

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2023.06.015

论著·临床

# 复发性阿弗他口腔溃疡患者唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 表达的相关性研究

童远武,董方,李艳莉,肖莹

基金项目:海南省卫生健康行业科研项目(20A200237)

作者单位:572000 海南省三亚中心医院/海南省第三人民医院口腔科

通信作者:童远武,E-mail:tongyuanwu85@yeah.net



**【摘要】目的** 分析复发性阿弗他口腔溃疡(RAU)患者唾液外泌体 miR-142-5p、叉头转录蛋白 O 亚族 3 (FOXO3) 表达与免疫功能的相关性。**方法** 收集 2019 年 12 月—2021 年 12 月三亚中心医院/海南省第三人民医院口腔科收治 RAU 患者 134 例作为观察组,另选取同期健康志愿者 134 例作为健康对照组。收集受试者唾液后提取唾液外泌体,qRT-PCR 分析样本中 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平,流式细胞仪测定外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例,并计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值;比较 miR-142-5p、FOXO3 高、低表达亚组间 RAU 患者的疼痛指数、溃疡面积;Pearson 法分析患者唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 水平之间及二者与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的相关性;绘制受试者工作特征曲线(ROC)评估 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平预测 RAU 的诊断价值。**结果** 与健康对照组比较,观察组患者唾液外泌体 miR-142-5p 表达水平、外周血 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例升高 [ $t(\chi^2)/P=34.580/ <0.001, 6.889/ <0.001$ ], FOXO3 mRNA 及蛋白表达水平、外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值降低 [ $t(\chi^2)/P=43.121/ <0.001, 37.692/ <0.001, 10.219/0.001, 26.091/ <0.001$ ]。与 miR-142-5p 低表达亚组比较,miR-142-5p 高表达亚组患者疼痛指数升高、溃疡面积增大 ( $t/P=3.880/ <0.001, 5.027/ <0.001$ );与 FOXO3 高表达亚组比较,FOXO3 低表达亚组患者疼痛指数升高、溃疡面积增大 ( $t/P=4.711/ <0.001, 5.382/ <0.001$ )。观察组患者唾液外泌体 miR-142-5p 与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值呈负相关 ( $P$  均  $<0.001$ ), FOXO3 mRNA 与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值呈正相关 ( $P$  均  $<0.001$ ), miR-142-5p、FOXO3 与 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比值均无相关性 ( $P > 0.05$ )。绘制 ROC 曲线结果提示,miR-142-5p、FOXO3 mRNA 及二者联合预测 RAU 复发的曲线下面积(AUC)分别为 0.810、0.809、0.947,二者联合检测优于各自单独预测效能 ( $Z=6.528, 8.573, P$  均  $<0.001$ )。**结论** RAU 患者唾液外泌体 miR-142-5p 处于高表达状态,FOXO3 处于低表达状态,二者共同参与复发性口腔溃疡的免疫调控。

**【关键词】** 复发性阿弗他口腔溃疡;miR-142-5p;叉头转录蛋白 O 亚族 3;唾液;外泌体;免疫功能**【中图分类号】** R781.5**【文献标识码】** A

**Correlation study on the expression of miR-142-5p and FOXO3 in saliva exosomes of RAU patients** Tong Yuanwu, Dong Fang, Li Yanli, Xiao Ying. Department of Stomatology, Sanya Central Hospital/Hainan Third People's Hospital, Hainan Province, Sanya 572000, China

Corresponding author: Tong Yuanwu, E-mail: tongyuanwu85@yeah.net

Funding program: Hainan Health Industry Scientific Research Project (20A200237)

**【Abstract】 Objective** To analyze the correlation between the expression of miR-142-5p and forkhead transcription protein O subgroup 3 (FOXO3) in saliva exosomes and immune function in patients with recurrent aphthous ulcer (RAU). **Methods** Collect 134 RAU patients admitted to the Stomatology Department of Sanya Central Hospital/Hainan Third People's Hospital from December 2019 to December 2021 as the observation group, and select 134 healthy volunteers from the same period as the healthy control group. Collect saliva from subjects and extract salivary exosomes. Analyze the expression levels of miR-142-5p and FOXO3 mRNA in the samples using qRT-PCR. Measure the proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells in peripheral blood using flow cytometry, and calculate the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio; Compare the pain index and ulcer area of RAU patients between high and low expression subgroups of miR-142-5p and FOXO3; Pearson's method was used to analyze the correlation between miR-142-5p and FOXO3 mRNA levels in patients' saliva exosomes, as well as their

correlation with CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>; Draw a receiver operating characteristic curve (ROC) to evaluate the diagnostic value of miR-142-5p and FOXO3 mRNA expression levels in predicting RAU. **Results** Compared with the healthy control group, the observation group showed an increase in the expression level of miR-142-5p in saliva extracellular vesicles and the proportion of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells in peripheral blood ( $\chi^2/P=34.580/<0.001, 6.889/<0.001$ ), FOXO3 mRNA and protein expression levels, peripheral blood CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cell ratio decreased [ $t(\chi^2)/P=43.121/<0.001, 37.692/<0.001, 10.219/0.001, 26.091/<0.001$ ]. Compared with the low expression subgroup of miR-142-5p, the high expression subgroup of miR-142-5p showed an increase in pain index and ulcer area ( $tP=3.880/<0.001, 5.027/<0.001$ ); Compared with the high expression subgroup of FOXO3, the low expression subgroup of FOXO3 showed an increase in pain index and ulcer area ( $tP=4.711/<0.001, 5.382/<0.001$ ). The observation group showed a negative correlation between miR-142-5p and the proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in the saliva exosomes ( $P<0.001$ ), while FOXO3 mRNA was positively correlated with the proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells ( $P<0.001$ ). There was no correlation between miR-142-5p, FOXO3, and the proportion of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells ( $P>0.05$ ). The results of plotting ROC curves indicate that the area under the curve (AUC) of miR-142-5p, FOXO3 mRNA, and their combination for predicting RAU recurrence are 0.810, 0.809, and 0.947, respectively. The combined detection of the two is superior to their respective individual predictive efficacy ( $Z=6.528, 8.573, P<0.001$ ). **Conclusion** In RAU patients, miR-142-5p in the salivary exosomes is highly expressed, while FOXO3 is in a low expression state. Both are involved in the immune regulation of recurrent oral ulcers.

**【Key words】** Recurrent aphthous ulcer; Micro RNA-142-5p; The forkhead box subgroup O3; Saliva; Exosome; Immune system

复发性阿弗他口腔溃疡 (recurrent aphthous ulcer, RAU) 是与体液免疫有密切关系的口腔黏膜破损疾病, 主要表现为口腔局部黏膜变红、肿胀、发热、疼痛, 多可自愈, 但反复出现, 影响患者进食、言语等<sup>[1-2]</sup>。各种因素 (局部损伤、炎性反应、营养不良、B 族维生素缺乏等) 导致的免疫功能损伤可引发该病, 因此从免疫学角度分析 RAU 的相关致病因子有助于该疾病的预防与治疗<sup>[3-7]</sup>。唾液腺外泌体是指存在于唾液中的直径 30 ~ 50 μm 的细胞外囊泡, 唾液外泌体可作为治疗的药物载体, 唾液外泌体 miRNA 可作为潜在的口腔疾病标志物<sup>[8-9]</sup>。已有研究证明<sup>[6]</sup>, 唾液外泌体 miR-142-5p 可介导获得性中耳脂瘤的炎症免疫调节。叉头转录蛋白 O 亚族 3 (FOXO3) 在溃疡性结肠炎中占据重要地位<sup>[5]</sup>。基于 miR-142-5p、FOXO3 在免疫功能中发挥的不同作用, 猜测二者可能在 RAU 患者中同样发挥作用。因此, 本研究通过检测 RAU 唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 表达水平, 并分析其与患者免疫功能的关系, 以期对 RAU 的预防和治疗提供新的理论依据, 报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2019 年 12 月—2021 年 12 月三亚中心医院/海南省第三人民医院口腔科收治复发性阿弗他口腔溃疡患者 134 例作为研究对象 (观察组), 其中男 50 例, 女 84 例, 年龄 18 ~ 62 (44.37 ± 5.27) 岁。另选取同期健康志愿者 134 例作为健康对照组, 男 50 例, 女 84 例, 年龄 18 ~ 63 (44.62 ± 5.48) 岁。2

组性别、年龄比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准 (20191103), 受试者及家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 病例选择标准 (1) 纳入标准: 符合复发性口腔溃疡诊断标准<sup>[10]</sup>; 患者均配合取样、治疗、研究; 患者 6 个月内每 2 个月均复发超过 1 次, 且患者就诊时处于溃疡期。(2) 排除标准: 存在显著的心、肝、肺等器质性改变; 红斑狼疮等自身免疫性疾病, 近 1 个月内使用过免疫抑制剂; 就诊时溃疡发作超过 3 d; 妊娠期、哺乳期女性。

## 1.3 观测指标与方法

1.3.1 qPCR 检测 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 水平: 研究对象漱口后收集唾液标本 (舌顶上颚, 唾液流入收集盒), 唾液离心去除细胞等杂质, 通过唾液外泌体试剂盒提取唾液外泌体 (Norgen Biotek), 低温保存。提取唾液外泌体总 RNA (TRIzol 试剂), 将适量 RNA 逆转录为 cDNA [miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司], 使用 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 配置 qPCR 反应体系, 使用罗氏 Light-Cycler480 II 实时荧光定量 PCR 系统 (Roche, 型号: LightCycler480 II) 进行 qPCR 反应, 反应条件: 95℃ 预处理 2 min, 95℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 10 s, 共 40 次循环。引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法定量 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 水平, U6、GAPDH 分别作为内参。

1.3.2 Western-blot 检测唾液外泌体中 FOXO3 蛋白

表达水平:提取唾液外泌体样本中总蛋白,BCA 试剂盒测量蛋白质浓度,行 SDS 凝胶电泳(LabYeah 电泳仪,上海百赛生物公司),转膜后封闭。添加一抗 [FOXO3 (abcam 公司) 1:1 000、GAPDH (内参), 1:5 000] 孵育过夜清洗后加入山羊抗兔二抗(1:5 000)。清洗 3 次后,使用 Axygen 凝胶成像系统(广州科适特科学仪器公司)测定蛋白条带灰度值,Image J 分析蛋白质灰度值。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 qRT-PCR primer sequence

基 因	上游引物	下游引物
miR-142-5p	5'-ACGCGTCGACATGTCT-CAGT-3'	5'-CGGGATCCTCAT-TCAGCAGA-3'
U6	5'-TGCGGGTCTCCGCT-TCGGC-3'	5'-CACTGCAGGGTC-CGAGGTCT-3'
FOXO3	5'-ACAACCTTGCCG-GAAGTGT-3'	5'-CCCGGTTGGTCCAG-TAG-3'
GAPDH	5'-GGATGCAGGGATGAT-GTTC-3'	5'-TGCACCACCAACT-GCTTA-3'

1.3.3 流式细胞术检测 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例:晨起收集受试者空腹肘静脉血 10 ml 于抗凝离心管中,离心后弃上清, -80℃ 保存待测。取上述抗凝血 100 μl,加入相应 CD3-CY5、CD4-FITC、CD8-PE 荧光标记抗体各 20 μl,避光孵育 30 min,加入溶血素,混匀后离心,清洗 2 次后弃上清,PBS 悬浮细胞,流式细胞仪(美国艾森公司,型号: NOVOCYTE3130)检测 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例,并计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值。

1.3.4 疼痛评分、溃疡面积评定:采用视觉模拟量表(VAS)<sup>[10]</sup> 评定疼痛指数,总分 10 分,评分越高,疼痛越重。镜下用标尺测量患者溃疡最大直径和垂直直径(与最大直径垂直),计算溃疡面积(mm<sup>2</sup>) = 最大直径 × 垂直直径。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析。计数资料以频数或率(%)表示,组间比较采用χ<sup>2</sup> 检验;符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;以 Pearson 法分析唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 二者及其与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 之间的相关性;绘制受试者工作特征曲线(ROC)评估 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平预测 RAU 复发的价值。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 2 组 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 水平比较 与健康对照组比较,观察组患者唾液外泌体 miR-142-5p 水

平升高(*P* < 0.01),FOXO3 mRNA、蛋白水平降低(*P* < 0.01),见表 2、图 1。

表 2 健康对照组与观察组唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Comparison of miR-142-5p and FOXO3 mRNA levels in saliva exosomes between healthy control group and observation group

组 别	例数	miR-142-5p	FOXO3	
			mRNA	蛋白
健康对照组	134	1.01 ± 0.18	1.02 ± 0.17	0.84 ± 0.16
观察组	134	2.35 ± 0.42	0.35 ± 0.06	0.26 ± 0.08
<i>t</i> 值		34.580	43.121	37.692
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

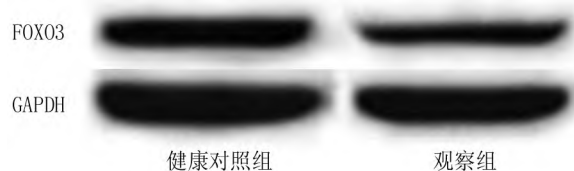


图 1 健康对照组与观察组唾液外泌体 FOXO3 蛋白水平比较  
Fig.1 Comparison of FOXO3 protein levels in saliva exosomes between the healthy control group and the observation group

2.2 2 组免疫指标比较 与健康对照组比较,观察组患者外周血 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值下降(*P* < 0.01),外周血 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例升高(*P* < 0.01),见表 3。

表 3 健康对照组与观察组外周血免疫指标水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Comparison of peripheral blood immune index levels between the healthy control group and the observation group

组 别	例数	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
健康对照组	134	41.44 ± 5.24	22.46 ± 2.41	1.84 ± 0.21
观察组	134	35.28 ± 4.71	24.52 ± 2.54	1.13 ± 0.24
<i>t</i> 值		10.219	6.889	26.091
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 观察组患者不同亚组间疼痛指数、溃疡面积比较 将观察组患者唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 分别按照均数 2.35、0.35 分组,miR-142-5p ≥ 2.35 为高表达亚组 82 例, < 2.35 为低表达亚组 52 例; FOXO3 ≥ 0.35 为高表达亚组 55 例, < 0.35 为低表达亚组 79 例。与 miR-142-5p 低表达亚组比较,miR-142-5p 高表达亚组患者疼痛指数升高、溃疡面积增大(*P* < 0.01)。与 FOXO3 高表达亚组比较,FOXO3 低表达亚

组患者疼痛指数、溃疡面积升高 ( $P < 0.01$ ), 见表 4。

表 4 不同 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 水平患者疼痛指数、溃疡面积比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Comparison of pain index and ulcer area in patients with different miR-142-5p and FOXO3 mRNA levels

组别	例数	疼痛指数	溃疡面积(mm <sup>2</sup> )
miR-142-5p 低表达亚组	52	8.20 ± 1.14	9.46 ± 1.53
miR-142-5p 高表达亚组	82	9.13 ± 1.47	11.35 ± 2.42
FOXO3 低表达亚组	79	9.23 ± 1.39	11.42 ± 2.11
FOXO3 高表达亚组	55	8.10 ± 1.33	9.46 ± 2.02
$t/P$ miR-142-5p 亚组间值		3.880/ <0.001	5.027/ <0.001
$t/P$ FOXO3 亚组间值		4.711/ <0.001	5.382/ <0.001

2.4 唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 与免疫指标相关性分析 观察组患者唾液外泌体 miR-142-5p 与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值均呈负相关 ( $P$  均 < 0.01), FOXO3 mRNA 与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值均呈正相关 ( $P$  均 < 0.01), 患者 miR-142-5p、FOXO3 与 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 细胞比例均无相关性 ( $P > 0.05$ ), 而 miR-142-5p 与 FOXO3 呈负相关 ( $r = -0.368, P < 0.001$ ), 见表 5。

表 5 复发性阿弗他口腔溃疡患者唾液外泌体 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的相关性

Tab. 5 Correlation between miR-142-5p, FOXO3 mRNA and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> in saliva exosomes of patients with recurrent aphthous oral ulcers

项目	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>		CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	
	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值	$r$ 值	$P$ 值
miR-142-5p	-0.512	<0.001	0.164	0.172	-0.603	<0.001
FOXO3	0.574	<0.001	0.223	0.084	0.561	<0.001

2.5 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平预测 RAU 复发的价值 绘制 ROC 曲线, 并计算曲线下面积 (AUC), 结果显示, miR-142-5p、FOXO3 mRNA 及二者联合预测 RAU 复发的 AUC 分别为 0.810、0.809、0.947, 二者联合检测优于各自单独预测效能 ( $Z = 6.528, 8.573, P$  均 < 0.001), 见表 6、图 2。

### 3 讨论

RAU 主要是以口腔黏膜反复破损为表现的深层次溃疡, 临床上分为轻型溃疡、腺周口创和疱疹样溃疡<sup>[1]</sup>。根据最新统计资料显示, 全球有 25% 的人曾经发生过口腔溃疡<sup>[2]</sup>。RAU 的诱发因素具有复杂性和多样性特点, 其中研究发现机体免疫反应在复发性口腔溃疡的发病机制中占据重要地位<sup>[3]</sup>。研究表明<sup>[3,4]</sup>,

表 6 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平预测 RAU 复发的价值比较

Tab. 6 Comparison of the value of predicting RAU recurrence by mRNA expression levels of miR-142-5p and FOXO3

变量	Cut-off 值	AUC(95% CI)	敏感度	特异度	Youden 指数
miR-142-5p	2.57	0.810(0.741~0.879)	0.691	0.894	0.585
FOXO3 mRNA	0.32	0.809(0.730~0.888)	0.643	0.863	0.506
二者联合		0.947(0.896~0.994)	0.744	0.978	0.722

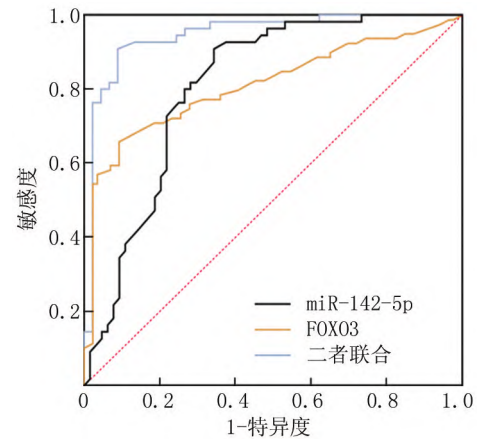


图 2 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平预测 RAU 复发的 ROC 曲线

Fig. 2 ROC curve of miR-142-5p, FOXO3 mRNA expression levels in predicting RAU recurrence

在复发性口腔溃疡病理组织中, 促炎性细胞因子 IL-2、IL-12、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  处于高表达, 同时炎症因子抑制剂 TGF- $\beta$  和 IL-10 低表达, 说明炎症因子的分泌失衡是造成此疾病的诱发因素之一; 研究显示, CD4<sup>+</sup> 细胞与复发性口腔溃疡的发病具有密切相关性<sup>[4]</sup>; 另有研究提示, 溃疡前期、溃疡发作期与间歇期 T 淋巴细胞亚群均有显著变化, 介导患者的免疫应答, 最终导致口腔黏膜的持续炎症反应<sup>[6]</sup>; 在人体遇刺激引发免疫损伤时, 机体内 CD4<sup>+</sup> 细胞比例下降, 而 CD8<sup>+</sup> 占比升高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值降低, 两者的比值可显示患者免疫力损伤严重程度<sup>[3]</sup>。因此, 早期发现患者体液中异常的免疫反应, 成为及时干预和早期治疗 RAU 的关键。

目前, 针对口腔类疾病诊断的方法越来越多, 如液基细胞学检测、组织病理学检测等, 但是上述诊断方式的有创性, 常会引起患者和家属的排斥。唾液是口腔疾病辅助性诊断体液, 留取样本方便, 唾液的蛋白质组学、基因组学研究提高了口腔疾病的诊断水平, 因此通过无创或微创采集患者唾液标本进行相关检测和诊

断,成为目前临床诊疗中最常用的方式。唾液中的外泌体不仅可以作为治疗的药物载体,同时唾液外泌体 miRNA 可作为潜在的口腔疾病标志物<sup>[8-9]</sup>,通过检测唾液外泌体的差异性寻找疾病发生、发展的内在机制已成为学术界新的热点。基于以上观点,本研究以唾液外泌体标本中差异性表达的 miRNAs 为切入点,聚焦外泌体 miR-142-5p 和 FOXO3 的表达与 RAU 患者体液免疫之间的相关性。既往类似研究发现,在癌症、免疫相关疾病患者的活检组织中 miR-142-5p 呈过度表达<sup>[11-13]</sup>。Han 等<sup>[14]</sup>研究显示,miR-142-5p 在排斥反应免疫应答中上调。李媛等<sup>[8]</sup>研究显示,miR-142-5p 可在体外直接影响 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群 Th17 细胞发育,促进 IL-17 的产生,大鼠组织炎症因子水平升高,促进自身免疫性葡萄膜炎进展。本研究结果显示,RAU 患者中唾液外泌体 miR-142-5p 水平显著高于健康对照组人群,这与以上研究结果一致,因此从侧面证实了 miR-142-5p 正向参与患者细胞免疫的调控。

FOXO3 属于 FOXO 家族,同样在机体的免疫应答中发挥重要作用,在 FOXO3 缺乏的 T 细胞中,Th17 细胞比例明显上调<sup>[15]</sup>。闵敏<sup>[16]</sup>研究显示,FOXO3 在溃疡性结肠炎中可被 miR-155 下调,调节 IL-8 参与溃疡性结肠炎结肠黏膜炎症反应的发展。而溃疡性结肠炎属于非特异性炎症性疾病,易反复发作,可能与免疫功能失常有关,这与复发性口腔溃疡有部分病因、发病机制重合,且复发性口腔溃疡发生几率高于溃疡性结肠炎。本试验研究结果显示,RAU 唾液外泌体中 FOXO3 mRNA 与蛋白表达水平显著低于健康对照组,与 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞比值呈正相关,说明 FOXO3 负向参与 RAU 中机体的免疫反应,笔者查阅以往的生物信息学分析结果发现<sup>[8,17-20]</sup>,FOXO3 是 miR-142-5p 的靶基因,两者存在结合位点,miR-142-5p 可调控 FOXO3 参与自身免疫性葡萄膜炎的发展。本试验结果提示,RAU 患者免疫调节中 miR-142-5p 过表达,但 FOXO3 表达显著降低,因此提示在 RAU 患者中 miR-142-5p 过表达可达抑制 FOXO3 的表达,唾液外泌体 miR-142-5p 和 FOXO3 存在负相关调控,两者共同参与 RAU 免疫失常,但其具体调控机制仍需进一步试验得出相关数据。

本试验还研究了 miR-142-5p、FOXO3 mRNA 表达水平与患者疼痛指数、溃疡面积的影响,结果显示,当 miR-142-5p 表达高于平均值时,患者的疼痛加剧,且溃疡的面积明显增大;当 FOXO3 处于低表达时,会出现相同的表现,这从侧面表明 miR-142-5p 与 FOXO3 共同参与了 RAU 的免疫失常,并与其表达量成一定的

关系,本试验并未进行相关深入研究,未来会进行相关性定量分析。

综上所述,复发性阿弗他口腔溃疡患者唾液外泌体 miR-142-5p/FOXO3 分子作用靶点共同参与对 RAU 的免疫调控,其中 miR-142-5p 为正向调控,FOXO3 为负向调控,同时关于两者的表达定量对 RAU 患者的影响需要进一步深入研究。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突

**作者贡献声明**

童远武:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写,论文审核;董芳、李艳莉:分析试验数据,论文审核;肖莹:资料搜集整理,分析试验数据,论文修改

**参考文献**

- [1] Al-Ahmad M, Ezzat B, Sukmasari A, et al. Evaluation of the salivary flow rate and pH in patients with recurrent oral ulcers [J]. *International Medical Journal Malaysia*, 2020, 17 (2): 49-56. DOI: 10.31436/imjm.v17i2.271.
- [2] Hamed S, Sadeghpour O, Shamsardekani MR, et al. The most common herbs to cure the most common oral disease; Stomatitis recurrent aphthous ulcer (RAU) [J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2016, 18 (2): 35-42. DOI: 10.5812/iremj.21694.
- [3] Nur'Aeny N, Gurnida DA, Suwarsa O, et al. The impact of DNA methylation on IL6 mRNA levels in hematinic deficiency and atopy-associated recurrent aphthous stomatitis patients [J]. *Int J Dent*, 2021, 2021: 5560695. DOI: 10.1155/2021/5560695.
- [4] 郜青, 张建英. 复发性口腔溃疡与口腔及消化道菌群微生态的相关性研究分析 [J]. *国际医药卫生导报*, 2021, 27 (19): 3072-3075. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-1245.2021.19.029. Gao Q, Zhang JY. Correlation of recurrent oral ulcer with microecology of oral and digestive flora [J]. *International Medicine and Health Guidance News*, 2021, 27 (19): 3072-3075. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-1245.2021.19.029.
- [5] Deng X, Su Y, Wu H, et al. The role of microRNAs in autoimmune diseases with skin involvement [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015, 81 (3): 153-165. DOI: 10.1111/sji.12261.
- [6] 隋翠琴. miR-142-5p 直接介导 CDK5 对获得性中耳胆脂瘤的炎症反应的调节 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [7] 王其进, 陈玉, 张涛, 等. FOXO3 调控 NF-κBp50 表达介导肠上皮细胞凋亡参与溃疡性结肠炎相关癌变及健脾清热活血方药干预研究 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26 (12): 3043-3046. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.12.093. Wang QJ, Chen Y, Zhang T, et al. Explore the intervention mechanism of JianPi QingRe HuoXue decoction by detecting Foxo3 mediated nuclear factor-KBp50 influencing enterocyte apoptosis in ulcerative colitis associated carcinogenesis [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2015, 26 (12): 3043-3046. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.12.093.
- [8] 李媛, 秦廷玉, 郭龙, 等. miR-142-5p 靶向调控叉头转录蛋白 O 亚族 3 介导辅助性 T 细胞 17 细胞炎症反应促进自身免疫性葡萄膜炎的发展 [J]. *中华眼底病杂志*, 2021, 37 (7): 533-541. DOI:

- 10.3760/cma.j.cn511434-20201203-00602.
- Li Y, Qin TY, Guo L, et al. miR-142-5p target regulation of forkhead transcription protein O subfamily 3 mediateing helper T cell 17 cell inflammation reaction promotes the development of autoimmune uveitis[J]. Chinese Journal of Ocular Fundus Diseases, 2021, 37(7): 533-541. DOI: 10.3760/cma.j.cn511434-20201203-00602.
- [9] Behzad C, Cheshomi H. Salivary exosomes: Properties, medical applications, and isolation methods[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(8): 647-654. DOI: 6295-6307. 10.1007/s11033-020-05659-1.
- [10] 中华口腔医学会口腔黏膜病专业委员会, 中华口腔医学会中西医结合专业委员会. 复发性阿弗他溃疡诊疗指南(试行)[J]. 中华口腔医学杂志, 2012, 47(7): 402-404. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2012.07.005.
- [11] 陈军歌. 外泌体作为结直肠癌诊断标志物的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(17): 3089-3092. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2020.17.039.
- Chen JG. Research progress of exosomes as biomarkers for colorectal cancer diagnosis[J]. Journal of Modern Oncology, 2020, 28(17): 3089-3092. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2020.17.039.
- [12] Liu H, Chen R, Kang F, et al. KCNQ1OT1 promotes ovarian cancer progression via modulating MIR-142-5p/CAPN10 axis[J]. Mol Genet Genomic Med, 2020, 8(2): e1077. DOI: 10.1002/mgg3.1077.
- [13] Sui MX, Wang ZW, Xi D, et al. miR-142-5P regulates triglyceride by targeting CTNBN1 in goat mammary epithelial cells[J]. Reprod Domest Anim, 2020, 55(5): 613-623. DOI: 10.1111/rda.13660.
- [14] Han J, Song YP, Ahn YH, et al. MicroRNA-142-5p is up-regulated on allogeneic immune responses and up-regulates MHC class II expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. Transplant Proc, 2021, 53(1): 408-416. DOI: 10.1016/j.transproceed.2020.05.024.
- [15] 何霞. 神经细胞中 MicroRNA-182 靶向 FOXO3 激活 I 型干扰素免疫应答发挥抗人巨细胞病毒作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [16] 闵敏. MicroRNA-155 通过调节转录因子 FOXO3a 在溃疡性结肠炎中的作用[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2012.
- [17] Talebi F, Ghorbani S, Chan WF, et al. MicroRNA-142 regulates inflammation and T cell differentiation in an animal model of multiple sclerosis[J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 55. DOI: 10.1186/s12974-017-0832-7.
- [18] Wagle MV, Parish IA. FOXO3 is differentially required for CD8<sup>+</sup> T-cell death during tolerance versus immunity[J]. Immunol Cell Biol, 2016, 94(9): 12-19. DOI: 895-899. 10.1038/icc.2016.53.
- [19] Xia Y, Zhou K, Sun M, et al. The miR-223-3p from salivary exosome regulates pyroptosis through NLRP3-Caspase 1-GSDMD signal axis in periodontitis[J]. Inflammation, 2021, 44(6): 2531-2542. DOI: 10.1007/s10753-021-01522-y.
- [20] Meirelles M, Pedde V, Figueiredo JA. For an ecology of scientific work: Science, politics and the case of streams Pampa and Luiz Rau in Novo Hamburgo, Brazil[J]. Braz J Biol, 2015, 75(4 Suppl 2): 68-76. DOI: 10.1590/1519-6984.00713suppl.

(收稿日期: 2022-12-09)

(上接 639 页)

- [9] 陈涛平, 王云飞. 关节镜治疗膝关节半月板损伤对 Lysholm 评分的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(13): 1425-1426. DOI: CNKI; SUN; HZZZ. 0.2017-23-025
- [10] 陈春君, 李政甜, 杜刚. 前交叉韧带损伤相关的解剖因素分析[J]. 广西医学, 2021, 43(1): 4-6. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2021.01.02.
- [11] 韩广骏, 李皓桓, 张宇标, 等. 前交叉韧带损伤的临床特点分析[J]. 中国医药, 2020, 15(10): 1603-1606. DOI: 10.3760/j.issn.1673-4777.2020.10.027.
- [12] 曹庆, 邵松, 许俊胜, 等. 两种时机行关节镜下自体肌腱重建手术治疗急性前交叉韧带损伤的效果对比[J]. 中国现代手术学杂志, 2020, 24(6): 424-429. DOI: 10.16260/j.cnki.1009-2188.2020.06.006.
- [13] 徐华, 郭氧, 穆臣会, 等. 前交叉韧带联合前外侧韧带重建手术治疗前交叉韧带断裂的疗效观察[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2020, 35(10): 1086-1088. DOI: 10.7531/j.issn.1672-9935.2020.10.027.
- [14] 王涛, 史长安, 张文生, 等. 前交叉韧带重建联合前外侧韧带重建手术治疗高度轴移的前交叉韧带损伤的疗效观察[J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(11): 86-89. DOI: 10.7619/jcmp.201911024.
- [15] 毛云鹤, 孙伟豪, 付维力, 等. 前交叉韧带双束重建联合前外侧韧带重建在前交叉韧带翻修中的应用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(3): 330-336. DOI: 10.7507/1002-1892.202010044.
- [16] 吴关, 张辉, 李旭, 等. 前外侧韧带重建术治疗轴移 II 级的前交叉韧带损伤[J]. 中华骨科杂志, 2022, 42(9): 555-562. DOI: 10.3760/cma.j.cn121113-20220216-00068.
- [17] Lee DW, Kim JG, Kim HT, et al. Evaluation of anterolateral ligament healing after anatomic anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Am J Sports Med, 2020, 48(5): 1078-1087. DOI: 10.1177/0363546520908805.

(收稿日期: 2023-03-31)