

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)07-0580-04

口腔扁平苔藓中 Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 的表达及与细胞凋亡的关系姚希¹, 沈丽佳¹, 殷操², 谢思明¹(¹ 暨南大学医学院口腔医学系, 广东 广州 510632, ² 广东省口腔医院, 广东 广州 510280)Expressions of Caspase-3, TNF- α and TNFRI and their relationship with cell apoptosis in oral lichen planusYAO Xi¹, SHEN Li-Jia¹, YIN Cao², XIE Si-Ming¹¹Department of Stomatology, Medical College, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China, ²Stomatological Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510280, China

【Abstract】 AIM: To examine the expressions and distribution of Caspase-3, TNF- α and TNFRI and their relationship to apoptosis in oral lichen planus (OLP). METHODS: Immunohistochemical staining with SP method and TUNEL technique were used to detect the expressions of Caspase-3, TNF- α and TNFRI in 33 cases of OLP and 7 cases of normal oral mucosa specimens (the controls). RESULTS: Compared with the controls, OLP was increased in apoptosis index (AI) of epithelial cells and decreased in AI of lymphocytes (both $P < 0.05$). The expression of Caspase-3 in all OLP cases was significantly higher than that in the normal group both in the epithelial layer and in the lamina propria ($P < 0.025$). Compared with that in the normal group, TNF- α expression in all OLP cases was decreased in the epithelial layer and increased in the lamina propria (both $P < 0.025$), while TNFRI expression was increased in the epithelial layer and decreased in the lamina propria in all OLP cases (both $P < 0.025$). TNF- α expression was significantly increased in the lamina propria in the erosion group compared with the non-erosion group ($P < 0.05$). A positive correlation was observed between Caspase-3 expression and AI in the epithelial cells ($r = 0.631$, $P < 0.05$). However, there was no significant correlation between Caspase-3 expression and AI in lymphocytes ($P > 0.05$). Expressions of TNF- α and TNFRI were significantly correlated to AI both in the epithelial layer and in the lamina propria. CONCLUSION: The accelerated apoptosis of keratinocytes and the inhibition of lymphocyte apoptosis may coexist in OLP, which

may contribute to the formation and progression of OLP.

【Keywords】 lichen planus, oral; Caspase-3; tumor necrosis factor; TNFRI; apoptosis

【摘要】目的: 探讨口腔扁平苔藓(OLP)中 Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 的表达意义及其与细胞凋亡的关系. 方法: 采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法(TUNEL 法), SP 免疫组化方法检测 33 例 OLP 及 7 例正常口腔黏膜(对照组)中 Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 的表达及细胞凋亡情况. 结果: OLP 中上皮细胞凋亡指数(AI)明显高于正常对照组($P < 0.05$), 而固有层的 AI 明显低于正常对照组($P < 0.05$). OLP 的上皮层和固有层 Caspase-3 阳性表达明显高于正常对照组($P < 0.025$). OLP 中上皮层 TNFRI 及固有层 TNF- α 阳性表达明显高于正常对照组($P < 0.025$), 而上皮层 TNF- α 及固有层 TNFRI 阳性表达则明显低于正常对照组($P < 0.025$). 糜烂型固有层中 TNF- α 阳性表达明显高于非糜烂型组($P < 0.05$). OLP 上皮层 Caspase-3 阳性表达与其自身 AI 呈正相关($r = 0.631$, $P < 0.05$), 而固有层淋巴细胞 Caspase-3 阳性表达与自身的 AI 无相关性($P > 0.05$); TNF- α /TNFRI 表达与 OLP 上皮及固有层细胞的 AI 密切相关. 结论: OLP 中同时存在角质细胞凋亡亢进及固有层淋巴细胞凋亡的减少, 这种凋亡的异常可能与 OLP 的发生发展密切相关.

【关键词】 扁平苔藓, 口腔; Caspase-3; 肿瘤坏死因子; TNFRI; 细胞凋亡

【中图分类号】 R781.5 **【文献标识码】** A

0 引言

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是临床上常见的口腔黏膜非感染性疾病, 在临床上主要表现为口腔黏膜的白色斑块或条纹, 其病理特征为上皮下固有层淋巴细胞带状浸润及基底层细胞液化变性. OLP 的发病机制尚无定论. 近期研究表明, OLP 为细胞介导的自身免疫性疾病, 且与细胞凋亡异常相关^[1]. 我们通过原位检测 OLP 中 Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 蛋白的表达及细胞凋亡情况, 探讨 Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 在 OLP 发生发展中的作用及其与细胞凋亡的关系.

1 对象和方法

1.1 对象 收集广州暨南大学第一附属医院及广东

收稿日期 2005-06-13; 接受日期 2005-07-18

基金项目 广东省医学科研基金资助项目(A2002316); 广东省社会发展领域科技计划项目[粤科社字(2003)245-14 号]

通讯作者 沈丽佳. Tel : (020)33052409 Email : liz1113@163.com

作者简介: 姚希, 硕士生(导师沈丽佳). Tel : (020)85228844

Email : yaoxi_heather@163.com

省口腔医院 2001/2004 年间口腔门诊 OLP 患者活检标本 33(男 7,女 26)例,均是 2 mo 内未经激光、激素、免疫调节治疗的原发病例。患者年龄 22~71(平均 45)岁。16 例取自舌部黏膜,14 例取自颊黏膜,3 例取自下唇黏膜。非糜烂型 24 例,糜烂型 9 例。另取 7 例因口腔外伤或整形手术切除的正常黏膜作为对照组。根据临床表现结合 HE 染色,按 WHO 的 OLP 病理诊断标准,由两位临床病理医师分别独立诊断,以两人一致的结果为最终判断。根据临床表现结合病理诊断,将 33 例 OLP 分为 2 组:糜烂型 9 例,非糜烂型 24 例。试剂:小鼠抗人 Caspase-3 mAb(浓缩型)购自 NeoMarkers 公司,工作浓度是 1:50。小鼠抗人 TNF- α 和 TNFRI mAb(浓缩型)购自 Santa Cruz 公司,工作浓度分别是 1:400 及 1:100。TUNEL 试剂盒为基因公司产品。SP 试剂盒、DAB 显色剂均购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2 方法 患者活检标本 4 μ m 厚连续石蜡切片,65 $^{\circ}$ C 烘烤,脱蜡、水化后微波修复抗原,免疫组化 SP 法检测目标抗原,从 33 例 OLP 中随机选取 15 例(将 33 例随机编号,取偶数,未例舍去),TUNEL 法原位检测 15 例 OLP 和全部正常黏膜的凋亡细胞。SP 法操作步骤严格按照 SP 试剂盒说明书进行,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片,PBS 代替一抗作为替代对照,用已知阳性片做阳性对照。TUNEL 法操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,DAB 显色,PBS 替代 TUNEL 反应液作替代对照。

1.2.1 免疫组织化学染色 Caspase-3 阳性染色为细胞质或(和)细胞核内棕黄色颗粒着色,TNF- α 和 TNFRI 阳性染色均为细胞质中棕黄色颗粒着色。随机选择 5 个高倍视野($\times 400$),计数阳性细胞所占的百分比。根据阳性细胞的比例记分:阳性细胞比例为 0,记为 0 分;1%~25%,记为 1 分;26%~50%,记为 2 分;>50%,记为 3 分。

1.2.2 凋亡细胞的原位检测 细胞核呈棕褐色或细胞质因核 DNA 逸出至阳性染色者,为凋亡细胞。随机选择 5 个高倍视野($\times 400$),计数凋亡细胞数百分率,即为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

统计学处理:全部数据用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 的表达结果采用非参数等级资料秩和检验 Mann-Whitney Test 检验水准取双侧 $\alpha' = 0.025$ (因涉及 2 次重复比较问题,故调整检验水准 $\alpha' = \alpha/2$, α 取 0.05)。TUNEL 法实验结果采用两样本均数比较的 t 检验。AI 与 Caspase-3, TNF- α 和 TNFRI 表达的相关性及 TNF- α 和 TNFRI 之间表达的相关性,采用 Spearman 等级相关

分析。

2 结果

2.1 细胞凋亡情况 在口腔黏膜上皮层及固有层均可见凋亡细胞,核呈棕褐色,轮廓清楚、致密。经两样本均数比较的 t 检验(经方差齐性检验,各組间总体方差齐同),OLP 中上皮细胞凋亡指数明显高于正常对照组($P < 0.05$),凋亡细胞多位于基底层或基底上层,而正常对照组中的凋亡细胞多位于表层及棘层。口腔扁平苔藓中固有层的细胞凋亡指数明显低于正常对照组($P < 0.05$),凋亡细胞多位于固有层深层(图 1A,表 1)。

表 1 口腔扁平苔藓与正常对照组中细胞凋亡指数的比较
(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	上皮层细胞 凋亡指数	固有层细胞 凋亡指数
口腔扁平苔藓	15	67 \pm 19 ^a	34 \pm 10 ^a
正常黏膜	7	40 \pm 10	61 \pm 8

^a $P < 0.05$ vs 正常黏膜组。

2.2 Caspase-3 表达情况 OLP 中 Caspase-3 的阳性率上皮层和固有层均为 100%,上皮层主要表达于基底细胞和棘细胞的胞质,亦可见胞核着色,基底细胞层及近基底细胞层阳性细胞为中度阳性表达,棘细胞层阳性细胞为弱阳性表达(图 1B);固有层近基底膜的淋巴细胞和部分炎性细胞胞质和胞核均呈强阳性或中度表达。正常组上皮层阳性率为 100%,均为弱表达,固有层阳性率为 28.6%(2/7),为个别细胞弱阳性表达。和正常组相比,OLP 患者上皮层角化细胞和固有层淋巴细胞表达 Caspase-3 明显增强($P < 0.025$,表 2)。

表 2 口腔扁平苔藓与正常对照组中 Caspase-3 的表达水平

组别	<i>n</i>	部位	得分			
			0	1	2	3
口腔扁平苔藓	33	上皮层 ^a	0	4	16	13
		固有层 ^a	0	3	14	16
糜烂型	9	上皮层	0	0	4	5
		固有层	0	2	3	4
非糜烂型	24	上皮层	0	3	11	10
		固有层	0	3	10	11
正常黏膜	7	上皮层	0	7	0	0
		固有层	5	2	0	0

^a $P < 0.025$ vs 正常黏膜组。上皮层,固有层分别指上皮层角化细胞和固有层淋巴细胞。

2.3 TNF- α 和 TNFR1 表达情况 OLP 的 TNF- α 阳性表达率是 75.8%(25/33), 其中上皮层和固有层都有表达者 14 例, 仅上皮层表达者 3 例, 仅固有层表达者 8 例, 但上皮层和固有层的阳性表达率各有不同. OLP 组 TNF- α 的上皮层阳性表达率 51.5%(17/33) 明显低于正常对照组的阳性表达率 100%(7/7) ($P < 0.025$), 而 OLP 组的 TNF- α 固有层的阳性表达率 66.7%(22/33) 明显高于正常对照组的阳性表达率 0.0%(0/7) ($P < 0.025$), 糜烂型组固有层中 TNF- α 表达明显高于非糜烂型组 ($P < 0.05$, 表 3). TNF- α 阳性染色主要弥漫分布于胞质, 阳性细胞呈弥散性分布. 上皮层阳性细胞主要分布于基底层及棘层(图 1C). 固有层中主要是围绕上皮钉突浸润的淋巴细胞呈阳性表达, 大多数正常对照组上皮层细胞中 TNF- α 强阳性表达, 而固有层细胞中无表达.

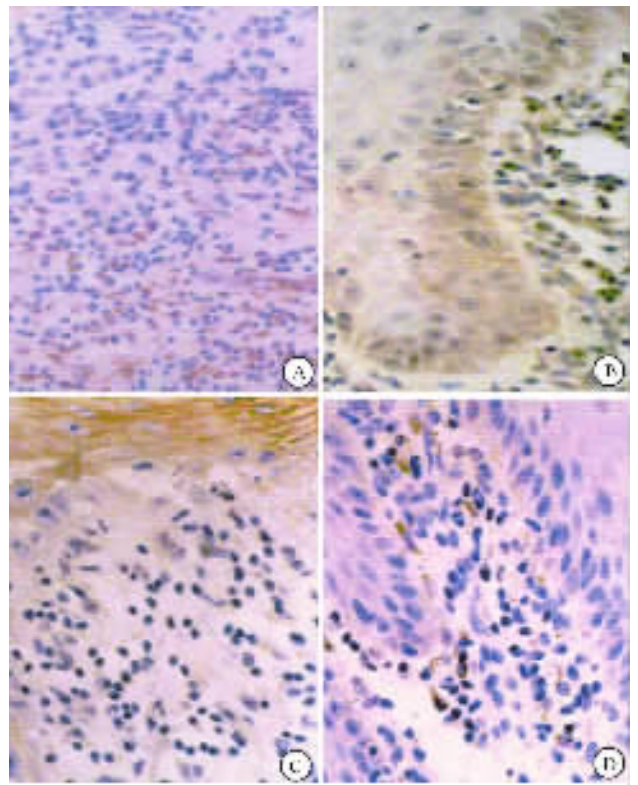
OLP 中 TNFR1 的阳性表达率是 48.5%(16/33), 其中上皮层和固有层都有表达者为 9 例, 仅上皮层有表达者 6 例, 仅固有层有表达者 1 例, 但上皮层和固有层的阳性表达率各有不同. OLP 组的 TNFR1 的上皮层阳性表达率 45.5%(15/33) 明显高于正常对照组的 0.0%(0/7) ($P < 0.025$), 而固有层阳性表达率 30.3%(10/33) 明显低于正常对照组的 85.7%(6/7) ($P < 0.025$, 表 3). TNFR1 阳性染色主要定位于细胞质, 阳性细胞局限于上皮基底层, 呈带状分布, 固有层的淋巴细胞呈阳性, 散在分布(图 1D).

表 3 口腔扁平苔藓与正常对照组中的 TNF- α 和 TNFR1 的表达水平

组别	n	部位	TNF- α				TNFR1			
			0	1	2	3	0	1	2	3
口腔扁平苔藓	33	上皮层 ^a	16	0	4	13	18	7	7	1
		固有层 ^a	11	11	11	0	23	10	0	0
糜烂型	9	上皮层	4	0	1	4	4	2	2	1
		固有层 ^b	0	3	6	0	7	2	0	0
非糜烂型	24	上皮层	17	0	2	5	19	3	2	0
		固有层	15	6	3	0	20	4	0	0
正常黏膜	7	上皮层	0	0	1	6	7	0	0	0
		固有层	7	0	0	0	1	6	0	0

^a $P < 0.025$ vs 正常黏膜组, ^b $P < 0.05$ vs 非糜烂型组.

2.4 OLP 中 Caspase-3, TNF- α 和 TNFR1 的表达与细胞凋亡的关系 OLP 上皮细胞 Caspase-3 阳性表达强弱与上皮细胞的 AI 呈正相关($r = 0.631$, $P < 0.05$), 固有层淋巴细胞 Caspase-3 的阳性表达强弱与其自身的 AI 无相关性($P > 0.05$). TNF- α /TNFR1 与 OLP 上皮层及固有层细胞的 AI 有相关性 Spearman



A: 口腔扁平苔藓中固有层淋巴细胞中可见胞核被染成棕黄色的凋亡细胞 TUNEL $\times 400$; B: 口腔扁平苔藓上皮层基底细胞 Caspase-3 表达阳性 SP $\times 400$; C: 口腔扁平苔藓上皮细胞胞质 TNF- α 阳性表达 SP $\times 400$; D: 口腔扁平苔藓固有层淋巴细胞胞质 TNFR1 阳性表达 SP $\times 400$.

图 1 口腔扁平苔藓中 TUNEL 法阳性染色及 Caspase-3, TNF- α 和 TNFR1 蛋白的阳性表达

等级相关分析显示 OLP 固有层淋巴细胞 TNF- α 阳性表达与上皮细胞的 AI 呈正相关($r = 0.971$, $P < 0.05$), 与其自身的凋亡则呈负相关($r = -0.533$, $P < 0.05$). OLP 上皮细胞 TNFR1 阳性表达与上皮细胞的 AI 呈正相关($r = 0.583$, $P < 0.05$), 固有层淋巴细胞 TNFR1 阳性表达与其自身的 AI 呈正相关($r = 0.699$, $P < 0.05$).

3 讨论

OLP 为细胞介导的自身免疫性疾病, 病变的发生发展与细胞凋亡异常相关^[1]. 本实验结果显示, OLP 上皮细胞的凋亡指数比正常对照组高, 与 Hirota 等^[2]报道的结果一致. 凋亡的上皮细胞多分布于萎缩型的 OLP, 这可能是由于大量上皮细胞的凋亡导致了上皮层的萎缩、变薄, 提示 OLP 上皮萎缩的改变可能与凋亡相关; 同时观察到在凋亡的上皮细胞较密集的 OLP 病例, 多出现较明显的基底细胞液化变性, 故推测 OLP 基底层上皮细胞的液化变性与凋亡有关. 而

观察到 OLP 固有层淋巴细胞的凋亡指数比正常对照组有所降低则提示 OLP 固有层中淋巴细胞的凋亡受到抑制,细胞不能经历正常的凋亡过程而聚集在 OLP 的固有层中。

Caspase 家族是细胞发生凋亡的关键酶类, Caspase-3 是最重要的效应型 Caspase。本研究结果表明, OLP 患者口腔黏膜上皮表达 Caspase-3 明显增强 ($P < 0.05$), 提示 OLP 中 Caspase 家族的级联反应是在 OLP 上皮层的生发层内被激活的, 胞核阳性表达是由于在细胞成熟、衰老、死亡时, Caspase-3 从胞质易位到胞核。Nakagawara 等^[3]在退化凋亡神经母细胞瘤中报道了相似情况, 由此推测胞核中的 Caspase-3 可能与细胞凋亡有关, 但具体机制不清。实验结果分析还提示, Caspase-3 在 OLP 上皮层细胞凋亡中起重要作用, 而固有层淋巴细胞的生命活动更为复杂, TNF- α -TNFRI 通路可能不仅仅介导细胞凋亡。

肿瘤坏死因子(TNF)是由于其能引起肿瘤组织出血性坏死而得名, TNF- α 和 TNFRI 与相关分子结合, 激活 Caspase-3 而最终导致靶细胞凋亡^[4]。Erdem 等^[5]检测到 OLP 患者血清中的 TNF- α 水平明显比正常对照组高, Simark-Mattsson 等^[6]发现 OLP 的 T 细胞有 TNF- α mRNA 的表达。本研究结果提示, OLP 上皮细胞的凋亡异常可能是通过 TNF- α -TNFRI 介导的凋亡通路实现的, OLP 固有层中的淋巴细胞表达 TNF- α 通过结合上皮细胞表面的 TNFRI 诱导上皮细胞凋亡; OLP 固有层淋巴细胞的凋亡可能也是由 TNF- α -TNFRI 介导实现的, 但是由于 TNFRI 表达的减少, 导致 TNF- α 没有足够的受体结合而不能正常发挥作用, 抑制了细胞凋亡, 这也说明靶细胞表面 TNFRI 的质与量直接影响 TNF- α 的敏感性。沈丽佳等^[7-8]的研究结果表明, OLP 中的上皮细胞和固有层淋巴细胞都是 TNF- α 潜在来源, 当 OLP 中上皮细胞表达 TNF- α 及固有层淋巴细胞表达 TNFRI 减少时, TNF- α -TNFRI 介导淋巴细胞的凋亡途径受阻, 淋巴细胞得以“逃逸”正常的凋亡而聚集于 OLP 的固有层

中。本实验中, OLP 固有层淋巴细胞 TNF- α 的表达还与其自身的 AI 呈负相关, 因为 TNF- α 与受体结合后, 介导的不止是凋亡通路, 还有可能激活 NF- κ B 通路, 从而产生有利于细胞生存的信号, 导致细胞增殖。这也说明了 TNF- α -TNFRI 细胞信号传导通路的复杂性, 其选择死亡或生存信号的机制有待进一步探讨。

本研究中糜烂型 OLP 固有层淋巴细胞 TNF- α 的表达明显高于非糜烂组, 说明 TNF- α 在 OLP 中除了诱导上皮细胞的凋亡外, 还可能通过抑制细胞的生长或通过细胞毒作用, 损伤上皮细胞, 导致临床上出现上皮萎缩、糜烂等表现。TNF- α 表达的高低对于 OLP 临床诊断及治疗的指导意义还有待进一步探讨。

【参考文献】

- [1] Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R. Apoptosis in oral lichen planus [J]. *Eur J Oral Sci*, 2001, 109(5): 361-364.
- [2] Hirota M, Ito T, Okudela K, et al. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus [J]. *J Oral Pathol Med*, 2002, 31(4): 204-212.
- [3] Nakagawara A, Nakamura Y, Ikeda H, et al. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) and CPP32 in unfavorable human neuroblastoma [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(20): 4578-4584.
- [4] Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(Suppl 3): S243-S252.
- [5] Erdem MT, Gulec AI, Kiziltunc A, et al. Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha in lichen planus [J]. *Dermatology*, 2003, 207(4): 367-370.
- [6] Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, et al. Distribution of interleukin-2, -4, -10, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus [J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(6): 499-507.
- [7] 沈丽佳, 阮萍, 殷操, 等. 口腔扁平苔藓中肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子受体 I 表达及与细胞凋亡的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(9): 1664-1667.
- [8] 沈丽佳, 阮萍, 殷操, 等. 口腔扁平苔藓中 TNF- α 表达及其与肥大细胞关系的研究 [J]. *暨南大学学报*, 2004, 25(6): 392-396.