

本文引用:王宗康,谭怡丝,覃一杰,周领航,肖艳波,胡兆勇,谭劲. 加味丹玄口康通过 Axin1 调节口腔上皮损伤细胞增殖活性[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(12):2008-2015.

加味丹玄口康通过 Axin1 调节口腔上皮损伤细胞增殖活性

王宗康¹,谭怡丝¹,覃一杰¹,周领航¹,肖艳波¹,胡兆勇²,谭劲^{1*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

〔摘要〕目的 探究加味丹玄口康(DXKK)对口腔上皮损伤细胞增殖活性的影响及轴抑制蛋白1(axis inhibition protein 1, Axin1)的作用。方法 选取不同干扰位点的 Axin1 干扰小 RNA-1(small interfering RNA-1, siRNA-1)、Axin1 siRNA-2 和 Axin1 siRNA-3 干预口腔上皮细胞,qRT-PCR 检测 Axin1 的基因表达水平来筛选 Axin1 的有效干扰靶点。将细胞随机分为空白对照组、干扰对照组、Axin1 干扰组、过表达对照组和 Axin1 过表达组,采用 qRT-PCR 检测 Axin1 mRNA 的表达水平,采用细胞计数试剂盒和平板克隆检测细胞增殖情况,采用流式分析检测细胞周期水平,采用 Western blot 检测 Axin1、 β -catenin、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Bax、Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 蛋白的表达。采用氢溴酸槟榔碱(arecoline hydrobromide, AH)诱导口腔上皮细胞损伤模型,将口腔上皮细胞随机分为空白对照组、AH 刺激组(50 μ g/mL)、空白血清干预组(10%空白血清+50 μ g/mL AH)、含 DXKK 血清干预组(10%含 DXKK 血清+50 μ g/mL AH)、含 DXKK 血清干预+Axin1 过表达组(10%含 DXKK 血清+Axin1 过表达质粒+50 μ g/mL AH),EdU 染色检测口腔上皮细胞的增殖活性。结果 与干扰对照组比较,Axin1 干扰-1 组、Axin1 干扰-2 组和 Axin1 干扰-3 组 Axin1 的基因表达水平均显著降低($P<0.01$);Axin1 干扰组细胞增殖活性和 β -catenin、PCNA、Bcl-2 蛋白表达均显著升高($P<0.01$),Axin1、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白和 Axin1 mRNA 的表达均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与过表达对照组相比,Axin1 过表达组处于 G1 期的细胞比例、细胞增殖活性和 β -catenin、PCNA、Bcl-2 蛋白表达均显著降低($P<0.01$),处于 S 期的细胞比例和 Axin1、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白及 Axin1 mRNA 的表达均显著升高($P<0.01$)。与空白对照组比较,AH 刺激组 Axin1 蛋白表达显著增加($P<0.01$),细胞增殖活性显著降低($P<0.01$)。与空白血清干预组比较,含 DXKK 血清干预组 Axin1 蛋白表达需显著降低($P<0.01$),细胞增殖活性显著升高($P<0.01$)。与含 DXKK 血清干预组比较,含 DXKK 血清干预+Axin1 过表达组细胞增殖活性显著降低($P<0.05$)。结论 Axin1 可调控口腔上皮细胞增殖活性。DXKK 通过抑制 Axin1 信号,促进 AH 诱导的口腔上皮细胞增殖。

〔关键词〕 口腔黏膜下纤维化;Axin1;加味丹玄口康;口腔上皮细胞;氢溴酸槟榔碱

〔中图分类号〕R276.8

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.12.009

Jiawei Danxuan Koukang regulates the proliferation activity of oral epithelial injured cells via Axin1

WANG Zongkang¹, TAN Yisi¹, QIN Yijie¹, ZHOU Linghang¹, XIAO Yanbo¹, HU Zhaoyong², TAN Jin^{1*}

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective We aimed to explore the effects of Jiawei Danxuan Koukang (JWDXKK) on the proliferation activity of oral epithelial injured cells and the role of axis inhibition protein 1 (Axin1). Methods Axin1 small interfering RNA-1 (Axin1 siRNA-1), Axin1 small interfering RNA-2 (Axin1 siRNA-2), and Axin1 small interfering RNA-3 (Axin1 siRNA-3) from different

〔收稿日期〕2022-04-03

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81874496)。

〔第一作者〕王宗康,男,硕士研究生,研究方向:口腔黏膜病防治研究。

〔通信作者〕* 谭劲,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:tanjinhn@aliyun.com。

interfering positions were selected to interfere with oral epithelial cells, and the expression of Axin1 was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to screen the effective interference targets of Axin1. The cells were divided into the following groups: blank control group, si-NC group, si-Axin1 group, over-expressed control group, and over-expressed Axin1 group. The Axin1 mRNA levels were detected by qRT-PCR. Cell counting kit-8 and plate clone formation assay were applied to examine the cell proliferative activity. Cell cycle levels were detected by flow analysis. The protein expression levels of Axin1, β -catenin, PCNA, Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 were identified by Western blot. The oral epithelial cell injury model was induced by arecoline hydrobromide (AH). Oral epithelial cells were then divided into: blank control group, AH group (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AH), blank group (10% blank serum + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AH), JWDXKK group (10% JWDXKK serum + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AH), and a JWDXKK + over-expressed Axin1 group (10% JWDXKK serum + over-expressed Axin1 + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AH). EdU incorporation assay was performed to examine the proliferative activity. **Results** Compared with the si-NC group, Axin1 gene expression in si-Axin1-1, si-Axin1-2, and si-Axin1-3 groups significantly decreased ($P<0.01$). Cell proliferation activity of Axin1 group cells and the protein levels of β -catenin, PCNA, and Bcl-2 increased in the si-Axin1 group ($P<0.01$), while the protein expression of Axin1, Bax, and cleaved Caspase-3 and Axin1 mRNA levels significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the over-expressed control group, the proportion of cells in G1 phase, cell proliferation activity, and protein expression of β -catenin, PCNA, and Bcl-2 significantly decreased in over-expressed Axin1 group ($P<0.01$). The proportion of cells in S phase and the Axin1, Bax, cleaved Caspase-3 protein, and Axin1 mRNA expression significantly increased ($P<0.01$). Compared with the blank control group, Axin1 protein expression increased in AH stimulated group ($P<0.01$), and the proliferation activity was significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the blank group, the Axin1 protein expression decreased in JWDXKK group ($P<0.01$), and the proliferation activity increased ($P<0.01$). Compared with the JWDXKK group, the proliferation activity decreased in the JWDXKK + over-expressed Axin1 group ($P<0.05$). **Conclusion** Axin1 could regulate the proliferative activity of oral epithelial cells. JWDXKK could promote the proliferation of oral epithelial cells with AH induction, possibly by inhibiting Axin1 signaling.

[**Keywords**] oral submucous fibrosis; Axin1; Jiawei Danxuan Koukang; oral epithelial cells; arecoline hydrobromide

口腔黏膜下纤维化(oral submucosal fibrosis, OSF)是一种常见的口腔癌前病变。7%~30%的 OSF 患者可能患上口腔鳞状细胞癌^[1-2]。OSF 常发生于颊黏膜、磨牙后区和软腭部位^[2-3]。其主要症状包括口干、疼痛、舌头活动受限、吞咽困难和活动性改变^[3]。除了口腔,OSF 病变甚至涉及咽部和食管,严重影响患者的生活质量。调查研究表明,OSF 患者的患癌风险高于非 OSF 患者^[4],且 OSF 的患病率正逐年增加^[5]。目前,OSF 的治疗主要包括药物治疗、张口锻炼和手术。对于在晚期结束手术的 OSF 患者,术后仍需使用药物辅助治疗^[6]。口腔锻炼因其低成本、方便和无创等优点,是患者最容易接受的治疗手段^[7]。但其治疗效果有限,需要患者自我控制。因此,寻找高效、价廉且方便的治疗药物已迫在眉睫。

加味丹玄口康(DXKK)颗粒由丹参、玄参、当归、红花、生地黄、白花蛇舌草、夏枯草、生黄芪、薄荷、白芍、茵陈、桔梗组成。前期研究表明,DXKK 对 OSF 的发生与发展有抑制作用^[8]。轴抑制蛋白 1(axis inhibition protein 1, Axin1),分子量约 95.6 kDa,是 Wnt 信号通路的重要支架蛋白,且可通过 β -catenin 信号调节细胞的增殖活性^[9-10]。Wnt 信号通路与口腔

癌病变显著相关^[11]。在口腔癌临床样本中,Axin1 基因常发生突变^[12]。Axin1 可能作为口腔癌的突变靶点,参与口腔癌的发生和发展。然而,Axin1 在口腔癌前病变 OSF 中的作用尚不明确。本研究通过探究 DXKK 对口腔上皮损伤细胞增殖活性的影响及 Axin1 的作用,旨在为 DXKK 的临床治疗应用提供数据支持。

1 材料

1.1 细胞株

人口腔上皮细胞(批号:CP-H203)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和饱和湿度的环境条件下,细胞培养于人口腔上皮细胞完全培养基中。

1.2 实验动物

10 只健康的 SD 雄性大鼠,体质量(200 \pm 20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004。在自由采食、(24 \pm 3) $^{\circ}\text{C}$ 、45%~50%湿度和 SPF 条件下适应性饲养 1 周后,进行药物干预处理。本研究经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准通过,审批号:LLBH-202103100002。

1.3 主要药物与试剂

DXKK 三九颗粒制剂;丹参 10 g(批号:2017003C),

玄参 10 g(批号:2108005C),当归 10 g(批号:2106029C),红花 5 g(批号:2103003C),生地黄 10 g(批号:2108020S),白花蛇舌草 10 g(批号:2101001S),夏枯草 10 g(批号:2109004S),生黄芪 10 g(批号:2102003C),薄荷 10 g(批号:2102001C),白芍 10 g(批号:2105009S),茵陈 10 g(批号:2108001C),桔梗 10 g(批号:2107001S),购自湖南中医药大学第一附属医院门诊三九智能颗粒中药房。

氢溴酸槟榔碱(arecoline hydrobromide, AH,批号:300-08-3,成都德思特生物技术有限公司);人口腔上皮细胞完全培养基(批号:CM-H203,武汉普诺赛生命科技有限公司);过表达对照质粒(批号:2021062301)、Axin1 过表达质粒(批号:2021062302)、干扰小 RNA(small interfering RNA, siRNA)阴性对照(批号:2021062308)、Axin1 siRNA-(1-3)(批号:2021062309)、RIPA 裂解液(批号:01E220303)、脱脂奶粉(批号:12C211125)均购自长沙艾碧维生物科技有限公司;Lip 2000(批号:11668019)、Trizol(批号:343912)均购自赛默飞世尔科技有限公司;互补 DNA 合成试剂盒(批号:26621,北京康为世纪生物技术有限公司);Axin1(批号:BA04288597,北京博奥森生物技术有限公司); β -catenin(批号:00048568)、Bax(批号:00039968)、Bcl-2(批号:00011619)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA,批号:00086617)、 β -actin(批号:10011066)、辣根过氧化酶羊抗鼠 IgG(批号:20000002)、辣根过氧化酶羊抗兔 IgG(批号:20000003)购自美国 Proteintech 公司;Caspase-3(批号:45,美国 CST 公司);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8,批号:NU679,日本同仁化学研究所);4%多聚甲醛(批号:N1012,苏州新赛美生物科技有限公司);结晶紫(批号:G1062,北京索莱宝科技有限公司);碘化丙啶(批号:MB2920,大连美仑生物技术有限公司);EdU 检测试剂盒(批号:U0618,广州瑞博生物医药科技有限公司)。

1.4 主要仪器

倒置生物显微镜(型号:DSZ2000X,北京中显恒业仪器仪表有限公司);台式冷冻离心机(型号:H1650R,长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司);荧光定量 PCR 仪(批号:A51685,赛默飞世尔科技有限公司);电泳仪(型号:DYY-6C,北京六一生物科技有限公司);多功能酶标分析仪(型号:MB-530,深圳市汇松科技发展有限公司);流式细胞仪(型号:A00-1-1102,美国贝克曼库尔特有限公司)。

2 方法

2.1 质粒转染与分组

为筛选高效抑制靶点,将口腔上皮细胞随机分组为:空白对照组、干扰对照组(转染 siRNA 阴性对照)、Axin1 干扰-1 组(转染 Axin1 siRNA-1)、Axin1 干扰-2 组(转染 Axin1 siRNA-2)、Axin1 干扰-3 组(转染 Axin1 siRNA-3)。siRNA 阴性对照、Axin1 siRNA-1、Axin1 siRNA-2 和 Axin1 siRNA-3 通过 Lip 2000 转染至上皮细胞。在 37 °C 培养 24 h 后,通过 qRT-PCR 检测 Axin1 的基因表达水平。

为鉴定 Axin1 对细胞增殖活性的影响,将对数期生长的细胞随机分组为:空白对照组、干扰对照组、Axin1 干扰组、过表达对照组、Axin1 过表达组。siRNA 阴性对照、Axin1 siRNA、过表达对照质粒或 Axin1 过表达质粒通过 Lip 2000 转染至上皮细胞。24 h 后,进行其他实验分析。

2.2 qRT-PCR 检测 Axin1 的基因和 mRNA 的表达水平

采用 Trizol 法提取细胞中的总 RNA。采用 20 μ L 反应体系,根据 HiFiScript 互补 DNA 合成试剂盒说明书合成互补 DNA。以互补 DNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 检测各组细胞中的 Axin1 的基因表达水平。其中,实时定量 PCR 采用 30 μ L 体系,40 个循环。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 被用来计算 RNA 表达量。Axin1 采用 β -actin 作为内参。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

目的基因	正向引物	反向引物	长度/bp
Axin1	CTACCTCACATTCGCCGCAC	CTCCTCCGCGAAGTCTCTGAG	72
β -actin	ACCCTGAAGTACCCCATCGAG	AGCACAGCCTGGATAGCAAC	224

2.3 Western blot 检测蛋白表达

采用 RIPA 裂解液提取细胞中的总蛋白。在恒压 75 V 条件下进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。在恒流 300 mA 的条件下,蛋白被转移到硝酸纤维素膜上。采用 5% 脱脂牛奶封闭,4 °C 过夜。Axin1 (1:1000)、 β -catenin (1:5000)、PCNA (1:3000)、Bax (1:6000)、Bcl-2 (1:3000)、Caspase-3 (1:1000) 和 β -actin (1:5000) 室温孵育 90 min,磷酸缓冲液清洗。辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG (1:5000) 和辣根过氧化物酶羊抗兔 IgG (1:6000) 室温孵育 60 min。清洗后加电化学发光显色液显色。Quantity One 软件分析各条带的吸光度值。

2.4 CCK-8 分析细胞活性

取在 96 孔板中培养好的细胞,去除含药培养基每孔加入 100 μ L 含有 CCK-8 的培养基。其中,以 10 μ L/孔的量,提前用完全培养基配制含 CCK-8 的培养基。继续孵育 4 h 后,采用 Bio-Tek 酶标仪分析 450 nm 下的吸光度值。

2.5 平板克隆鉴定细胞增殖能力

将各组培养好的细胞用 0.25% 胰酶消化液消化并制成细胞悬液,调整细胞密度约为 1×10^5 个/mL。每组各取 200 个/mL 细胞接种于 6 孔板,37 °C、5% CO₂ 的培养箱中,每 3 d 换液 1 次,培养约 3 周。将培养好的细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min。0.5% 结晶紫染色 5 min 后,用清水洗 3 遍。相机拍照后,用酶标仪测定 550 nm 下的吸光度值。

2.6 流式细胞术分析细胞周期

取出培养好的细胞,加入低温 PBS 漂洗细胞并使细胞重悬。加入 1.2 mL 预冷的乙醇后,4 °C 放置过夜。采用 PBS 去除乙醇。在 4 °C 避光环境下,150 μ L 碘化丙啶工作液染色 30 min。流式细胞仪测定各细胞周期的百分率。

2.7 含药血清制备与分组

2.7.1 含药血清制备 如前期研究所述^[13],制备含 DXKK 血清。SD 雄性大鼠被随机分为空白对照组和 DXKK 处理组,每组 5 只。DXKK 组的大鼠以组方 12 g/kg (按大鼠与人的体表面积换算公式^[14]计算,相当 70 kg 成人剂量的 3 倍)进行灌胃给药,持续 1 周。空白对照组的大鼠以生理盐水进行灌胃,持续 1

周。经腹腔麻醉后,在无菌条件下对大鼠进行腹主动脉采血。血液室温静置 2 h 后,进行离心、灭活和除菌。分装后置于 -20 °C 的冰箱中冻存。

2.7.2 细胞分组与处理 取对数期生长的细胞,随机分组为:空白对照组、AH 刺激组、空白血清干预组 (AH 刺激+空白血清)、含 DXKK 血清干预组 (AH 刺激+含 DXKK 血清)、含 DXKK 血清干预+Axin1 过表达组。细胞通过 AH (50 μ g/mL)、空白血清或含 DXKK 血清干预 48 h 后,再进行其他实验检测。其中,血清 (空白血清或含 DXKK 血清) 与口腔上皮细胞完全培养基按体积 1:9 的比例被配制含 10% 含药血清。含 DXKK 血清干预+Axin1 过表达组的细胞在转染 Axin1 过表达质粒后进行 AH 和 DXKK 干预。空白对照组不做任何处理。

2.8 EdU 细胞增殖活性分析

取对数期生长的细胞,加入提前制备好的 50 μ mol EdU 培养基,37 °C 孵育过夜。弃培养基,PBS 清洗 2 次。采用 50 μ L 4% 多聚甲醛固定细胞。Apollo 染色液和 Hoechst 33342 染色液分别在室温、避光条件下孵育 30 min 染色后,PBS 清洗 2 次。采用显微镜观察和拍照。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8.0.1 进行统计分析。实验结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。采用 *One-way ANOVA* 和 *Two-way ANOVA* 分析多组间的数据。以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 筛选 Axin1 的干扰靶点

与干扰对照组比较,Axin1 干扰-1 组、Axin1 干扰-2 组和 Axin1 干扰-3 组 Axin1 的基因表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。其中,Axin1 干扰-2 组的抑制效果最明显。因此,选择 Axin1 siRNA-2 进行后续实验。干扰对照组 Axin1 的基因表达水平与空白对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 1。

3.2 调控 Axin1 影响口腔上皮细胞增殖活性

与干扰对照组比较,Axin1 干扰组 Axin1 mRNA 的表达水平显著下降 ($P < 0.01$)。与过表达对照组比较,Axin1 过表达组 Axin1 mRNA 的表达水平显著

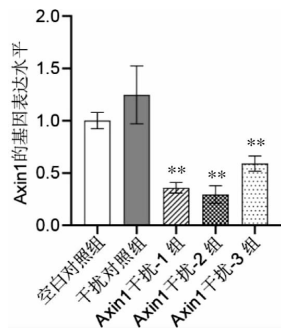


图 1 Axin1 干扰靶点的筛选
注:与干扰对照组比较,** $P < 0.01$ 。

升高($P < 0.01$)。空白对照组、过表达对照组和干扰对照组间 Axin1 mRNA 的表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与干扰对照组比较,Axin1 干扰组细胞增殖活性显著升高($P < 0.01$)。与过表达对照组比较,Axin1 过表达组细胞增殖活性显著降低($P < 0.01$)。详见图 2。

3.3 Axin1 影响增殖、凋亡相关蛋白的表达

与干扰对照组比较,Axin1 干扰组 Axin1、Bax、

cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), β -catenin、PCNA、Bcl-2 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与过表达对照组比较,Axin1 过表达组 Axin1、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著升高($P < 0.01$), β -catenin、PCNA、Bcl-2 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。详见图 3、表 2。

3.4 过表达 Axin1 促进 G1/S 期细胞周期阻滞

与过表达对照组比较,Axin1 过表达组处于 G1 期的细胞比例显著降低($P < 0.01$),处于 S 期的细胞比例显著升高($P < 0.01$)。详见图 4。

3.5 DXKK 调控 Axin1 影响口腔上皮细胞增殖活性

与空白对照组比较,AH 刺激组 Axin1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),细胞增殖活性显著降低($P < 0.01$)。与空白血清干预组比较,含 DXKK 血清干预组 Axin1 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),细胞增殖活性显著升高($P < 0.01$)。与含 DXKK 血清干预组比较,含 DXKK 血清干预+Axin1 过表达组 Axin1 蛋白表达

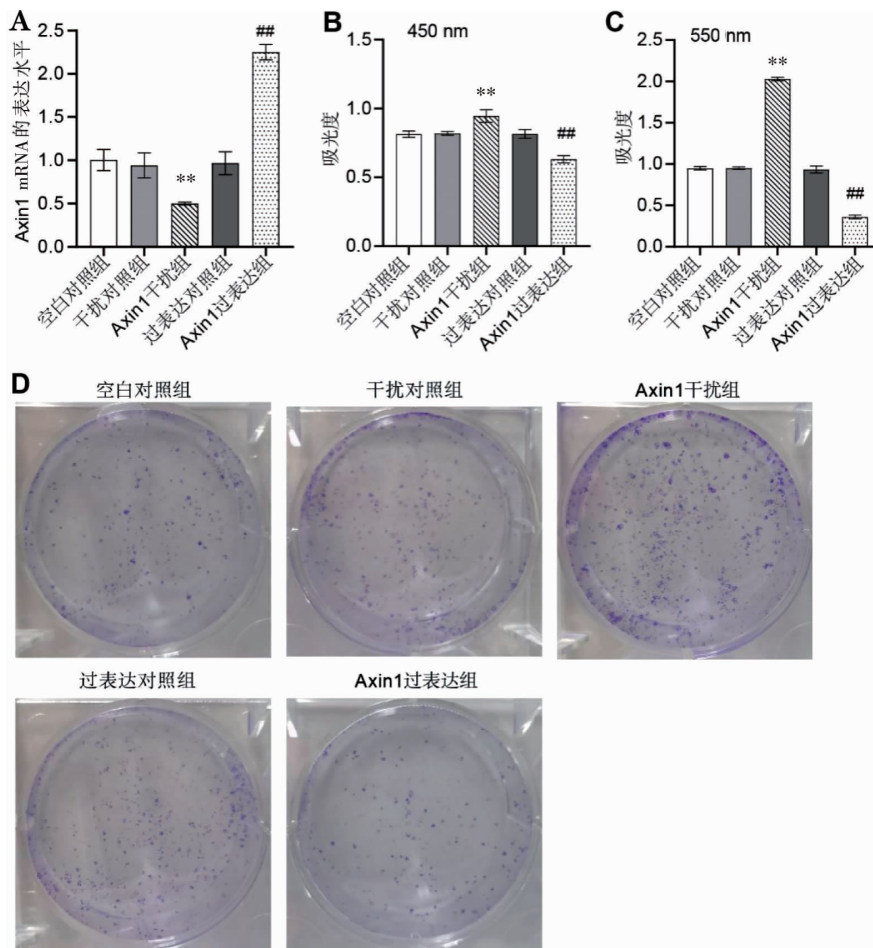


图 2 调控 Axin1 影响口腔上皮细胞增殖活性

注:A. qRT-PCR 检测 Axin1 的转染效率;B-D. CCK-8 和平板克隆实验分析细胞活性;与干扰对照组比较,** $P < 0.01$;与过表达对照组比较,## $P < 0.01$ 。

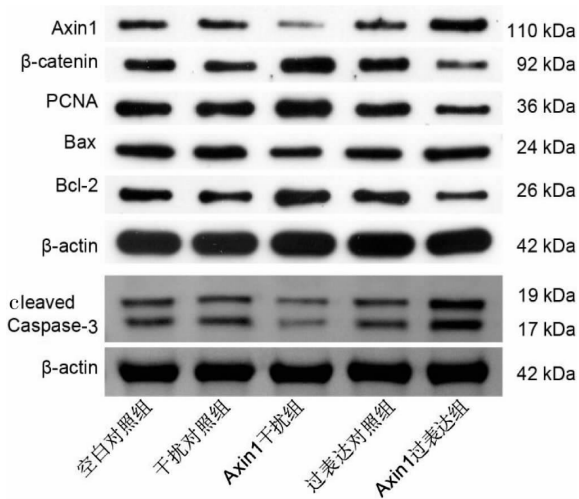


图3 Axin1影响凋亡相关蛋白的表达

显著升高 ($P<0.05$), 细胞增殖活性显著降低 ($P<0.05$)。详见图5。

4 讨论

Axin1 的表达与细胞的增殖、凋亡密切相关^[15-16]。本研究发现,在沉默/过表达 Axin1 后,口腔上皮细胞的增殖活性随之发生改变。蛋白水平上,增殖、凋

亡相关指标(PCNA、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3)也同样受到影响,表明 Axin1 参与口腔上皮细胞增殖、凋亡的生物学过程。类似的,Axin1 作为肿瘤抑制因子参与肝细胞癌的增殖、侵袭、迁移和上皮间质转化^[17]。靶向 Axin1 可以调控细胞的增殖、凋亡水平,影响帕金森病的发展^[18]。在缺氧诱导的心肌细胞损伤模型中,miR-3574 可通过抑制 Axin1 影响细胞凋亡水平^[19]。这些与本研究的结论一致,Axin1 可影响细胞的增殖活性。在过表达 Axin1 后,细胞发生 G1/S 期阻滞。这与前期研究发现一致,过表达 Axin1 可诱导 G1/S 期细胞周期停滞^[20]。Axin1, Axin 蛋白中的一种,作为 β-catenin 破坏复合物的中心支架,与破坏复合物的其他核心成分相互作用^[21-22]。经典的 Wnt 信号通路参与并控制许多生物过程,包括细胞生长、增殖和分化^[23-24]。同样,失调的 Wnt 信号通路影响 OSF 的发展^[25],促进口腔癌变^[26]。破坏复合物对细胞溶质 β-catenin 的降解是 Wnt 通路的关键调控步骤^[21]。其中,Axin1 参与复合物的组装。本研究证实,Axin1 沉

表2 各组上皮细胞中凋亡相关蛋白的表达比较

组别	Axin1	β-catenin	PCNA	Bax	Bcl-2	cleaved Caspase-3
空白对照组	0.27±0.02	0.37±0.03	0.51±0.01	0.42±0.03	0.42±0.01	0.16±0.02
干扰对照组	0.26±0.03	0.32±0.02	0.5±0.02	0.37±0.00	0.34±0.02	0.18±0.07
Axin1 干扰组	0.10±0.04**	0.62±0.02**	0.69±0.01**	0.20±0.02**	0.55±0.02**	0.05±0.04*
过表达对照组	0.25±0.02	0.41±0.04	0.43±0.02	0.36±0.00	0.41±0.02	0.16±0.01
Axin1 过表达组	0.46±0.01 ^{##}	0.21±0.02 ^{##}	0.28±0.00 ^{##}	0.53±0.03 ^{##}	0.24±0.03 ^{##}	0.36±0.03 ^{##}

注:与干扰对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与过表达对照组比较,^{##} $P<0.01$ 。

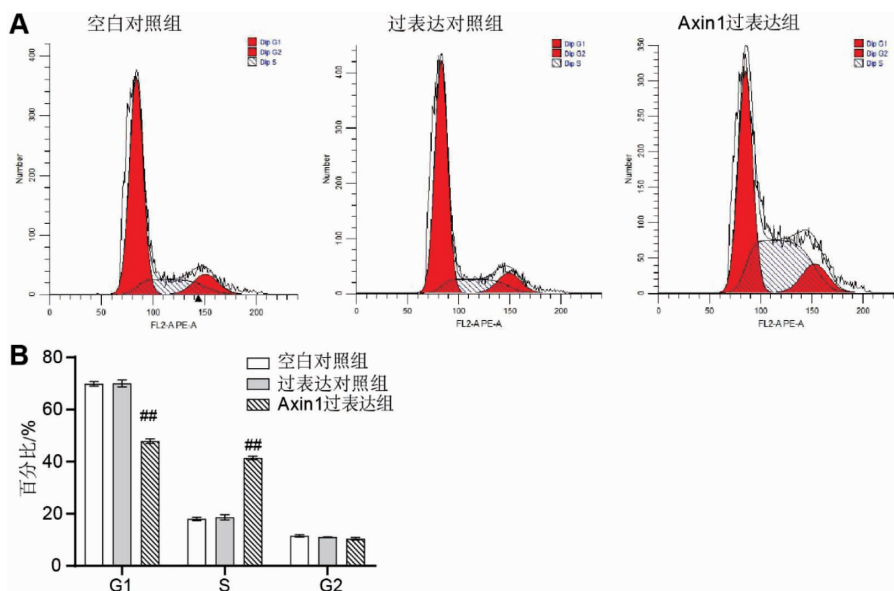


图4 过表达 Axin1 影响口腔上皮细胞的周期调控

注:A.各组细胞周期的流式细胞图;B.各组细胞周期的百分比;与过表达对照组比较,^{##} $P<0.01$ 。

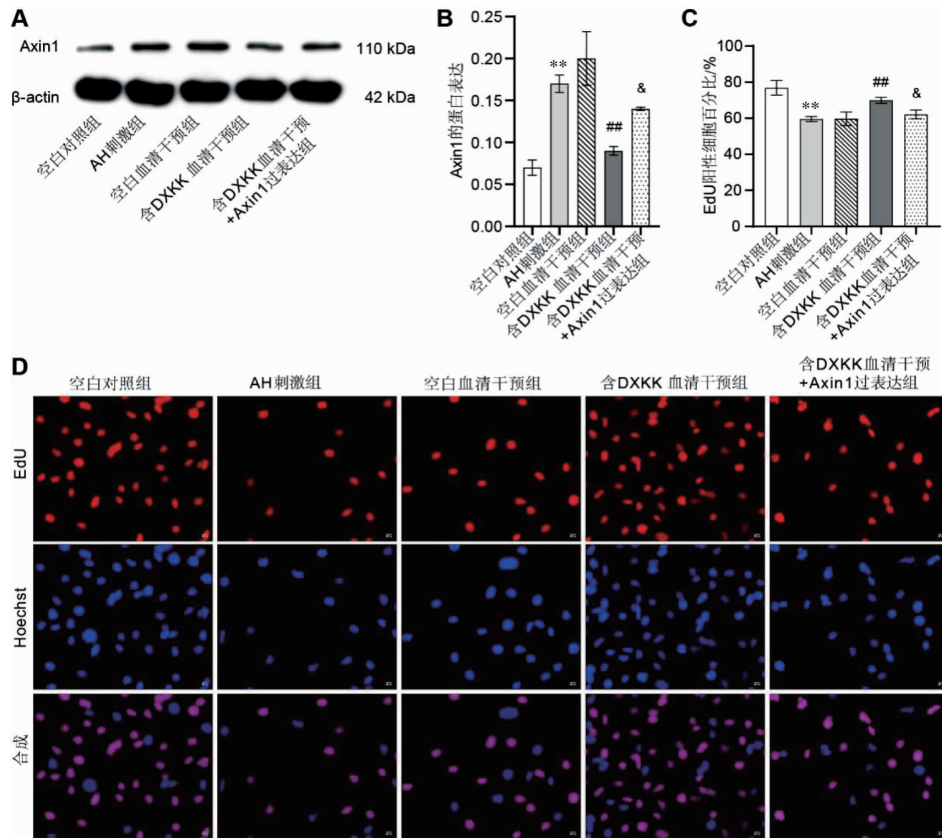


图 5 DXKK 调控 Axin1 影响口腔上皮细胞增殖活性

注:A.各组 Axin1 蛋白表达电泳图;B.各组 Axin1 蛋白表达比较;C.各组 EdU 阳性细胞百分比比较;D.各组 EdU 阳性细胞荧光染色图;与空白对照组比较,** $P<0.01$;与空白血清干预组比较,## $P<0.01$;与含 DXKK 血清干预组比较,& $P<0.05$ 。

默/过表达后, β -catenin 的蛋白水平发生改变。这进一步表明,Axin1 可以通过 β -catenin 信号影响细胞的增殖能力。

本课题组前期研究表明,DXKK 在治疗 OSF 中具有明显的缓解效果^[8]。由丹参、玄参、当归、红花、生地黄、白花蛇舌草、夏枯草、生黄芪、薄荷、白芍、茵陈和桔梗等天然药物研制而成的 DXKK,具有活血化瘀、扶正祛邪等功效^[8]。其中,丹参、当归和红花活血化瘀,生黄芪益气扶正,生地黄和玄参养阴清热,白花蛇舌草解毒散瘀,薄荷辛凉爽口、疏散风热^[27]。临床研究表明,DXKK 可改善患者体内微循环、调整血液状态^[27]。本研究发现,OSF 可以调节 Axin1 的表达。在 AH 诱导的口腔上皮细胞损伤模型中,Axin1 的表达增加。而在 DXKK 含药血清处理后,Axin1 的表达受到抑制,且伴随细胞增殖活性的上调,这表明 DXKK 通过调控 Axin1,缓解 AH 诱导的细胞损伤。过表达 Axin1 后,DXKK 对口腔上皮损伤细胞的增殖促进作用受到影响,提示 Axin1 介导 DXKK 缓解 AH 诱导的上皮细胞损伤。

综上所述,Axin1 可能介导 DXKK 缓解 AH 诱导的口腔上皮细胞细胞损伤,这将为探究 DXKK 治疗 OSF 的内在机制提供可靠的科学线索。

参考文献

- [1] PENG Q, LI H Y, CHEN J, et al. Oral submucous fibrosis in Asian countries[J]. Journal of Oral Pathology and Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, 2020, 49(4): 294-304.
- [2] 翦新春,高兴.口腔黏膜下纤维性变的病因、致病机理、诊断与治疗[J].口腔疾病防治,2021,29(4):217-225.
- [3] 蔡巧丽,利洁雄,周志衡.口腔黏膜下纤维化 60 例临床表现分析[J].基层医学论坛,2021,25(2):293-294.
- [4] JIAN X C, JIAN Y, WU X S, et al. Oral submucous fibrosis transforming into squamous cell carcinoma: A prospective study over 31 years in mainland China[J]. Clinical Oral Investigations, 2021, 25(4): 2249-2256.
- [5] YANG S F, WANG Y H, SU N Y, et al. Changes in prevalence of precancerous oral submucous fibrosis from 1996 to 2013 in Taiwan: A nationwide population-based retrospective

- study[J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2018, 117(2): 147-152.
- [6] KHOLAKIYA Y, JOSE A, RAWAT A, et al. Surgical management of oral submucous fibrosis with “Seagull-nasolabial flap” combined with short-term oral pentoxifylline for preventing relapse[J]. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 2020, 121(5): 512-516.
- [7] GONDIVKAR S M, GADBAIL A R, SARODE S C, et al. Clinical efficacy of mouth exercising devices in oral submucous fibrosis: A systematic review[J]. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 2020, 10(4): 315-320.
- [8] 谭 劲,吴 丹,罗玉姣,等.丹玄口康对 ANE 诱导的 OSF 大鼠的影响[J].*中医临床研究*,2018,10(1):1-4.
- [9] ZHANG Y, XU J P, FU H B, et al. UBE3C promotes proliferation and inhibits apoptosis by activating the β -catenin signaling via degradation of AXIN1 in gastric cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(2): 285-293.
- [10] LI Y, SHENG H, MA F, et al. RNA m6A reader YTHDF2 facilitates lung adenocarcinoma cell proliferation and metastasis by targeting the AXIN1/Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Cell Death and Disease*, 2021, 12(5): 479.
- [11] ANDRADE FILHO P A, LETRA A, CRAMER A, et al. Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer[J]. *Journal of Dental Research*, 2011, 90(6): 740-746.
- [12] IWAI S, KATAGIRI W, KONG C E, et al. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2005, 131(12): 773-782.
- [13] 李元聪,谭 劲,陈 安,等.丹玄口康对 ANE 诱导人口腔黏膜 FB 胶原合成及 TGF β 1 表达的抑制作用[J].*湖南中医药大学学报*, 2007,27(6):15-17.
- [14] 陈 奇.中药药理研究方法[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2006: 1261-1263.
- [15] GU L Q, XIE C Q, PENG Q, et al. Arecoline suppresses epithelial cell viability through the Akt/mTOR signaling pathway via upregulation of PHLPP2[J]. *Toxicology*, 2019, 419: 32-39.
- [16] LI L, GU L Q, YAO Z G, et al. Arecoline suppresses epithelial cell viability by upregulating tropomyosin-1 through the transforming growth factor- β /Smad pathway[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2020, 58(1): 1244-1251.
- [17] QIN A C, WU J W, ZHAI M, et al. Axin1 inhibits proliferation, invasion, migration and EMT of hepatocellular carcinoma by targeting miR-650[J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, 12(3): 1114-1122.
- [18] LIU T, ZHANG Y, LIU W H, et al. LncRNA NEAT1 regulates the development of Parkinson’s disease by targeting AXIN1 via sponging miR-212-3p[J]. *Neurochemical Research*, 2021, 46(2): 230-240.
- [19] CHEN Q S, LIN G F, CHEN Y F, et al. miR-3574 ameliorates intermittent hypoxia-induced cardiomyocyte injury through inhibiting Axin1[J]. *Aging*, 2021, 13(6): 8068-8077.
- [20] LU J R, ZHANG F, YUAN Y, et al. All-trans retinoic acid upregulates the expression of p53 via Axin and inhibits the proliferation of glioma cells[J]. *Oncology Reports*, 2013, 29(6): 2269-2274.
- [21] 邹晨辰,阮灵伟,施 泓. Wnt 信号通路与无脊椎动物天然免疫[J].*生物技术通报*,2021,37(5):182-196.
- [22] KISHIDA S, YAMAMOTO H, IKEDA S, et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(18): 10823-10826.
- [23] 王 斌,麦彩园,曹燕明,等. miR-124-3p 经 Wnt 通路因子 Axin1 调控骨髓间充质干细胞的研究[J].*中国骨质疏松杂志*,2022,28(3): 313-319,372.
- [24] 倪彩菊,覃小珊,黄赞松. Wnt/ β -catenin 信号通路与肝癌发生发展的研究进展[J].*世界华人消化杂志*,2021,29(4):190-196.
- [25] HE X F, XU C J, WU X S, et al. Expression and methylation of Dickkopf-1 in the pathogenesis and malignant transformation of oral submucous fibrosis[J]. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2020, 49(8): 809-815.
- [26] REYES M, FLORES T, BETANCUR D, et al. Wnt/ β -catenin signaling in oral carcinogenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(13): 4682.
- [27] 谭 劲,李元聪,陈 安,等.丹玄口康治疗口腔黏膜下纤维化的临床研究[J].*湖南中医药大学学报*,2006,26(5):41-43.

(本文编辑 黎志清)