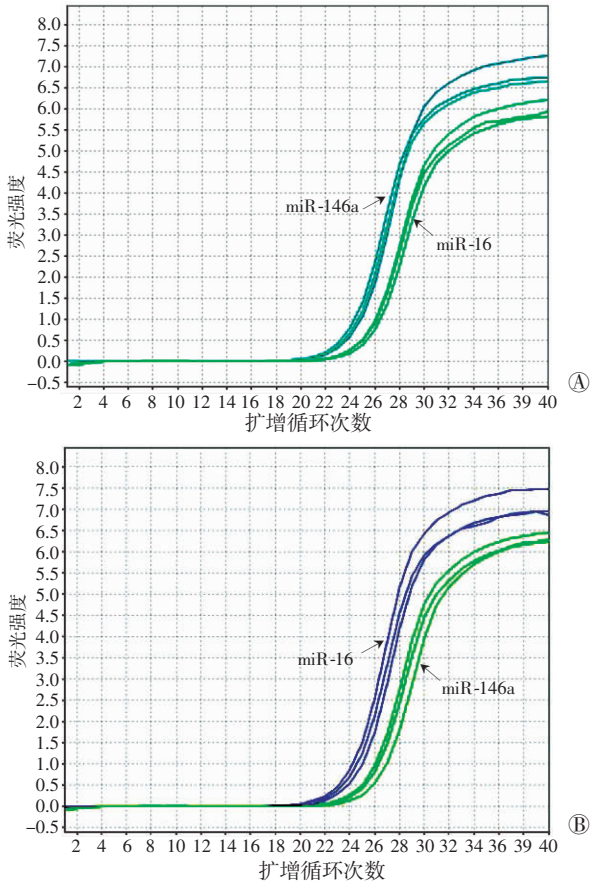
1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,组间比较行LSD-t检验,牙周基础治疗前后相关指标的检测行配对t检验,miR-146a表达水平与牙周临床指标的关系行Pearson相关系数分析。

2 结果

2.1 慢性牙周炎组与健康对照组唾液上清miR-146a表达水平的比较

RT-qPCR检测结果显示,慢性牙周炎组唾液上清中miR-146a表达水平(2.52 ±0.87)显著高于健康对照组[(0.81 ±0.58),P<0.01,图1]。

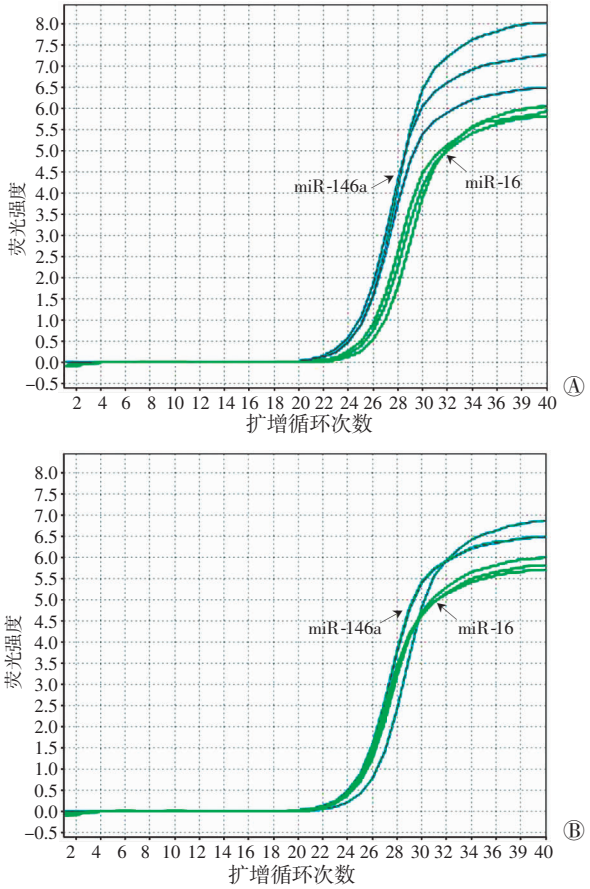


A:慢性牙周炎组;B:健康对照组

图1 慢性牙周炎组及健康对照组唾液上清中miR-146a的表达水平

2.2 慢性牙周炎患者牙周基础治疗前后唾液上清miR-146a表达水平变化

最终按要求完成牙周基础治疗后进行复诊的患者共32例。比较牙周炎患者治疗前后唾液中miR-146a表达水平,发现治疗后患者唾液上清miR-146a的水平(1.52 ±0.63)较治疗前(2.57 ±0.84)显著降低(P<0.05,图2)。



A:治疗前;B:治疗后

图2 慢性牙周炎患者牙周基础治疗前后唾液上清中miR-146a表达水平的变化

2.3 唾液上清miR-146a表达水平与牙周临床指标的比较

32例患者牙周基础治疗后6周,患者牙周状况均明显改善,菌斑指数(PLI)、探诊深度(PD)、附着丧失(AL)均显著降低,与治疗前相比,差异有统计学意义(P<0.01,表1)。相关性分析结果显示,牙周炎患者唾液中miR-146a的表达水平与PLI(r=0.758,P<0.01)、PD(r=0.574,P<0.05)及AL(r=0.629,P<0.01)均呈正相关。

表1 慢性牙周炎患者基础治疗前后各项牙周临床指标的比较($n=32$, $\bar{x}\pm s$)

时间	菌斑指数	探诊深度(mm)	附着丧失(mm)
治疗前	2.21±0.32	3.94±0.78	4.20±1.02
治疗后	1.38±0.26[a]	2.68±0.41[a]	3.18±0.55[a]

a:$P<0.01$,与治疗前比较

3 讨论

近年来,越来越多的研究者开始关注慢性牙周炎患者唾液中成分的变化,目前已经检测出唾液中多种成分在慢性牙周炎的发生及调控中起到了重要的作用,并且有可能成为慢性牙周炎诊断、治疗及预后疗效评价的重要指标[10]。研究表明,唾液 miRNA 能作为疾病诊断及进展监测的候选生物学标志物,包括口腔鳞癌、食道癌等[11]。目前,尚少见有关慢性牙周炎患者唾液 miRNA 的研究。为了进一步探讨 miRNA 在慢性牙周炎发生、发展中的作用和意义,本研究以 miR-146a 为切入点,应用 RT-qPCR 技术检测了慢性牙周炎患者唾液上清中 miR-146a 的表达情况,结果显示,慢性牙周炎患者唾液上清中 miR-146a 表达水平显著高于健康对照组。为了观察牙周基础治疗是否会影响慢性牙周炎患者唾液上清中 miR-146a 的表达,本研究对治疗组患者进行基础牙周治疗,治疗后 6 周随访观察其牙周临床指标变化并检测其唾液上清中 miR-146a 的表达,结果显示,经治疗后,患者唾液上清中 miR-146a 表达水平显著降低,并伴有牙周临床指标的明显改善,经直线相关分析结果显示,牙周组织损害程度与唾液上清中 miR-146a 含量呈正相关。

miRNA 是一种对基因表达调控发挥重要作用的非编码小 RNA,广泛参与了许多疾病的发病过程,如肿瘤、感染性疾病及自身免疫性疾病等。越来越多的研究发现,miRNA 在调节免疫功能、维持免疫系统稳定方面发挥着重要作用,miRNA 的异常表达可能与慢性炎症发病过程密切相关。而在与慢性炎症有关的 miRNA 分子中,研究人员证实,miR-146a 在慢性炎症发生和发展过程中发挥重要作用。如 Wang 等[12]发现慢性乙肝患者 T 细胞中 miR-146a 水平在病毒抗原作用下明显上调,且 miR-146a 上调可以显著抑制 T 细胞抗病毒功能。

由于唾液腺血运丰富,唾液常被认为是血循环的末端产物。近年来有研究证实,组织、血浆和唾液三者具有相似的 miRNA 表达谱,检测这些体液中 miRNA 同样能获得疾病的发生、发展和预后预测的相关分子信息[13]。血液中 miRNA 在疾病发生和发展过程中的作用已被大量的研究证实,而随着生物技术的不断发展,唾液 miRNA 研究亦备受关注。Patel 等[14]研究发现,唾液中 miRNA 的表达量在同一机体内不会随时间而改变,且不会轻易降解,即唾液 miRNA 表达量相对恒定。Park 等[15]利用 RT-qPCR 技术检测了 50 例口腔鳞癌患者及 50 例健康对照人群唾液上清中 miRNA 的表达,发现 miR-125a 和 miR-200a 在口腔鳞癌患者唾液上清中均显著下调,指出其有望成为诊断口腔癌的标志物。

通过对唾液 miR-146a 的检测,并分析牙周基础治疗前后 miR-146a 表达的变化,结果提示,miR-146a 可能在慢性牙周炎的发病机制中发挥一定作用,患者唾液上清中 miR-146a 表达水平的变化可能与患者牙周基础治疗的临床转归存在关系。这提示我们可以把唾液上清中 miR-146a 的表达作为反映牙周炎症发展状况及治疗效果评估的一个潜在生物指标,对于病程监测及预后评估具有一定的参考意义。但本项研究的例数较少,随访时间仅 6 周,将来有必要扩大样本并延长随访时间作进一步研究和证实。

miR-146a 是天然免疫和获得性免疫的重要调控因子。在固有免疫中,研究者发现,miR-146a 可靶向抑制肿瘤坏死因子受体相关因子 6 和白细胞介素-1 受体相关激酶-1,从而负向调控固有免疫反应的强弱[16]。在适应性免疫中,Lu 等[17]研究发现 miR-146a 可下调 Th1 细胞分化必需的关键转录因子信号传导与转录激活子 1 的表达,从而抑制慢性炎症反应;但也有研究者证实,在类风湿性关节炎患者体内过表达的 miR-146a 不能有效抑制 Th1 细胞分化,进而使患者体内肿瘤坏死因子、白介素-6 等炎症因子产生增多,导致了类风湿性关节炎的发病。近年来研究发现,慢性牙周炎患者唾液中肿瘤坏死因子、白介素-6 等表达升高,且与牙周局部炎症程度密切相关,然而,miR-146a 是否参与了慢性牙周炎患者炎症因子的产生,仍需更进一步研究。

综上所述,慢性牙周炎患者唾液上清中 miR-146a 表达水平显著升高,且唾液上清中 miR-146a 表达变化与牙周组织的炎症破坏程度有关,提示其在慢性牙周炎发病过程中可能起着重要作用。

参考文献：

[1] 李丛华，杨霞，吴亚菲，等. 牙周病相关危险因素分析[J]. 第三军医大学学报，2010，32(3)：293－296.

[2] Singh R P, Massachi I, Manickavel S, *et al*. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity[J]. Autoimmun Rev, 2013, 12(12): 1160－1165.

[3] Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection[J]. Cell Microbiol, 2013, 15(9): 1496－1507.

[4] Cheng H S, Sivachandran N, Lau A, *et al*. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(7): 949－966.

[5] Sipert C R, Morandini A C, Dionisio T J, *et al*. MicroRNA-146a and microRNA-155 show tissue-dependent expression in dental pulp, gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro[J]. J Oral Sci, 2014, 56(2): 157－164.

[6] Xie Y F, Shu R, Jiang S Y, *et al*. Comparison of microRNA profiles of human periodontal diseased and healthy gingival tissues[J]. Int J Oral Sci, 2011, 3(3): 125－134.

[7] 程兴群，邓盟，徐欣，等. 唾液和唾液组学与疾病早期诊断[J]. 国际口腔医学杂志，2014，41(2)：213－218.

[8] 王春风，黄民江，金玲，等. 牙周基础治疗对慢性牙周炎伴冠心病患者血清Hs-CRP、IL-18、TNF-α水平及冠脉狭窄程度的影响[J]. 第三军医大学学报，2013，35(20)：2237－2239.

[9] Xie Z, Chen G, Zhang X, *et al*. Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e57502.

[10] 刘莉，谭颖徽，吕俊，等. 高原地区牙周炎患者唾液中3种牙周致病菌与临床牙周指数的相关性研究[J]. 第三军医大学学报，2014，36(5)：492－494.

[11] Sexton W M, Lin Y, Kryscio R J, *et al*. Salivary biomarkers of periodontal disease in response to treatment[J]. J Clin Periodontol, 2011, 38(5): 434－441.

[12] Wang S, Zhang X, Ju Y, *et al*. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B[J]. J Immunol, 2013, 191(1): 293－301.

[13] Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(9): 513－521.

[14] Patel R S, Jakymiw A, Yao B, *et al*. High resolution of microRNA signatures in human whole saliva[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(12): 1506－1513.

[15] Park N J, Zhou H, Elashoff D, *et al*. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5473－5477.

[16] Lochhead R B, Ma Y, Zachary J F, *et al*. MicroRNA-146a provides feedback regulation of lyme arthritis but not carditis during infection with Borrelia burgdorferi[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(6): e1004212.

[17] Lu L F, Boldin M P, Chaudhry A, *et al*. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses[J]. Cell, 2010, 142(6): 914－929.

（**收稿**：2014-11-05；**修回**：2014-12-15）

（编辑　栾　嘉）