

长链非编码RNA基因芯片技术筛选 口腔扁平苔藓唾液外泌体差异表达基因

左雯鑫¹ 袁理² 杨天慧² 汤剑明² 周芷伊³ 何飞²

¹香港大学深圳医院口腔医学部,深圳 518053; ²深圳市人民医院口腔医学中心,深圳 518020; ³深圳市罗湖医院集团口腔医学中心,深圳 518001

通信作者:何飞,Email:hefeixqkq@aliyun.com

【摘要】目的 研究利用基因芯片技术筛选长链非编码RNA(lncRNA)和信使RNA(mRNA)在口腔扁平苔藓(OLP)唾液外泌体中的异常表达,分析和探讨lncRNA和mRNA在OLP发生、发展中可能的分子机制。**方法** 收集9例OLP患者和3名健康对照者的唾液样本,分离得到样本中的外泌体。对外泌体进行纳米颗粒跟踪分析(NTA)检测、透射电子显微镜检测和外泌体特异性生物标志物的蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定。使用lncRNA基因表达芯片技术比较糜烂型OLP患者(EOLP组)和网纹型OLP患者(ROLP组)与健康对照者唾液外泌体中lncRNA和mRNA的表达谱,筛选得到差异表达基因并进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。**结果** NTA、透射电子显微镜和Western blot检测均证实分离得到外泌体。唾液外泌体lncRNA基因表达芯片结果显示,与对照组相比,EOLP组中有267个差异表达的lncRNA,其中上调99个、下调168个;有122个差异表达的mRNA,其中上调38个、下调84个;ROLP组中有201个差异表达的lncRNA,其中上调83个、下调118个;有86个差异表达的mRNA,其中上调32个、下调54个。两组有50个相同的差异表达mRNA和128个相同的差异表达lncRNA。GO和KEGG分析显示,差异表达基因涉及到基因转录、蛋白翻译和免疫反应等多个生物学过程。**结论** 本研究确定了OLP患者唾液外泌体中lncRNA和mRNA的表达谱,筛选出了与OLP相关的差异表达lncRNA和mRNA,可作为诊断和阐明OLP发病机制的重要候选者。

【关键词】 口腔扁平苔藓; 唾液; 外泌体; 长链非编码RNA; 信使RNA

基金项目:深圳市科技计划(JCYJ20190807145815129、JCYJ20180228164611173)

引用著录格式:左雯鑫,袁理,杨天慧,等.长链非编码RNA基因芯片技术筛选口腔扁平苔藓唾液外泌体差异表达基因[J/OL].中华口腔医学研究杂志(电子版),2022,16(4):208-218.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2022.04.002

Screening differentially expressed genes in salivary exosomes of oral lichen planus by lncRNA microarray

Zuo Wenxin¹, Yuan Li², Yang Tianhui², Tang Jianming², Zhou Zhiyi³, He Fei²

¹Department of Stomatology, The University of Hong Kong-Shenzhen Hospital, Shenzhen 518053, China;

²Stomatology Center, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China; ³Stomatology Center, Shenzhen Luohu Hospital Group, Shenzhen 518001, China

Corresponding author: He Fei, Email: hefeixqkq@aliyun.com

【Abstract】 Objective To screen the abnormal expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) and mRNA by lncRNA expression microarray in oral lichen planus (OLP) salivary exosomes, and to analyze and explore the possible molecular mechanism of lncRNA and mRNA in the occurrence and development of OLP. **Methods** Saliva samples from 9 OLP patients and 3 healthy controls were collected to isolate exosomes. Then, exosomes were detected by nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy and western blot analysis of exosome-specific biomarkers. The expression profiles of lncRNA and mRNA in the salivary exosomes of erosive OLP patients (EOLP group) and reticulated OLP patients (ROLP group) were compared with those of healthy controls by lncRNA expression microarray, and the differentially expressed genes were screened. The differential genes were analyzed by Gene

Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis. **Results** NTA, transmission electron microscopy and Western blot confirmed the isolation of exosomes. Compared with the control group, there were 267 differentially expressed lncRNAs in the EOLP group, including 99 up-regulated and 168 down-regulated lncRNAs, and there were 122 differentially expressed mRNAs, of which 38 were up-regulated and 84 were down-regulated. There were 201 differentially expressed lncRNAs in the ROLP group, of which 83 were up-regulated and 118 were down-regulated, and there were 86 differentially expressed mRNAs, of which 32 were up-regulated and 54 were down-regulated. There were 50 identical differentially expressed mRNAs and 128 identical differentially expressed lncRNAs in the two groups. GO and KEGG analysis showed that differentially expressed genes involved in gene transcription, protein translation, immune response and other biological processes. **Conclusions** In this study, we determined the expression profile of lncRNA and mRNA in salivary exosomes of OLP patients, and identified differentially expressed lncRNAs and mRNAs associated with OLP. These lncRNAs and mRNAs may serve as important candidates for diagnosis and elucidate the pathogenesis of OLP.

【Key words】 Lichen planus, oral; Saliva; Exosomes; Long Noncoding RNA; RNA, messenger

Fund programs: Science and Technology Planning Project of Shenzhen (JCYJ20190807145815129, JCYJ20180228164611173)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2022.04.002

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是临床常见的口腔黏膜慢性炎症性疾病,其患病率为0.1%~4.0%,以中年妇女多见,部分病例有癌变风险,世界卫生组织(WHO)将其列入口腔潜在恶性疾患(oral potentially malignant disorders, OPMD)范畴^[1-4]。OLP被认为是一种口腔潜在恶性病变,其中有0.4%~2.0%的患者可能发展为口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)^[5],其病因及发病机制尚未明确,可能与免疫、遗传、精神心理和微生物等多种因素有关,对OLP癌变危险性及病情进行准确、微创的评估和预测有助于临床早发现、早诊断和早治疗^[6]。唾液外泌体是存在于唾液中的直径在30~150 nm的细胞外囊泡,通过携带多种生物活性物质,如蛋白质、信使RNA(messenger RNA, mRNA)、微RNA(microRNA, miRNA)和DNA等发挥生物学效应,唾液外泌体性质稳定,长期储存仍可保持其膜的完整性,可以检测到上皮细胞及粒细胞的标志物。近年研究揭示,唾液外泌体在多种口腔疾病的发生、发展中发挥作用^[7-8]。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度大于200个核苷酸的非编码RNA^[9],早期被认为是基因组转录的“噪音”。研究表明,lncRNA在表观遗传调控、转录调控和转录后调控等众多生命活动中发挥不可替代的作用^[10-11],lncRNA在调节先天性和适应性免疫反应,及免疫细胞发育方面也起重要作用^[12]。目前,关于OLP患者唾液外泌体中lncRNA表达谱的研究鲜少报道。本研究采用基因芯片技术结合生物信

息学分析方法,在OLP患者与健康人群的唾液外泌体中进行差异表达的lncRNA和mRNA筛选,分析差异基因的主要生物学效应及探寻特征性生物标志物。

材料与方法

一、研究对象

依据2012年《口腔扁平苔藓诊疗指南(试行)》中的诊断标准,选择2021年1—6月就诊于深圳市人民医院口腔医学中心口腔黏膜病专科门诊,临床性诊断及病理诊断明确为OLP的患者9例,其中男4例、女5例,年龄(43.3±14.9)岁,糜烂型6例、网状型3例,另选择同期健康体检者3例作为对照。

1. 纳入标准:(1)知情同意参加本次研究者;(2)年龄满18周岁;(3)无认知障碍和精神疾患。

2. 排除标准:(1)患有其他局部和系统性疾病;(2)3个月内曾接受局部或全身免疫调节药物治疗。

以患者自愿参加为原则,所有参与者均签署知情同意书,本研究项目经深圳市人民医院伦理委员会审批通过(批文号:LL-KY-2019173)。

二、样本采集

1. 受试者用清水清洁口腔后,以舒适的姿势躺好或者坐好,头部向下倾斜,将唾液囤积到口腔,约2~5 min。

2. 将囤积在口腔的唾液吐出收集在50 mL无菌离心管中,持续收集3~5 mL。

3. 收集过程中将离心管放于冰上,整个收集过程不超过30 min。

4. 将唾液转入1.5 mL离心管,在4℃下,2 600 ×g离心30 min,去除沉淀。

5. 将离心上清转入新的1.5 mL离心管,添加lncRNA酶抑制剂,防止lncRNA降解。

6. 将收集的唾液上清-80℃冻存。

三、唾液外泌体提取与鉴定

按照exoEasy Maxi Kit(Qiagen,德国)试剂盒说明书分离唾液中的外泌体,将预过滤的唾液与2×结合缓冲液XBP以1:1的比例混合,并加载到exoEasy膜亲和柱上,离心1次并弃去流出液,再用10 mL Buffer XWP洗涤以去除非特异性保留物质,然后将离心柱转移到新的收集管中,离心后用400 μL Buffer XE洗脱外泌体,制成外泌体原液。随后,采用纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测、透射电子显微镜检测和蛋白免疫印迹法(Western blot)进行外泌体鉴定。

四、长链非编码RNA芯片实验

提取外泌体总RNA,反转录成cDNA,利用cDNA的第二链扩增生成cRNA,随后使用荧光染料Cyanine-3-CTP(Cy3)进行标记,标记后进行纯化以及芯片杂交。本研究所用芯片为Agilent lncRNA array(4×180K)基因表达芯片,按照Agilent lncRNA Array Protocol标准流程进行芯片杂交实验。完成杂交的芯片采用Agilent Scanner G5761A(Agilent Technologies)扫描得到原始图像。扫描图像使用

Feature Extraction Software version 12.0.3.1(Agilent)进行分析,得到原始数据。

五、数据处理与分析

使用limma包^[13]对芯片原始数据进行背景校正和样本的标准化,移除Control探针,得到可以进行样本间比较的标准化数据。然后对探针进行注释,得到基因水平的表达量,当有多个探针对应同一个基因时,取多个探针的平均值。差异表达lncRNA或mRNA通过P值和 $\log_2(\text{FoldChange})$ ($\log_2\text{FC}$)值进行筛选,筛选阈值设定为 $P < 0.01$ 且 $|\log_2\text{FC}| > 1$ 。随后使用分析软件topGO^[14]对差异表达基因进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析,统计检验方法为Fisher's Exact Test;使用分析软件clusterProfiler^[15]对差异表达基因进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)Pathway富集分析,统计检验方法为Hypergeometric Test。

结 果

一、外泌体鉴定结果

本研究将从唾液样本中分离得到的外泌体进行了NTA检测、透射电子显微镜检测和外泌体特异性生物标志物的Western blot鉴定。NTA显示,外泌体粒径大小30~150 nm,从而证实了它们的预期大小分布(图1A)。透射电子显微镜显示外泌体样本中都有直径为30~150 nm的球形囊泡(图1B)。

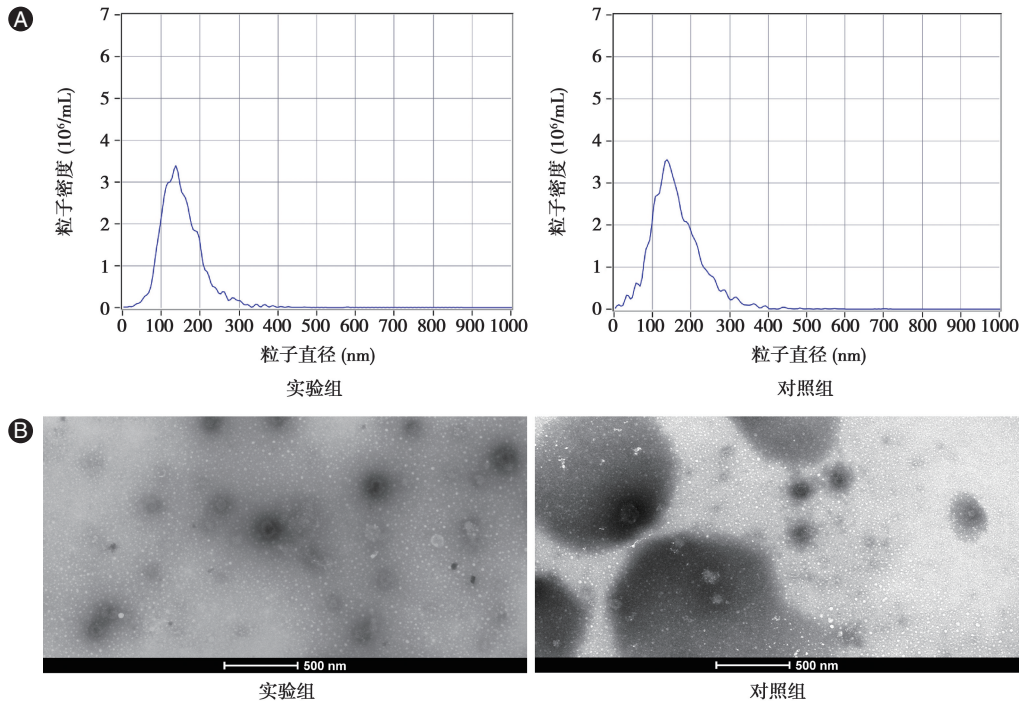


图1 唾液外泌体的鉴定 A:纳米颗粒跟踪分析(NTA);B:透射电子显微镜检测。

Western blot 检测了3种常规的外泌体蛋白标志物,即CD9、CD63和ALIX(图2),结果显示这3种外泌体蛋白标志物都在分离得到的外泌体样本中表达。实验结果均证实本研究从唾液样品中成功纯化了外泌体。

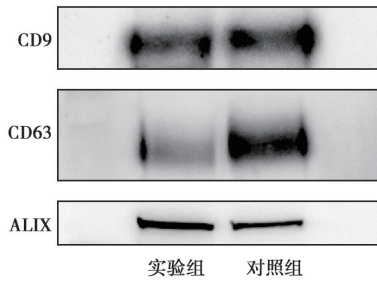


图2 唾液外泌体特异性生物标志物的Western blot 鉴定

二、表达量箱线图分析

从表达量箱线图(图3)可以看出各个样本表达量的分布情况,其平均值基本保持在同一水平,验证了芯片数据的稳定性。

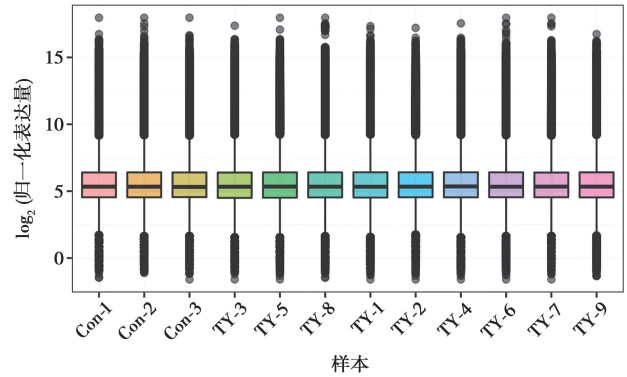


图3 唾液外泌体样本的基因表达量箱线图

三、口腔扁平苔藓患者唾液外泌体长链非编码RNA和信使RNA的差异表达分析

利用基因芯片技术检测了OLP患者和健康对照的唾液外泌体中的lncRNA和mRNA表达谱。将OLP样本分为糜烂型OLP组(EOLP组)和网纹型OLP组(ROLP组)。应用火山图分析直接显示,这两组与对照组之间的lncRNA和mRNA的差异(图4)。与

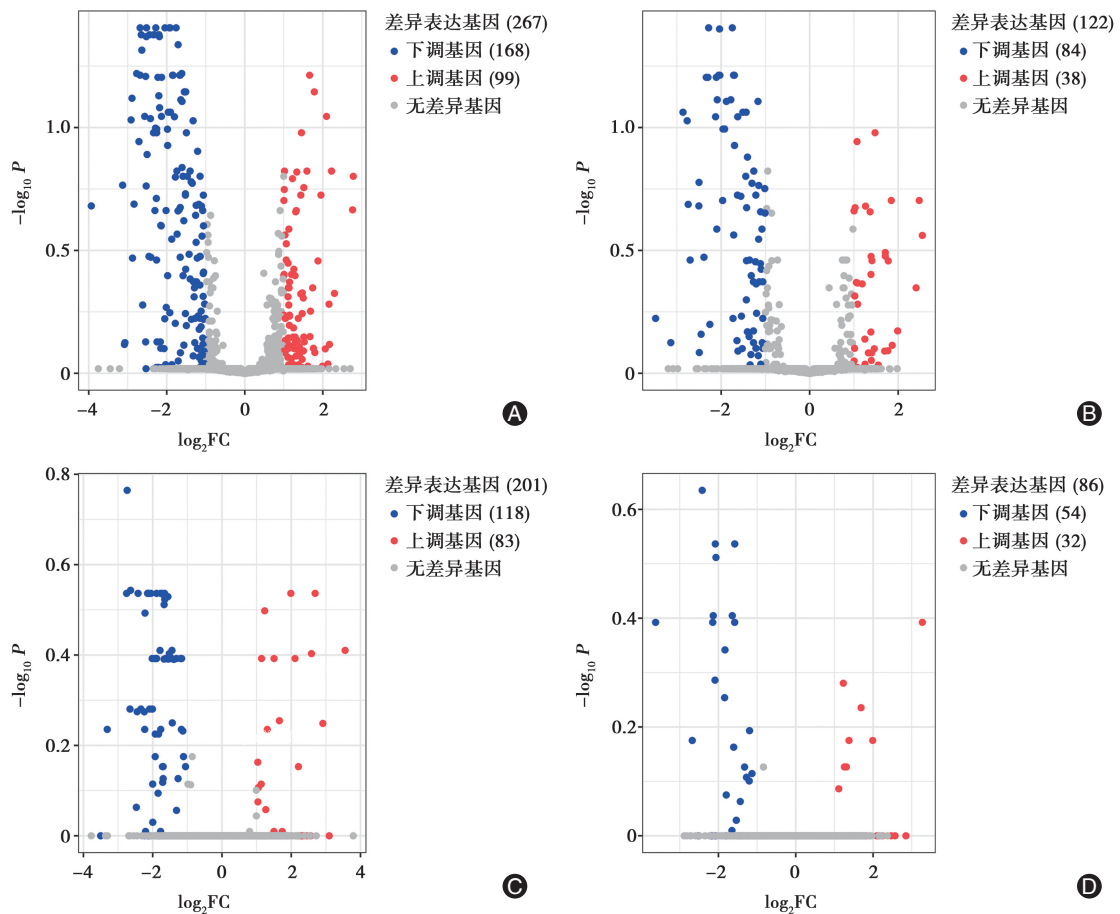


图4 口腔扁平苔藓患者和健康对照之间的长链非编码RNA(lncRNA)和信使RNA(mRNA)谱比较 火山图用于区分糜烂型口腔扁平苔藓组差异表达的lncRNA(A)和mRNA(B);火山图用于区分网纹型口腔扁平苔藓组差异表达的lncRNA(C)和mRNA(D);FC:与对照组相比,实验组上调或下调的倍数。

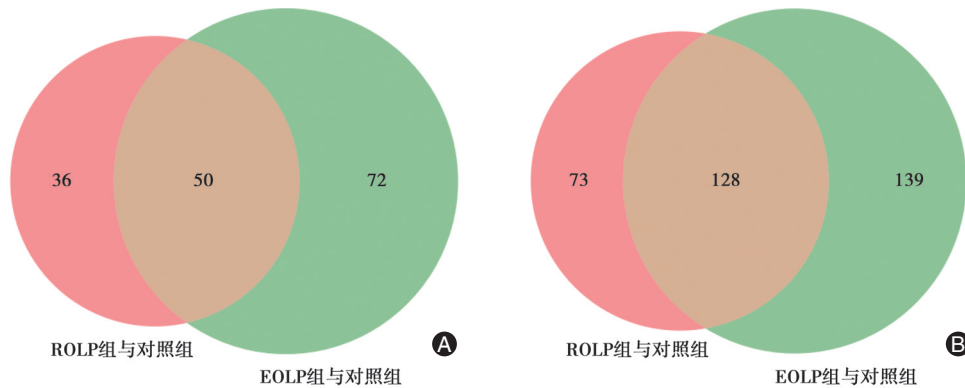


图5 口腔扁平苔藓唾液外泌体与对照的差异表达基因的韦恩图 A:糜烂型口腔扁平苔藓组和网纹型口腔扁平苔藓组共有差异mRNA;B:糜烂型口腔扁平苔藓组和网纹型口腔扁平苔藓组共有差异lncRNA。

对照组相比,EOLP组唾液外泌体中有267个差异表达的lncRNA,其中99个上调表达、168个下调表达(图4A);有122个差异表达的mRNA,其中38个上调表达、84个下调表达(图4B)。与对照组相比,ROLP组唾液外泌体中有201个差异表达的lncRNA,其中83个上调表达、118个下调表达(图4C);有86个差异表达的mRNA,其中32个上调表达、54个下调表达(图4D)。

四、糜烂型口腔扁平苔藓组和网纹型口腔扁平苔藓组共有差异基因

对差异表达的mRNA和lncRNA进行了韦恩图分析。结果显示,EOLP组和ROLP组有50个相同的差异表达mRNA(图5A)和128个相同的差异表达lncRNA(图5B)。表1和表2分别显示了EOLP组前10个表达上调和表达下调最显著的lncRNA和mRNA(按P值排序),表3和表4分别显示了ROLP组前10个表达上调和表达下调最显著的lncRNA和mRNA(按P值排序)。

五、差异表达信使RNA的GO分析和KEGG分析

GO分为生物过程(biological process, BP)、细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)3个部分。本研究对差异表达的mRNA进行了基因本体GO功能富集分析。结果显示,EOLP组一共富集到408条BP术语,93条CC术语,95条MF术语,具有代表性的15条见表5。ROLP组一共富集到305条BP术语,80条CC术语,60条MF术语,具有代表性的15条见表6。

本研究对差异表达的mRNA进行了KEGG信号通路富集分析。结果显示,EOLP组一共富集到13条KEGG信号通路(表7),ROLP组一共富集到9条KEGG信号通路(表8)。

表1 糜烂型口腔扁平苔藓(EOLP)组前10个表达上调和表达下调最显著的长链非编码RNA

名称	log ₂ FC	P值	表达情况
lnc-EVX1-2	1.662 166	0.000 024 2	上调
lnc-NHS-2	1.783 052	0.000 041 4	上调
lnc-GEMIN4-4	2.095 217	0.000 073 8	上调
linc-PDE6B	1.453 091	0.000 111	上调
lnc-NIPAL2-2	1.017 79	0.000 186	上调
lnc-HRH4-11	1.593 248	0.000 186	上调
lnc-ZMYM6NB-2	2.224 494	0.000 189	上调
lnc-TRA2B-2	1.333 532	0.000 195	上调
lnc-WNK1-4	2.782 025	0.000 211	上调
lnc-C12orf4-2	1.222 968	0.000 226	上调
lnc-RPS24-7	-2.682 63	0.000 000 556	下调
lnc-AL078585.1-14	-2.045 71	0.000 001 19	下调
lnc-PRKAA1-1	-2.280 28	0.000 002 82	下调
lnc-CYP26B1-4	-2.518 64	0.000 003 68	下调
lnc-COL9A1-2	-1.911 62	0.000 003 99	下调
lnc-USP12-7	-1.933 52	0.000 004 78	下调
lnc-C14orf39-2	-1.760 29	0.000 004 99	下调
lnc-CHM-7	-2.327 78	0.000 006 78	下调
lnc-C2orf43-5	-2.209	0.000 007 59	下调
lnc-RCOR3-1	-2.198 98	0.000 007 98	下调

注:FC为与对照组相比,实验组上调或下调的倍数。

六、差异表达长链非编码RNA靶基因的GO分析和KEGG分析

本研究对差异表达的lncRNA靶基因进行了基因本体GO功能富集分析。结果显示,EOLP组一共富集到668条BP术语,165条CC术语,114条MF术语,具有代表性的15条见表9。ROLP组一共富集到615条BP术语,126条CC术语,156条MF术语,具有代表性的15条见表10。

本研究对差异表达的lncRNA靶基因进行了KEGG信号通路富集分析。结果显示,EOLP组一共

表2 糜烂型口腔扁平苔藓(EOLP)组前10个表达上调和表达下调最显著的信使RNA

名称	log ₂ FC	P值	表达情况
FAM72A	1.477 287	0.000 107	上调
CLDN2	1.070 014	0.000 124	上调
SNORA79	1.844 52	0.000 334	上调
LOC101060385	2.476 236	0.000 341	上调
USP8	1.261 288	0.000 383	上调
MB	1.027 679	0.000 398	上调
DLD	1.003 385	0.000 441	上调
NARF	1.365 735	0.000 454	上调
PCDHB6	2.547 105	0.000 64	上调
RAD51AP1	1.710 067	0.000 797	上调
RPL11	-2.282 32	0.000 002 47	下调
ATP5PO	-1.747 77	0.000 003 24	下调
RPS12	-2.036 69	0.000 005 61	下调
RPS17	-1.718 66	0.000 022	下调
RPL8	-2.056 28	0.000 026	下调
RPL37A	-2.029 03	0.000 027 5	下调
NME2	-1.701 05	0.000 027 7	下调
VTRNA1-1	-2.335 26	0.000 032 4	下调
RPL27	-2.108 27	0.000 033 2	下调
RPS25	-2.299 16	0.000 033 3	下调

注:FC为与对照组相比,实验组上调或下调的倍数。

表3 网纹型口腔扁平苔藓(ROLP)组前10个表达上调和表达下调最显著的长链非编码RNA

名称	log ₂ FC	P值	类型
lnc-C1orf124-3	2.689 691	0.000 034 6	上调
lnc-NHS-2	1.988 245	0.000 059 3	上调
lnc-FAM160A1-3	1.233 302	0.000 108	上调
AC012451.1	3.555 147	0.000 154	上调
lnc-ZMYM6NB-2	2.584 77	0.000 179	上调
lnc-NIPAL2-2	1.143 354	0.000 24	上调
lnc-EVX1-2	1.503 094	0.000 273	上调
lnc-GEMIN4-4	2.109 394	0.000 275	上调
lnc-HRH4-11	1.658 174	0.000 479	上调
lnc-WNK1-4	2.913 166	0.000 51	上调
lnc-RPS24-7	-2.737 15	0.000 002 43	下调
lnc-TRIM52-3	-2.638 4	0.000 012 1	下调
lnc-USP12-7	-1.887 67	0.000 030 1	下调
lnc-PRKAA1-1	-2.122 5	0.000 030 7	下调
lnc-AL078585.1-14	-1.768 69	0.000 030 8	下调
lnc-RPL8-1	-2.753 47	0.000 040 2	下调
lnc-C2orf43-5	-2.147 78	0.000 048 1	下调
lnc-RCOR3-1	-2.135 04	0.000 051	下调
lnc-HSPB3-2	-1.738 52	0.000 054 7	下调
lnc-CHCHD7-5	-1.657 17	0.000 064 3	下调

注:FC为与对照组相比,实验组上调或下调的倍数。

富集到13条KEGG信号通路(表11),ROLP组一共富集到13条KEGG信号通路(表12)。

表4 网纹型口腔扁平苔藓(ROLP)组前10个表达上调和表达下调最显著的信使RNA

名称	log ₂ FC	P值	类型
PCDHB6	3.275 005	0.000 247	上调
APOBEC3F	1.230 784	0.000 418	上调
CDC42EP3	1.690 272	0.000 549	上调
RAD51AP1	1.991 531	0.000 742	上调
FAM72A	1.377 951	0.000 747	上调
ANPEP	1.258 585	0.000 945	上调
USP8	1.309 988	0.000 95	上调
COQ8A	1.112 517	0.001 204	上调
TMPRSS11E	1.551 159	0.001 896	上调
PIGZ	2.849 733	0.002 12	上调
RPL11	-2.420 35	0.000 006 55	下调
RPS12	-2.080 63	0.000 021 6	下调
ATP5PO	-1.578 31	0.000 047 6	下调
RPL37A	-2.064 13	0.000 1	下调
RPL19	-2.135 16	0.000 166	下调
NME2	-1.642 43	0.000 167	下调
RPS17	-1.580 37	0.000 216	下调
STATH	-3.625 61	0.000 251	下调
RPS25	-2.148 23	0.000 267	下调
RPL8	-1.830 63	0.000 334	下调

注:FC为与对照组相比,实验组上调或下调的倍数。

讨论

迄今OLP病因和发病机制未能明确,有研究表明由T淋巴细胞介导的局部免疫应答紊乱在OLP的发生、发展中发挥着重要作用,其中还可能涉及抗原呈递、T细胞活化和迁移以及角质形成细胞凋亡^[16]。外泌体与大多数疾病的发病机制密切相关,它们可作为疾病诊断、预后的生物标志物^[17],唾液外泌体分子水平浓度的改变可作为生物标志物预测和监测各种疾病,目前相关研究多集中于口腔癌症的早期诊断^[18-19]。近年有研究者采用miRNA微阵列芯片分析和qPCR技术比较OLP患者和健康对照者唾液外泌体的miRNA表达谱,验证了3个miRNA(miR-4484、miR-1246和miR-1290),其中miR-4484含量明显上调,提示可作为OLP潜在生物标志物^[20]。现阶段研究表明,lncRNA在多种细胞过程中发挥关键作用,包括免疫反应、肿瘤发生、细胞稳态及胚胎发育等^[21],Wang等^[22]报道lncRNA DQ786243可通过FoxP3-miR-146a-NF-κB轴调控CD4⁺ Treg细胞的诱导和功能,这为了解OLP病程进展提供了思路,为了更深入研究lncRNA在OLP病程中的作用机制,本课题组将提取的OLP患者唾液外泌体进行lncRNA基因芯片分析,并将获得的差异表达mRNA

表5 糜烂型口腔扁平苔藓(EOLP)组差异表达的信使RNA富集的GO生物学术语

GO 编码	术语	基因数量	P 值
BP			
GO:0002227	innate immune response in mucosa	2	0.007 98
GO:0061844	antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	3	0.008 08
GO:0002385	mucosal immune response	2	0.017 43
GO:0002251	organ or tissue specific immune response	2	0.020 28
GO:0002309	T cell proliferation involved in immune response	1	0.027 81
CC			
GO:0022626	cytosolic ribosome	37	< 1E-30
GO:0044391	ribosomal subunit	37	< 1E-30
GO:0044445	cytosolic part	38	< 1E-30
GO:0005840	ribosome	38	< 1E-30
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	24	< 1E-30
MF			
GO:0003735	structural constituent of ribosome	37	< 1E-30
GO:0005198	structural molecule activity	41	6.90E-29
GO:0003723	RNA binding	40	2.70E-13
GO:0019843	rRNA binding	9	1.10E-10
GO:1990948	ubiquitin ligase inhibitor activity	3	2.00E-06

表6 网纹型口腔扁平苔藓(ROLP)组差异表达的信使RNA富集的GO生物学术语

GO 编码	术语	基因数量	P 值
BP			
GO:0002252	immune effector process	11	0.011 87
GO:0002309	T cell proliferation involved in immune response	1	0.019 93
GO:0006613	cotranslational protein targeting to membrane	27	< 1E-30
GO:0045047	protein targeting to ER	27	< 1E-30
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	27	< 1E-30
CC			
GO:0022626	cytosolic ribosome	27	< 1E-30
GO:0044391	ribosomal subunit	27	< 1E-30
GO:0044445	cytosolic part	27	< 1E-30
GO:0005840	ribosome	27	< 1E-30
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	17	1.90E-27
MF			
GO:0003735	structural constituent of ribosome	27	< 1E-30
GO:0005198	structural molecule activity	30	2.70E-21
GO:0003723	RNA binding	33	9.10E-13
GO:0019843	rRNA binding	6	3.10E-07
GO:0003676	nucleic acid binding	38	2.20E-06

和lncRNA 靶基因进行了GO功能和KEGG信号通路富集分析。

LncRNA可作为内源竞争RNA(ceRNA)调控miRNA的表达从而来影响mRNA的表达^[23]。近年来,已证实lncRNA在疾病的发病机制中发挥重要作用,是潜在的分子标志物^[24-25]。因此,研究lncRNA在OLP诊断和治疗中的作用极为重要。然而,对文献的回顾显示迄今为止似乎还没有对OLP中的唾液外泌体lncRNA进行过研究。本研究发现,EOLP组

唾液外泌体中有267个lncRNA和122个mRNA表达差异有统计学意义;ROLP组唾液外泌体中有201个lncRNA和86个mRNA表达差异有统计学意义。韦恩图分析显示,EOLP组和ROLP组有50个相同的mRNA和128个相同的lncRNA差异有统计学意义。在这两组前10个表达上调和表达下调最显著的lncRNA中,有7个lncRNA在两组中的表达都显示上调,即lnc-NHS-2、lnc-ZMYM6NB-2、lnc-NIPAL2-2、lnc-EVX1-2、lnc-GEMIN4-4、lnc-HRH4-11和lnc-

表7 糜烂型口腔扁平苔藓(EOLP)组差异表达的信使RNA富集的KEGG信号通路

KEGG 编码	通路描述	基因数量	P 值
hsa03010	Ribosome	38	2.95E-46
hsa05171	Coronavirus disease-COVID-19	39	5.66E-41
hsa00190	Oxidative phosphorylation	6	0.001 512
hsa05415	Diabetic cardiomyopathy	7	0.002 755
hsa04714	Thermogenesis	7	0.005 736
hsa05012	Parkinson disease	7	0.011 763
hsa05020	Prion disease	7	0.013 427
hsa05208	Chemical carcinogenesis-reactive oxygen species	6	0.017 545
hsa05016	Huntington disease	7	0.023 609
hsa00062	Fatty acid elongation	2	0.025 96
hsa01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2	0.025 96
hsa00020	Citrate cycle(TCA cycle)	2	0.031 602
hsa04260	Cardiac muscle contraction	3	0.047 424

表8 网纹型口腔扁平苔藓(ROLP)组差异表达的信使RNA富集的KEGG信号通路

KEGG 编码	通路描述	基因数量	P 值
hsa03010	Ribosome	27	2.75E-32
hsa05171	Coronavirus disease-COVID-19	28	3.99E-29
hsa05415	Diabetic cardiomyopathy	5	0.012 509
hsa00190	Oxidative phosphorylation	4	0.013 311
hsa05208	Chemical carcinogenesis-reactive oxygen species	5	0.018 129
hsa04714	Thermogenesis	5	0.021 131
hsa04640	Hematopoietic cell lineage	3	0.030 385
hsa05012	Parkinson disease	5	0.035 35
hsa05020	Prion disease	5	0.038 87

表9 糜烂型口腔扁平苔藓(EOLP)组差异表达的长链非编码RNA靶基因富集的GO生物学术语

GO 编码	术语	基因数量	P 值
BP			
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	71	< 1E-30
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	66	< 1E-30
GO:0006613	cotranslational protein targeting to membrane	67	< 1E-30
GO:0045047	protein targeting to ER	67	< 1E-30
GO:0072599	establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	68	< 1E-30
CC			
GO:0022626	cytosolic ribosome	68	< 1E-30
GO:0044445	cytosolic part	83	< 1E-30
GO:0044391	ribosomal subunit	70	< 1E-30
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	41	< 1E-30
GO:0005840	ribosome	73	6.00E-28
MF			
GO:0003735	structural constituent of ribosome	70	< 1E-30
GO:0005198	structural molecule activity	104	4.00E-13
GO:0019843	rRNA binding	18	5.20E-08
GO:0005488	binding	1030	1.40E-05
GO:0003723	RNA binding	170	2.00E-05

表 10 网纹型口腔扁平苔藓(ROLP)组差异表达的长链非编码RNA靶基因富集的GO生物学术语

GO 编码	术语	基因数量	P 值
BP			
GO:0000184	nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	63	< 1E-30
GO:0006614	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	59	< 1E-30
GO:0006613	cotranslational protein targeting to membrane	59	< 1E-30
GO:0072599	establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	60	< 1E-30
GO:0045047	protein targeting to ER	59	< 1E-30
CC			
GO:0022626	cytosolic ribosome	61	< 1E-30
GO:0044391	ribosomal subunit	62	< 1E-30
GO:0044445	cytosolic part	68	< 1E-30
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit	38	< 1E-30
GO:0005840	ribosome	65	< 1E-30
MF			
GO:0003735	structural constituent of ribosome	60	< 1E-30
GO:0005198	structural molecule activity	82	1.70E-13
GO:0019843	rRNA binding	16	1.10E-08
GO:0003723	RNA binding	131	7.90E-07
GO:0003676	nucleic acid binding	245	1.30E-05

表 11 糜烂型口腔扁平苔藓(EOLP)组差异表达的长链非编码RNA靶基因富集的KEGG信号通路

KEGG 编码	通路描述	基因数量	P 值
hsa03010	Ribosome	70	4.02E-40
hsa05171	Coronavirus disease-COVID-19	79	2.44E-35
hsa00190	Oxidative phosphorylation	25	4.30E-06
hsa04714	Thermogenesis	33	5.63E-05
hsa05020	Prion disease	37	5.84E-05
hsa05012	Parkinson disease	36	7.57E-05
hsa05010	Alzheimer disease	44	0.000 604
hsa05415	Diabetic cardiomyopathy	26	0.001 679
hsa05016	Huntington disease	35	0.002 214
hsa05208	Chemical carcinogenesis-reactive oxygen species	27	0.003 122
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease	18	0.021 17
hsa05022	Pathways of neurodegeneration-multiple diseases	44	0.029 292
hsa04260	Cardiac muscle contraction	11	0.037 364

WNK1-4;有6个lncRNA在两组中的表达都显示下调,即lnc-RPS24-7、lnc-USP12-7、lnc-PRKAA1-1、lnc-AL078585.1-14、lnc-C2orf43-5和lnc-RCOR3-1。这些表达异常的lncRNA目前并未有其功能研究的文献,其功能有待进一步研究,本文为此提供了一定的基础。在EOLP和ROLP两组前10个表达上调和表达下调最显著的mRNA中,有4个mRNA在两组中的表达都显示上调,即PCDHB6、RAD51AP1、FAM72A和USP8;有8个mRNA在两组中的表达均显示下调,即RPL11、ATP5PO、RPS12、RPS17、RPL8、RPL37A、NME2和RPS25。研究显示,RAD51AP1的表达上调能够诱导癌症的发展与转移,如非小细胞肺癌和卵巢癌^[26-28];USP8在胆管癌的进展中发挥致癌作用^[29]。

有文献报道,NME2能够抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭以限制转移^[30];RPL11在多种癌症发生、发展中起调控作用,如RPL11可以结合并抑制MDM2泛素连接酶,从而促进p53稳定性,可充当肿瘤抑制因子^[31]。本研究显示,在EOLP组和ROLP组中RAD51AP1、USP8的表达均上调,推测RAD51AP1、USP8基因在OLP发展中也具有促进作用,很可能诱导OLP发展成为OSCC;在EOLP组和ROLP组中NME2和RPL11的表达均下调,推测NME2和RPL11的下调很可能导致肿瘤的发生,从而促使OLP发展为OSCC。

OLP的发病机制和病因尚未完全了解,Giannetti等^[32]报道诱发OLP最主要的因素有:T细胞介导的免疫反应,HLA-DR2主导的遗传因素和感染(与病

表 12 网纹型口腔扁平苔藓(ROLP)组差异表达的长链非编码 RNA 靶基因富集的KEGG 信号通路

KEGG 编码	通路描述	基因数量	P 值
hsa03010	Ribosome	61	3.81E-40
hsa05171	Coronavirus disease-COVID-19	68	6.66E-36
hsa00190	Oxidative phosphorylation	18	7.48E-05
hsa05020	Prion disease	25	0.001 561
hsa04714	Thermogenesis	21	0.004 149
hsa05012	Parkinson disease	22	0.009 678
hsa05415	Diabetic cardiomyopathy	17	0.019 226
hsa04614	Renin-angiotensin system	4	0.023 061
hsa05010	Alzheimer disease	27	0.031 991
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease	13	0.037 294
hsa05016	Huntington disease	22	0.040 501
hsa05202	Transcriptional misregulation in cancer	15	0.047 188
hsa04392	Hippo signaling pathway-multiple species	4	0.049 35

病毒性丙型肝炎相关,OLP中口腔微生物群的差异以及细菌内化浸润T细胞和口腔上皮细胞)。多项研究表明,免疫反应,特别是T细胞介导的细胞免疫,是导致OLP发病最主要的机制^[33],自身免疫反应以及体液免疫是被认为与OLP相关的机制^[34]。本研究对差异表达mRNA进行GO功能富集分析,结果显示,在EOLP组中,生物过程富集有408条,细胞组分富集93条,分子功能有95条;在ROLP组中,生物过程富集有305条,细胞组分富集80条,分子功能有60条。同时对差异表达的lncRNA靶基因也进行了基因本体GO功能富集分析,结果显示,在EOLP组中,生物过程富集有668条,细胞组分富集165条,分子功能有114条;ROLP组生物过程富集有615条,细胞组分富集126条,分子功能有156条。这些功能涉及到免疫、蛋白翻译和基因转录等过程,如:黏膜的固有免疫反应、由抗菌肽介导的抗菌体液免疫反应、黏膜免疫反应、器官或组织特异性免疫反应、涉及免疫反应的T细胞增殖等。由此可见,这些差异基因可能通过调节基因转录、蛋白翻译和免疫反应等环节来参与OLP的发生与发展,以及恶化等过程。此外,本研究对差异表达mRNA进行KEGG信号通路富集分析,结果显示,EOLP组一共富集到13条KEGG信号通路,ROLP组一共富集到9条KEGG信号通路。同时对差异表达的lncRNA靶基因进行了KEGG信号通路富集分析。结果显示,EOLP组和ROLP组都富集到13条KEGG信号通路。这些信号通路与蛋白翻译、能量代谢、致癌作用、传染病等相关。因此,这些差异基因很有可能通过以上通路参与OLP的恶性病变。

综上所述,本研究借助lncRNA基因芯片技术研究显示OLP患者唾液外泌体lncRNA和mRNA表达谱发生了显著变化,差异表达的基因涉及基因转录、蛋白翻译和免疫反应等多个生物学过程。这些基因及通路组成复杂的调控网络参与OLP的发生和发展过程,可作为诊断和阐明OLP发病机制的重要候选者。在后续研究中,可扩大样本进一步研究证实结论的可靠性并筛选出在OLP中具有进一步研究价值的lncRNA或mRNA,或通过细胞动物实验进行进一步的基因功能验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Tampa M, Caruntu C, Mitran M, et al. Markers of oral lichen planus malignant transformation [J]. Dis Markers, 2018, 2018: 1959506. DOI: 10.1155/2018/1959506.
- [2] González-Moles MÁ, Warnakulasuriya S, González-Ruiz I, et al. Worldwide prevalence of oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis [J]. Oral Dis, 2021, 27(4): 813-828. DOI: 10.1111/odi.13323.
- [3] Ghazi N, Khorasanchi M. Markers associated with malignant transformation of oral lichen planus: A review article [J]. Arch Oral Biol, 2021, 127: 105158. DOI: 10.1016/j.archorallbio.2021.105158.
- [4] Gupta S, Jawanda MK. Oral lichen planus: An update on etiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and management [J]. Indian J Dermatol, 2015, 60(3): 222-229. DOI: 10.4103/0019-5154.156315.
- [5] Chiang CP, Chang JYF, Wang YP, et al. Oral lichen planus—Differential diagnoses, serum autoantibodies, hematitic deficiencies, and management [J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(9): 756-765. DOI: 10.1016/j.jfma.2018.01.021.
- [6] Nosratchi T. Oral lichen planus: An overview of potential risk

- factors, biomarkers and treatments[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(5): 1161-1167. DOI:10.22034/APJCP.2018.19.5.1161.
- [7] Han Y, Jia L, Zheng Y, et al. Salivary exosomes: Emerging roles in systemic disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(6): 633-643. DOI:10.7150/ijbs.25018.
- [8] Cheshmi B, Cheshomi H. Salivary exosomes: Properties, medical applications, and isolation methods [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(8):6295-6307. DOI:10.1007/s11033-020-05659-1.
- [9] Kowalczyk MS, Higgs DR, Gingeras TR. Molecular biology: RNA discrimination [J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 310-311. DOI: 10.1038/482310a.
- [10] Caley DP, Pink RC, Trujillano D, et al. Long noncoding RNAs, chromatin, and development [J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10:90-102. DOI:10.1100/tsw.2010.7.
- [11] Bridges MC, Daulagala AC, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(2): e202009045. DOI:10.1083/jcb.202009045.
- [12] Aune TM, Spurlock CF 3rd. Long non-coding RNAs in innate and adaptive immunity [J]. *Virus Res*, 2016, 212: 146-160. DOI:10.1016/j.virusres.2015.07.003.
- [13] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.
- [14] Alexa A, Rahnenfuhrer J, Depends R, et al. topGO: Enrichment analysis for gene ontology. Version 2.10.0[EB/OL]. [2010-10-01]. [2022-08-24]. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.304.1691&rep=rep1&type=pdf>.
- [15] Yu G, Wang LG, Han Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5):284-287. DOI:10.1089/omi.2011.0118.
- [16] Zhou G, Zhang J, Ren XW, et al. Increased B7-H1 expression on peripheral blood T cells in oral lichen planus correlated with disease severity [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(4): 794-801. DOI:10.1007/s10875-012-9683-2.
- [17] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804. DOI: 10.7150/thno.18133.
- [18] Deng Y, Cao Y, Wang L, et al. The role and application of salivary exosomes in malignant neoplasms [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13:5813-5820. DOI:10.2147/CMAR.S321225.
- [19] Zhan C, Yang X, Yin X, et al. Exosomes and other extracellular vesicles in oral and salivary gland cancers [J]. *Oral Dis*, 2020, 26(5):865-875. DOI:10.1111/odi.13172.
- [20] Byun JS, Hong SH, Choi JK, et al. Diagnostic profiling of salivary exosomal microRNAs in oral lichen planus patients [J]. *Oral Dis*, 2015, 21(8):987-993. DOI:10.1111/odi.12374.
- [21] Chen Y, Li Z, Chen X, et al. Long non-coding RNAs: From disease code to drug role [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(2): 340-354. DOI:10.1016/j.apsb.2020.10.001.
- [22] Wang J, Zhai X, Guo J, et al. Long non-coding RNA DQ786243 modulates the induction and function of CD4⁺ Treg cells through Foxp3-miR-146a-NF- κ B axis: Implications for alleviating oral lichen planus [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105761. DOI:10.1016/j.intimp.2019.105761.
- [23] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, et al. A ceRNA hypothesis: The Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. *Cell*, 2011, 146(3):353-358. DOI:10.1016/j.cell.2011.07.014.
- [24] Wang L, Cho KB, Li Y, et al. Long noncoding RNA (lncRNA)-mediated competing endogenous RNA networks provide novel potential biomarkers and therapeutic targets for colorectal cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5758. DOI: 10.3390/ijms20225758.
- [25] Giraldez MD, Spengler RM, Etheridge A, et al. Phospho-RNA-seq: A modified small RNA-seq method that reveals circulating mRNA and lncRNA fragments as potential biomarkers in human plasma [J]. *EMBO J*, 2019, 38(11): e101695. DOI: 10.15252/emboj.2019101695.
- [26] Zhao H, Gao Y, Chen Q, et al. RAD51AP1 promotes progression of ovarian cancer via TGF- β /Smad signalling pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4):1927-1938. DOI:10.1111/jcmm.15877.
- [27] Wang H, Dong H, Qiao L, et al. ZEB1 induces non-small cell lung cancer development by targeting microRNA - 320a to increase the expression of RAD51AP1 [J]. *Exp Cell Res*, 2021, 405(2):112687. DOI:10.1016/j.yexcr.2021.112687.
- [28] Wu Y, Wang H, Qiao L, et al. Silencing of RAD51AP1 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis in non-small cell lung cancer [J]. *Thorac Cancer*, 2019, 10(9): 1748-1763. DOI:10.1111/1759-7714.13124.
- [29] Jing X, Chen Y, Chen Y, et al. Down-regulation of USP8 inhibits cholangiocarcinoma cell proliferation and invasion [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:2185-2194. DOI:10.2147/CMAR.S234586.
- [30] Liu YF, Yang A, Liu W, et al. NME2 reduces proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells to limit metastasis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0115968. DOI: 10.1371/journal.pone.0115968.
- [31] Kayama K, Watanabe S, Takafuji T, et al. GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11 - MDM2 pathway and promotes tumorigenesis [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(1): 123-137. DOI: 10.15252/embr.201642444.
- [32] Giannetti L, Dello Diago AM, Spinasi E. Oral lichen planus [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(2):391-395.
- [33] Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, et al. Pathogenesis of oral lichen planus: A review [J]. *J Oral Pathol Med*, 2010, 39(10): 729-734. DOI: 10.1111/j.1600-0714.2010.00946.x.
- [34] Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: A longitudinal cohort study [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2011, 112(3):328-334. DOI:10.1016/j.tripleo.2011.04.009.

(收稿日期:2022-05-20)

(本文编辑:王嫚)