

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0029-05

兜甲蛋白和细胞色素P450 3A5在 口腔黏膜下纤维化中的表达及意义

李宁¹ 翦新春¹ 许春娇²

(1.中南大学湘雅医院 口腔颌面外科; 2.口腔内科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨兜甲蛋白(LOR)和细胞色素P450 3A5(CYP 3A5)在口腔黏膜下纤维化颊黏膜(OSF)和正常颊黏膜中的表达以及在上皮防御作用中的意义。方法 首先采用免疫组化染色检测66例OSF颊黏膜和14例正常颊黏膜中LOR和CYP 3A5这两种蛋白的表达和定位, 然后采用Western blot和RT-PCR方法分别在OSF患者颊黏膜和正常人颊黏膜中检测LOR和CYP 3A5的蛋白和mRNA表达。结果 42例(63.6%)OSF呈LOR阳性表达, 其在早、中期之间差异有统计学意义($P<0.05$), 而中、晚期之间差异无统计学意义($P>0.05$); 正常颊黏膜中CYP 3A5均呈阳性表达, 5例(7.6%)OSF出现棘细胞弱阳性表达, 33例(50%)出现内皮细胞弱阳性表达, 与病理分期呈负相关($P<0.05$)。RT-PCR显示LOR和CYP 3A5 mRNA在OSF与正常黏膜中表达的差异均有统计学意义($P<0.05$); 而Western blot检测显示, 只有CYP 3A5蛋白表达在两者间差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 LOR和CYP 3A5的异常表达是OSF黏膜上皮防御能力改变的表现, 它们在OSF发生发展和癌变过程中可能发挥了重要作用。

[关键词] 口腔黏膜下纤维化; 兜甲蛋白; 细胞色素P450 3A5

[中图分类号] R781.5 **[文献标识码]** A

Expression of lorricrin and cytochrome P450 3A5 in oral submucous fibrosis and their significance LI Ning¹, JIAN Xin-chun¹, XU Chun-jiao². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China; 2. Dept. of Oral Medicine, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of lorricrin(LOR) and cytochrome P450 3A5(CYP 3A5) in oral submucous fibrosis(OSF) and to evaluate their roles in the defending ability of epithelium mucosae. **Methods** The expression of LOR and CYP 3A5 was examined in the specimens of 66 OSF and 14 normal buccal mucosa samples by immunohistochemistry, and the protein and mRNA expression of them was detected by Western blot and reverse transcriptase-PCR(RT-PCR). **Results** LOR was overexpressed in 42(63.6%) cases of OSF, and showed a significant difference only between the early and moderately stages of OSF($P<0.05$), but no clear difference between moderately and advanced stages($P>0.05$). All normal buccal mucosa tissues showed positive immunoreactivity for CYP 3A5 protein in the membrane and cytoplasm of spinous epithelial cells and cytoplasm of endothelial cells, 5(7.6%) cases of OSF showed weak staining of CYP 3A5 in spinous epithelial cells and 33(50%) showed faint in cytoplasm of endothelial cells. A negative relationship between its expression and pathological stages was found in OSF($P<0.05$). RT-PCR results were fully consistent with the immunohistochemical data. But the results of Western blot only showed the expression of CYP 3A5 was significantly higher in normal buccal mucosa samples than OSF. **Conclusion** The results suggest that the LOR and CYP 3A5 might play a vital role in the change of defending ability of epithelium mucosae as well as the pathopoiesis and carcinogenesis of OSF.

[Key words] oral submucous fibrosis; lorricrin; cytochrome P450 3A5

口腔黏膜下纤维化(oral submucous fibrosis,

OSF)是一种具有癌变潜能的口腔黏膜病变^[1]。虽然咀嚼槟榔是OSF主要的致病因素^[2], 但具体的发病机制仍不明确。OSF特征性病理改变主要在黏膜下层, 因此大多研究集中于OSF黏膜下组织或成纤维细胞中。但槟榔粗大的纤维成分和多种致病化学成分首先刺激的是口腔黏膜上皮, 只有黏膜上皮这第一道

[收稿日期] 2008-03-18; [修回日期] 2008-08-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572044); 中南大学研究生创新课题基金资助项目(2006)

[作者简介] 李宁(1979-), 男, 湖南人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 翦新春, Tel: 0731-4327493

口腔防御屏障在槟榔长期剧烈的理化刺激下产生防御能力的改变,才能使外源性刺激进一步渗透到黏膜下组织,造成进一步的黏膜下病理变化。兜甲蛋白(loricrin, LOR)是表皮细胞分化复合物和角化细胞被膜(cornified envelope, CE)的主要成分,并且也是表皮细胞抵御外环境物理刺激的主要屏障^[3]。而细胞色素P450 3A5(cytochrome P450 3A5, CYP 3A5)参与人体多种内外源性化合物的转化,是抵御外源性化学刺激的重要因子,对细胞的新陈代谢、解毒反应和耐药现象都起着非常重要的作用^[4]。LOR和CYP 3A5的表达分别反映了组织细胞防御外源性物理和化学刺激的能力,但是尚未发现它们在OSF中的相关报道。本研究运用免疫组化方法研究LOR和CYP 3A5在OSF中的表达,并且检测它们蛋白和mRNA表达水平在OSF和正常颊黏膜中的差异,以揭示LOR和CYP 3A5在OSF黏膜上皮防御能力变化中的作用以及在OSF发生发展和癌变中的意义。

1 材料和方法

1.1 标本和试剂

选取中南大学口腔医院口腔病理科2007年3月—7月存档的OSF颊黏膜石蜡标本66例和正常颊黏膜标本14例,并记录患者的临床病理参数。在口腔内、外科门诊收集10例OSF患者和10例正常成人颊黏膜新鲜组织, -80℃保存备用。所有操作均经患者知情同意。

兔抗人LOR多克隆抗体(Abcam公司, 英国), 兔抗人CYP 3A5多克隆抗体(Biomol公司, 美国), 生物素化山羊抗兔IgG和链霉素卵白素过氧化物酶复合物(Santa Cruz公司, 美国)。通用型蛋白抽提试剂和BCA蛋白浓度定量试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司), ECL发光试剂(Amersham公司, 英国), Trizol(Invitrogen公司, 美国), 逆转录试剂盒和Taq酶(Takara Bio公司, 日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化染色 免疫组化SP法检测OSF颊黏膜和正常颊黏膜中LOR和CYP 3A5的表达。用PBS代替一抗作为阴性对照; 过度角化皮肤标本作LOR阳性对照; 肺癌标本作CYP 3A5阳性对照。

1.2.2 蛋白印迹法(Western blot) 从OSF患者和正常成人颊黏膜标本中抽提总蛋白30 μg, 经12%SDS-PAGE分离后电转至PVDF膜。分别与LOR抗体(1:1 000稀释)和CYP 3A5抗体(1:2 000稀释)室温孵育1 h。洗涤后, PVDF膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:2 000)室温孵育1 h, ECL发光, 曝光5 min, 胶片显影定影。β-actin作为内对照。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR) 从OSF患者和正常成人颊黏膜标本中提取总RNA, 逆转录合成cDNA, PCR扩增, 产物用1%琼脂糖凝胶电泳分析。PCR反应所用引物设计如下。LOR:(F)5'-CAGGTCACTCAGACCTCGT-3', (R)5'-CCTCCAGAGGAACCACCT-3', 产物大小200 bp; CYP 3A5:(F)5'-ACACCCTTTGGAAGTGGAC-3', (R)5'-GAAGAAGTCCTTGCGTGTCT-3', 产物大小154 bp。实验采用3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内对照:(F)5'-ACCACAGTCCATGCCATC-3', (R)5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-3', 产物大小452 bp。

1.2.4 结果判定 每张切片随机计数5个高倍镜视野, 共500个细胞, 计算阳性细胞率。LOR免疫组化结果的判定以上皮细胞胞浆和(或)胞核呈现棕黄色或棕褐色染色的细胞数≥10%为阳性, <10%为阴性, 而CYP 3A5以胞浆和(或)胞膜出现棕黄色或棕褐色染色的细胞数≥10%为阳性, <10%为阴性。Western blot和RT-PCR结果条带进行灰度值扫描, 获得与相应内参照的灰度值比值。

1.2.5 统计学分析 所得数据应用SPSS 12.0软件进行统计分析, 对计数资料进行卡方检验; Western blot和RT-PCR结果进行成组设计资料t检验。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

LOR在14例正常颊黏膜中均呈阴性表达(图1)。LOR在42例(63.6%)OSF颊黏膜棘层上部(或)角化层的细胞胞浆和(或)胞核中呈棕黄色阳性染色, 染色部位以棘层上部细胞胞浆为主(图2)。LOR在OSF颊黏膜中的阳性表达率高于正常颊黏膜, 其差异有统计学意义($\chi^2=18.77, P<0.05$)。

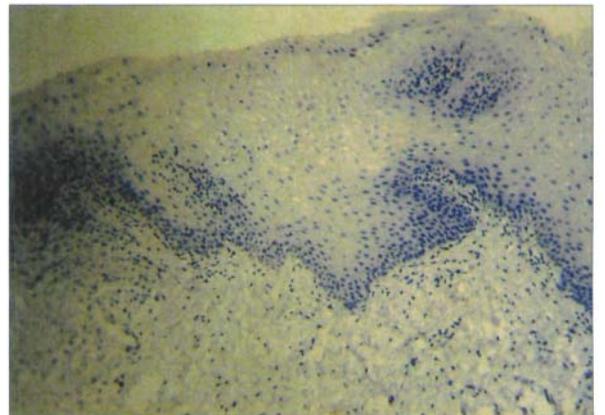


图1 LOR在正常颊黏膜中阴性表达 SP ×400
Fig 1 Negative expression of LOR in normal buccal mucosa SP ×400

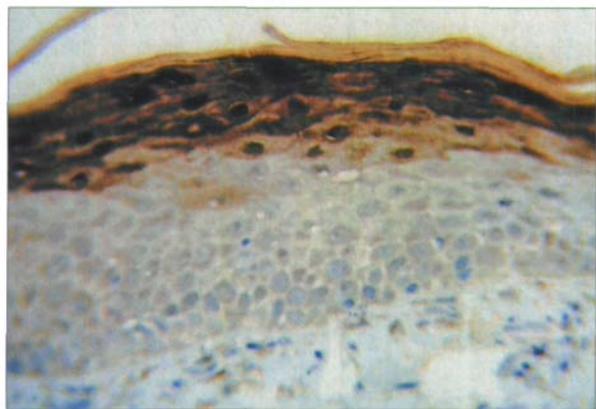


图2 LOR在OSF颊黏膜棘层上部和角化层细胞中阳性表达 SP ×400

Fig 2 Positive expression of LOR was observed mainly in the upper spinous epithelial layer and keratinocyte layer of OSF SP ×400

CYP 3A5在12例(85.7%)正常颊黏膜棘细胞胞膜和(或)胞浆,以及所有14例(100%)正常颊黏膜内皮细胞胞浆中阳性表达(图3)。CYP 3A5在5例(7.6%) OSF颊黏膜上皮棘细胞和33例(50%) OSF颊黏膜内皮细胞中弱阳性表达(图4)。CYP 3A5在OSF颊黏膜中阳性表达率低于正常颊黏膜($\chi^2=11.92, P<0.05$)。

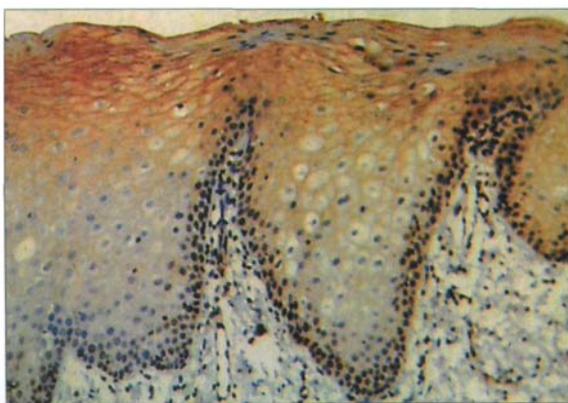


图3 CYP 3A5在正常颊黏膜上皮棘细胞和血管内皮细胞中阳性表达 SP ×100

Fig 3 CYP 3A5 protein was positively expressed in the spinous epithelial cells and endothelial cells of normal buccal mucosa SP ×100

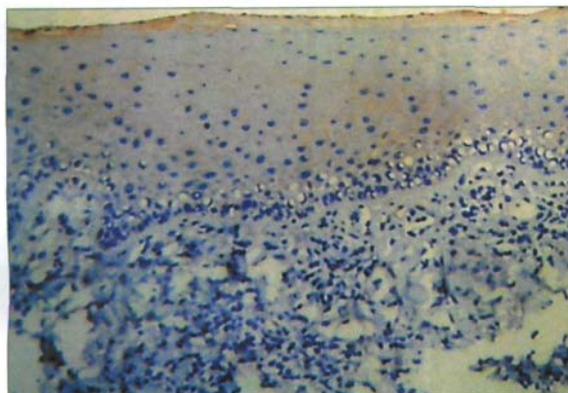


图4 CYP 3A5在OSF颊黏膜中弱阳性表达 SP ×100

Fig 4 Expression of CYP 3A5 was weak in OSF buccal mucosa SP ×100

表1显示在2种蛋白阳性表达与OSF患者临床病例参数的相关性研究中, LOR在中期OSF组织中的阳性表达率高于早期OSF组织, 其差异有统计学意义($\chi^2=4.6, P<0.05$), 而中、晚期之间未见明显统计学差异($P>0.05$); CYP 3A5阳性表达率与OSF组织病理分期呈负相关($\chi^2=4.18, P<0.05$): 早期OSF组织的CYP 3A5阳性表达率大于中期OSF组织, 而中期大于晚期。

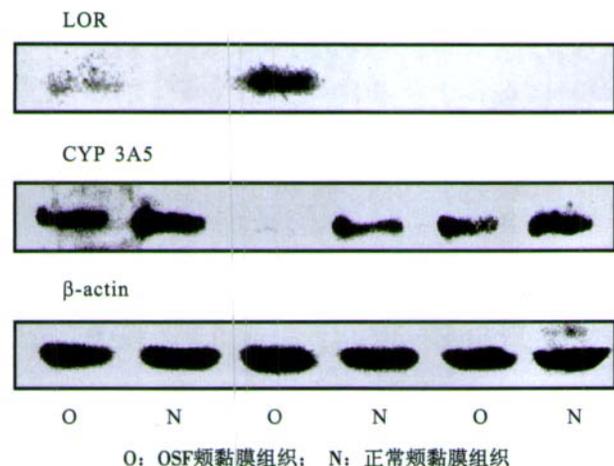
表1 LOR和CYP 3A5表达与口腔黏膜下纤维化临床病例参数的关系[例(%)]

Tab 1 Correlation between the expressions of LOR as well as CYP 3A5 and clinical pathological parameters in OSF[n(%)]

临床病例参数	病例数	LOR阳性例数	CYP 3A5阳性例数
年龄(岁)			
<30	37	25(67.6%)	19(51.4%)
≥30	29	17(58.6%)	14(48.3%)
P值		0.45>0.05	0.80>0.05
性别			
男	4	3(75.0%)	2(50.0%)
女	62	39(62.9%)	31(50.0%)
P值		0.63>0.05	1.00>0.05
嚼槟榔时间(年)			
<4	37	24(64.9%)	19(51.4%)
≥4	29	18(62.1%)	14(48.3%)
P值		0.82>0.05	0.80>0.05
发病时间(年)			
<1	25	15(60.0%)	11(44.0%)
≥1	41	27(65.9%)	22(53.7%)
P值		0.63>0.05	0.45>0.05
病理分期			
早期	18	8(44.4%)	14(77.8%)
中期	35	26(74.3%)	17(48.6%)
P值		0.03<0.05	0.04<0.05
晚期	13	8(61.5%)	2(15.4%)
P值		0.38>0.05	0.04<0.05

2.2 Western blot结果

OSF颊黏膜的CYP 3A5蛋白表达水平低于正常颊黏膜, 其差异有统计学意义($t=-2.94, P<0.05$); 而由于LOR具有极度难溶的特性^[5], 本研究没有得到LOR在OSF颊黏膜和正常颊黏膜中具有统计学差异的结果(图5)。

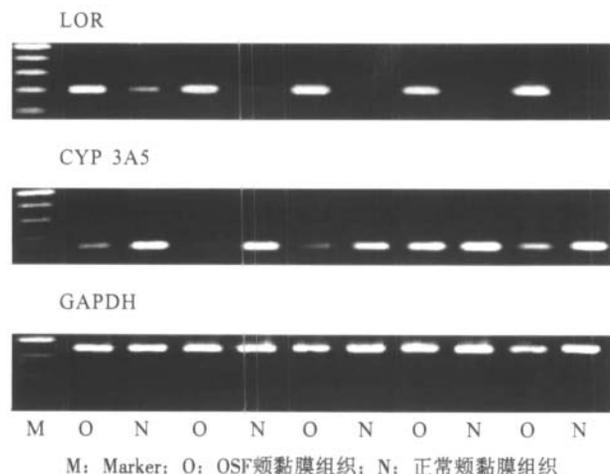


O: OSF颊黏膜组织; N: 正常颊黏膜组织
图5 CYP 3A5和LOR的Western blot分析

Fig 5 Analysis of CYP 3A5 and LOR protein level by Western blot

2.3 RT-PCR结果

LOR mRNA水平在OSF颊黏膜中高于正常颊黏膜, 其差异有统计学意义($t=8.11, P<0.05$); CYP 3A5 mRNA水平在OSF颊黏膜中低于正常颊黏膜, 其差异有统计学意义($t=-4.66, P<0.05$, 图6)。



M: Marker; O: OSF颊黏膜组织; N: 正常颊黏膜组织
图6 LOR和CYP 3A5 mRNA的RT-PCR分析

Fig 6 Analysis of LOR and CYP 3A5 mRNA by RT-PCR

3 讨论

黏膜下胶原纤维堆积虽然是OSF的主要病理改变, 但是OSF黏膜上皮在其发生发展中也发挥了重要的作用。研究证实, OSF黏膜上皮细胞中转化生长因子- β_1 ^[6]、内皮素-1^[7]和细胞角蛋白17^[8]等上皮细胞分泌的细胞因子均呈过度表达, 并且冯云枝等^[9]发现, 槟榔提取物体外培养口腔黏膜角朊细胞所得的上清液能够提高成纤维细胞的增殖能力, 因此, OSF的发生可能是因为槟榔的理化刺激改变了黏膜上皮防御能力后, 刺激上皮细胞分泌相关细胞因子, 促进成纤维细胞增殖, 加速胶原合成, 抑制胶原降解, 最终导致黏膜下组织纤维化。但是OSF黏膜上皮防御理化刺激的能力到底产生了什么样的变

化?目前尚无报道。

经常受到物理刺激的上皮组织中可见LOR的高表达, 提示LOR的表达可能是上皮组织对机械摩擦刺激的适应性改变^[10]。而LOR基因的变异, 则是造成人类Vohwinkel综合征皮肤角质化的重要因素^[11]。本研究发现, LOR在OSF颊黏膜中的表达明显高于正常组, 说明OSF颊黏膜上皮在槟榔纤维长期物理刺激下产生了适应性的防御反应, 大量表达的LOR形成了致密的细胞被膜, 加强了黏膜上皮对抗机械摩擦的能力。Manabe等^[12]发现LOR强表达于皮肤角质层、表皮颗粒层和棘层上部, 本研究也发现LOR主要表达于OSF黏膜上皮棘层上部和角化层, 原因可能与这2层细胞更容易受到外环境的摩擦刺激有关。另外, 本研究发现中期OSF的LOR表达高于早期, 而中晚期之间没有差别, 说明LOR可能是细胞被膜一种较晚表达的产物, 并且其防御物理刺激的能力有限, 不能完全抵抗环境刺激对黏膜下组织的改变。此外, Mayall等^[13]发现肺癌组织中LOR表达明显增高; Lotan^[14]发现类维生素A能抑制LOR表达、逆转口腔角质化癌前病变, 这都提示LOR在OSF癌变中也可能发挥了一定的作用。

CYP 3A5表达增高说明机体对药物或毒性物质的代谢清除能力增强; 表达量低则提示代谢清除能力减弱。在槟榔多种化学成分中, 槟榔碱、槟榔次碱和去甲基槟榔次碱是产生细胞毒性、导致OSF形成和癌变的主要物质。本研究发现OSF组织中CYP 3A5的表达较正常黏膜下降, 提示OSF上皮细胞转化外源性致病物质的能力可能在这些毒性化学成分持续而强烈的刺激下被逐步抑制, 为致病物质进一步渗入黏膜下组织打开了通道。免疫组化结果显示在OSF棘细胞中CYP 3A5表达减弱的趋势较在OSF内皮细胞中更加明显, 可能与棘细胞层位于表层而更易受到外界刺激的影响, 而深层内皮细胞受影响较迟有关, 但也提示血管内皮细胞在毒物清除过程中的重要作用。此外本研究发现CYP 3A5表达随OSF病理分期加重而下降, 并且Tsai等^[15]发现CYP 3A5在OSF癌变病例中也处于下调状态, 说明黏膜上皮防御化学刺激能力的减弱是一个重要的致病和致癌的因素, 提示CYP 3A5在整个OSF发生发展以及癌变过程中可能起着重要的作用, 但仍需要OSF组织细胞学实验的进一步证实。

[参考文献]

[1] 翦新春, 彭解英, 唐瞻贵, 等. 口腔黏膜下纤维性变癌变(附三例报告)[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(2): 130-131.

- malignant transformation of oral submucous fibrosis(three cases report)[J]. West China J Stomatol, 2000, 18(2) :130-131.
- [2] Pindborg JJ, Sirsat SM. Oral submucous fibrosis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1966, 22(6) :764-779.
- [3] Yoneda K, Hohl D, McBride OW, et al. The human loricrin gene[J]. J Biol Chem, 1992, 267(25) :18060-18066.
- [4] Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450[J]. Lancet, 2002, 360(9340) :1155-1162.
- [5] Katou F, Shirai N, Kamakura S, et al. Differential expression of cornified cell envelope precursors in normal skin, intraorally transplanted skin and normal oral mucosa[J]. Br J Dermatol, 2003, 148(5) :898-905.
- [6] 高义军, 凌天旸, 吴汉江, 等. 转化生长因子 β_1 在口腔黏膜下纤维性变角肌细胞中的表达[J]. 中华口腔医学杂志, 1997, 32(41) : 239-240.
- GAO Yi-jun, LING Tian-you, WU Han-jiang, et al. Expression of transforming growth factor β_1 in keratinocytes of oral submucous fibrosis tissue[J]. Chin J Stomatol, 1997, 32(41) :239-240.
- [7] 许春娇, 彭解英, 刘蜀凡, 等. 口腔黏膜下纤维性变组织中内皮素1的免疫组织化学和定量研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(6) :394-396.
- XU Chun-jiao, PENG Xie-ying, LIU Shu-fan, et al. Quantitative and immunohistochemical analysis of endothelin-1 in oral submucous fibrosis[J]. West China J Stomatol, 2000, 18(6) :394-396.
- [8] Lalli A, Tilakaratne WM, Ariyawardana A, et al. An altered keratinocyte phenotype in oral submucous fibrosis: Correlation of keratin K17 expression with disease severity[J]. J Oral Pathol Med, 2008, 37(4) :211-220.
- [9] 冯云枝, 凌天旸. 口腔黏膜下纤维性变患者角肌细胞分泌细胞因子水平变化[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(1) :23-25.
- FENG Yun-zhi, LING Tian-you. Changes of cytokines secreted by human oral mucosa keratinocytes from oral submucous fibrosis *in vitro*[J]. West China J Stomatol, 2000, 18(1) :23-25.
- [10] Candi E, Melino G, Mei G, et al. Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein[J]. J Biol Chem, 1995, 270(44) :26382-26390.
- [11] Schmuth M, Fluhr JW, Crumrine DC, et al. Structural and functional consequences of loricrin mutations in human loricrin keratoderma(Vohwinkel syndrome with ichthyosis)[J]. J Invest Dermatol, 2004, 122(4) :909-922.
- [12] Manabe M, Mizoguchi M, Sut H, et al. Epidermal structural proteins in skin disorders[J]. J Dermatol Sci, 1997, 15(3) :143-165.
- [13] Mayall FG, Goddard H, Gibbs AR. An assessment of involucrin as a diagnostically useful immunohistochemical marker in lung tumours[J]. Histopathology, 1992, 20(1) :53-55.
- [14] Lotan R. Squamous cell differentiation markers in normal, pre-malignant, and malignant epithelium: Effects of retinoids[J]. J Cell Biochem Suppl, 1993, 53(S17F) :167-174.
- [15] Tsai WC, Tsai ST, Ko JY, et al. The mRNA profile of genes in betel quid chewing oral cancer patients[J]. Oral Oncol, 2004, 40(4) :418-426.

(本文编辑 汤亚玲)

《华西口腔医学杂志》第四届编辑委员会

名誉主编:王翰章 张震康 王大章 邱蔚六 樊明文 马轩祥

主 编:周学东

副 主 编:温玉明 巢永烈 陈扬熙 俞光岩 张志愿 赵铤民 边专 田中昭男(日本)

Ralph M.Duckworth(英国) 张乐薇(加拿大)

常务副主编:王晴

编 委(按汉语拼音为序)

边专 巢永烈 陈谦明 陈新民 陈扬熙 陈宇 陈治清 邓典智 丁一 杜传诗 樊瑜波 冯海兰 高岩 Gary C.Armitage(美国) 高学军 Giuseppe Siciliani(意大利) 宫莘 郭伟 胡德渝 胡国瑜 胡静 黄洪章 In-Ho Cho(韩国) 贾问炬 翦新春 焦锡葳 金岩 雷荀灌 Lakshman P.Samaranayake(香港) 李秉琦 李辉琴 李金荣 李龙江 李少敏 李声伟 李伟 李仪红(美国) 梁星 林久祥 林珠 凌均棨 刘大维 刘福祥 刘洪臣 刘建国 刘天佳 刘正 吕培锷 栾文民 罗颂椒 罗宗贻 罗宗莲 Mauro Cozzani(意大利) 马绪臣 毛尔加(美国) 毛祖彝 蒙敏 青木秀希(日本) 欧阳喈 Page W.Caufield(美国) 潘亚萍 Ralph M.Duckworth(英国) 任材年 石冰 石四箴 史俊南 史宗道 宋一平 孙正 Sen Nakahava(日本) Stephen Wei(香港) 孙宏晨 Thomas W.Braun(美国) 唐亮 唐休发 田卫东 田中昭男(日本) Urban Hägg(香港) 王邦康 王虎 王惠芸 王林 王满恩 王强 王晴 王少安 王松灵 王兴 温玉明 魏奉才 吴补领 吴红崑 吴亚菲 徐勇忠 徐芸 薛淼 闫福华 杨丕山 杨四维 杨壮群 易新竹 俞光岩 袁祥民 岳松龄 詹淑仪 张乐薇(加拿大) 张念光(香港) 张兴栋 张蕴惠 张志愿 章锦才 章魁华 赵士芳 赵怡芳 赵铤民 赵云凤 赵志河 郑麟蕃 郑谦 周红梅 周树夏 周学东 周曾同 周正炎 周志瑜 朱洪水 朱智敏