

# 复发性阿弗他溃疡患者唾液中表皮生长因子和病损区表皮生长因子受体的定量研究

顾 杨<sup>1</sup>, 张 纲<sup>2</sup>, 林 梅<sup>3</sup>

(1.大连医科大学口腔医学院 口腔内科教研室, 辽宁 大连 116027;

2.第三军医大学新桥医院 口腔科, 重庆 400037; 3.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨复发性阿弗他溃疡(RAU)患者溃疡期和间隙期唾液表皮生长因子(EGF)质量浓度的变化以及病损区表皮生长因子受体(EGFR)的表达有无缺陷。方法 选择27例在溃疡期和间隙期均成功获取唾液样本的轻型RAU患者作为RAU1组,采集33例正常人的唾液样本作为对照1组,采用酶联免疫吸附法检测两组唾液样本中EGF质量浓度。另外选择31例轻型RAU溃疡期患者在溃疡底部剪取小块组织样本作为RAU2组,采集35例无RAU者的正常黏膜组织作为对照2组,采用荧光定量逆转录聚合酶链反应检测两组组织样本内EGFR的RNA表达情况。结果 RAU1组溃疡期患者唾液EGF质量浓度高于RAU1组间隙期和对照1组,而间隙期EGF质量浓度低于对照1组( $P<0.05$ )。RAU1组和对照1组唾液EGF质量浓度在不同性别间差别不大,与年龄也没有相关性( $P>0.05$ )。RAU2组EGFR的RNA表达强度高于对照2组,两组间有统计学差异( $P<0.05$ )。结论 RAU患者口腔溃疡的复发性可能与间隙期唾液EGF质量浓度减少有关;口腔溃疡的自愈性可能与溃疡期唾液EGF质量浓度增加和溃疡区EGFR表达增加有关。

[关键词] 复发性阿弗他溃疡; 表皮生长因子; 表皮生长因子受体

[中图分类号] R781.5+9 [文献标识码] A

Quantity research on epidermal growth factor in saliva and epidermal growth factor receptor in biopsy samples of recurrent aphthous ulcer patients GU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Gang<sup>2</sup>, LIN Mei<sup>3</sup>. (1. Dept. of Oral Medicine, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Dept. of Stomatology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To examine the change of epidermal growth factor(EGF) concentration in saliva of recurrent aphthous ulcer(RAU) patients during the ulcerous and interval period and epidermal growth factor receptor(EGFR) in ulcer biopsy samples. Methods EGF data of the samples, which were 27 saliva samples from RAU gained not only in the ulcerous period but also in interval period and 33 ones from normal persons, were acquired through enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and EGF standard curve. EGFR-RNA date of RAU biopsies, which were 31 biopsy samples from RAU got during the ulcerous period and 35 ones from normal persons, were surveyed by QF-RT-PCR. All RAU samples were obtained under the same level, which were the whole patients were minor aphthous ulcers and their ulcers occurred not over the first four days. All patients and normal persons were selected seriously under the rule of physical situations without any other diseases and histories of using medicines. Results The EGF concentration of saliva in RAU group at ulcer occurrence was higher than that in the interval period and the normal control with a significant test( $F=3.24, P<0.05$ ). The EGF concentration of saliva in RAU group during the interval period was lower than that in the control, which was significant on statistics( $t=2.73, P<0.05$ ). The EGFR-RNA in RAU group at ulcer occurrence was higher than the normal control with a significant test ( $t=3.15, P<0.05$ ). Conclusion It was suggested that the ulcer occasion of RAU patients could be related with the decreasing of EGF in saliva during interval period, and that the ulcer self-cure of RAU patients would be contributed to

the increasing of EGF in saliva and EGFR in ulcer tissues during ulcer occurrence.

[Key words] recurrent aphthous ulcer; epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor

[收稿日期] 2007-06-22; [修回日期] 2007-11-23

[基金项目] 大连市科技计划基金资助项目[大科计发(2000)111号]

[作者简介] 顾 杨(1964-),女,四川人,教授,硕士

[通讯作者] 林 梅, Tel: 028-85503480

复发性阿弗他溃疡(recurrent aphthous ulcer, RAU)是口腔常见病,至今病因不明,治疗效果不佳。无论何种致病因素,最终都导致口腔黏膜上皮局部完整性丧失及溃疡面缓慢修复(比正常人口腔黏膜创伤后溃疡的自愈速度慢),并且这种情形交替进行。口腔黏膜上皮的完整性受许多因素的影响,本研究从表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)着手,分析RAU患者口腔黏膜上皮修复过程中的异常现象。唾液中EGF主要来源于颌下腺和腮腺,可促进细胞的生长和趋化<sup>[1]</sup>。EGFR分布于基底细胞层,其余上皮层表达阴性。EGF与EGFR结合后对细胞的作用表现为:1)促进上皮细胞增殖、分化和迁移;2)促进血管生成;3)增加物质的转运与糖代谢;4)增加前列腺素的合成与释放<sup>[2]</sup>。本研究的目的是探讨RAU患者溃疡期和间隙期的唾液EGF质量浓度的变化,以及溃疡病损区EGFR的表达是否有缺陷。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象的选择

RAU1组(唾液组):选择2000年7月—2001年6月在四川大学华西口腔医院黏膜病科确诊的轻型RAU患者30例为病变组;其中27例在溃疡愈合后复诊。27例患者中男性14例,女性13例;年龄为27~46岁,平均35岁。对照1组:同期在四川大学华西口腔医院工作人员及就诊患者家属中选择健康自愿者33例,男性15例,女性18例;年龄23~52岁,平均38岁。RAU2组(组织活检组):选择2001年7月—2001年10月在四川大学华西口腔医院黏膜病科确诊的轻型RAU患者31例为病变组,其中男性19例,女性12例;年龄32~48岁,平均36岁。对照2组:同期于四川大学华西口腔医院选择在门诊就诊的因拔牙或门诊小手术患者35例,其中男性21例,女性14例;年龄22~37岁,平均34岁。RAU1组和2组均要求临床确诊为轻型RAU,病变状况没有明显差别,口腔中出现溃疡不超过4d,未使用全身药物及局部药物;对照1组和2组要求无复发性口腔溃疡病史。4组研究对象均要求无糖尿病、尿毒症、甲状腺功能亢进、急慢性涎腺炎或涎腺结石、牙周病、干燥综合征等疾病,无其他口腔黏膜病,无头颈部放疗史,未使用过交感神经抑制药物和皮质激素等药物治疗。

### 1.2 样本采集

1.2.1 唾液样本采集 采用静态吸引法采集RAU1组和对照1组唾液,于上午9—10时在四川大学华西

口腔医院黏膜病科进行。受试者取坐位,头端正,不要有吞咽动作,让唾液自然蓄积于口底,防止唾液污染。用一次性空针抽取1 mL唾液装入已消毒的EP管,于-20℃冰箱中保存。

1.2.2 组织样本采集 RAU2组在经患者及家属同意后,在溃疡基底用质量浓度2%利多卡因局部浸润麻醉,于溃疡边缘用眼科剪剪取约0.1 cm×0.2 cm上皮组织,塑料袋密封编号,放入液氮中保存备用。对照2组同样在经患者及家属同意后,在拔牙或手术时剪取0.1 cm×0.2 cm正常黏膜上皮组织,塑料袋密封编号,放入液氮中保存备用。

### 1.3 试验方法

RAU1组患者确诊后(溃疡期)先采集唾液样本,于间隙期复诊时再次采集唾液样本。采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测RAU1组和对照1组唾液样本中EGF质量浓度。采用荧光定量逆转录聚合酶链反应(fluorescent quantitation reverse transcription polymerase chain reaction, FQ-RT-PCR)检测RAU2组和对照2组组织样本中EGFR-RNA的表达情况。所有试验在四川大学华西口腔医学院黏膜实验室与华西医学院基因检测实验室进行。

1.3.1 ELISA法检测EGF质量浓度 1)主要仪器与试剂:EGF ELISA试剂盒,内含标准EGF液、多克隆抗体、染色液、终止液、酶等(Chemicon公司,美国);微量反应板(R&D公司,美国);HTS700型紫外荧光高效分析仪(PE公司,美国)。2)检测方法:将标准EGF液与未知EGF质量浓度的唾液标本分别与兔抗人EGF多克隆抗体发生特异性结合,加入酶标底物,出现颜色反应。测出所有标本的光密度(optical density, OD)值,由标准质量浓度的EGF与其OD值做标准曲线,因为颜色的深浅与EGF质量浓度成正比,所以通过标准曲线可测出唾液标本的EGF质量浓度。

1.3.2 FQ-RT-PCR检测EGFR-RNA的表达 1)实验流程:常规提取活检组织块的总RNA,用荧光分光光度计测定组织块总RNA质量浓度为80 μg/mL,然后通过EGFR-RNA的引物荧光标记进行FQ-RT-PCR分析,测定组织块总RNA中EGFR-RNA的相对含量(拷贝数)。2)主要仪器及试剂:小量组织/细胞总RNA抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司);RT-PCR试剂盒(Roche公司,美国);紫外荧光分光光度计(日本岛津公司);94型电泳仪(Bio-Rad公司,美国);FQ-RT-PCR仪(Roche公司,美国)。3)引物设计:EGFR-RNA的PCR特异性引物设计参见参考文献[3],由成都天泰公司提供。F-Primer 113 120 bp

和R-Primer 113 820 bp; 5端引物序列为5-CTA-TGAGATGGAGGAAGACG-3, 3端引物序列为5-CAGAGGAGGAGTATGTGTGA-3。4)循环程序设定: 首先55℃ 孵育10 min, 95℃ 30 s; 然后变性95℃ 6 s, 退火55℃ 10 s, 延伸72℃ 15 s, 共45个循环。再孵育40℃ 30 s, 95℃ 10 s, 65℃ 10 s, 95℃ 10 s。扩增产物根据荧光显示强度, 与FQ-RT-PCR仪电脑设定的最大信号进行对照, 用该设备的电脑软件计算待测标本EGFR-RNA的相对含量(拷贝数)。5)阴性对照为反应体系不加cDNA模板。

1.4 统计分析

采用SPSS 9.0统计软件进行统计学分析, 两组间比较采用独立样本t检验, 三组间比较采用方差分析, 检验水准为双侧  $\alpha=0.05$ 。

表 1 RAU1组和对照1组唾液EGF质量浓度检测结果 ng/mL)  
Tab 1 EGF in saliva of RAU and control group (ng/mL)

性别	RAU1组溃疡期		RAU1组间隙期		对照1组	
	$\bar{x} \pm s$	范围	$\bar{x} \pm s$	范围	$\bar{x} \pm s$	范围
男性	5.63 $\pm$ 1.41	2.89-7.66	2.69 $\pm$ 0.61	1.84-4.97	2.96 $\pm$ 0.74	2.71-3.44
女性	5.74 $\pm$ 1.52	3.01-8.64	2.81 $\pm$ 0.57	1.73-4.88	3.10 $\pm$ 0.63	2.47-4.29
合计	5.71 $\pm$ 0.82	2.89-8.64	2.77 $\pm$ 0.63	1.73-4.97	3.49 $\pm$ 0.66	2.71-4.29

RAU2组与对照2组的EGFR检测结果分别见图1和图2。

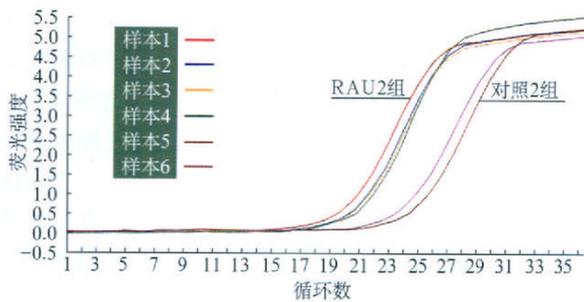


图 1 RAU2组和对照2组EGFR-RNA进入循环状况图

Fig 1 The EGFR-RNA copy numbers of RAU and control group during FQ-RT-PCR circles

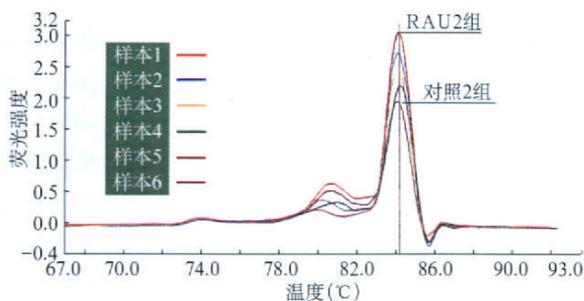


图 2 RAU2组和对照2组EGFR-RNA实际测定峰值图

Fig 2 The EGFR-RNA test numbers of RAU and control group during FQ-RT-PCR circles

图1显示RAU2组起始模板量高, 拷贝数大; 图

2 结果

RAU1组溃疡期、间隙期和对照1组唾液EGF质量浓度检测结果见表1。经统计学检验, RAU1组溃疡期患者唾液EGF质量浓度高于间隙期和对照1组, 有统计学差异( $F=3.24, P<0.05$ ); 而RAU1组间隙期唾液EGF质量浓度低于对照1组( $t=2.73, P<0.05$ )。在EGF质量浓度与性别的关系上, RAU1组溃疡期和间隙期男性与女性的唾液EGF质量浓度无统计学差异( $P>0.05$ ); 对照1组男性与女性的唾液EGF质量浓度也无统计学差异( $P>0.05$ )。在EGF质量浓度与年龄的关系上, RAU1组和对照1组唾液EGF质量浓度与年龄均无相关性, 相关系数分别为 $r=0.03, P=0.33$ ;  $r=0.02, P=0.11$ 。

2表明RAU2组峰值高, 起始模板量大。RAU2组EGFR-RNA的相对平均含量为3.097, 对照2组为1.965, 两组间有统计学差异( $t=3.15, P<0.05$ ), RAU2组EGFR-RNA表达强度高于对照2组。

3 讨论

本研究结果表明, RAU1组溃疡期患者唾液EGF质量浓度高于对照1组( $P<0.05$ ), 可能是人体对溃疡存在时的应答反应, 这与RAU能自愈但比正常黏膜受创伤后自愈速度慢的现象相吻合。Wright等<sup>[4]</sup>认为, 消化道任何溃疡形成后都能诱导干细胞形成新的EGF分泌体系, 分泌大量的EGF, 刺激细胞增殖、再生, 促进溃疡愈合。RAU患者出现溃疡后, 可能在一些炎性介质刺激或者不明因素作用下引起神经体液的调节反应, 促使颌下腺及其他腺体大量分泌EGF<sup>[5]</sup>, 但在什么环节上推动RAU的愈合尚未明确。

RAU1组间隙期患者唾液EGF质量浓度低于对照1组, 笔者推测RAU的发生与唾液EGF质量浓度降低有关, 与其他学者关于胃溃疡与体液EGF质量浓度相关的结论类似<sup>[6]</sup>。唾液中EGF对胃黏膜有保护作用, 颌下腺摘除后胃腔内的EGF减少, 虽然不会发生自发性溃疡, 但黏膜对损伤的敏感性增加, 容易遭受攻击因子的破坏而形成溃疡; 胃腔内给予外源性EGF后, 可预防实验性胃溃疡的发生或者促进胃

溃疡的愈合。胃溃疡患者在溃疡活动期间,唾液中EGF质量浓度明显低下,胃液中EGF质量浓度也较慢性胃炎患者明显降低,提示唾液EGF质量浓度低下可能是消化性溃疡患者易感性增加的原因之一。对RAU患者进行胃镜检查,发现胃、十二指肠存在与口腔溃疡相似的散在小溃疡;也有报道RAU患者发病前有口干、唾液量减少的症状<sup>[7]</sup>。唾液中EGF主要来源于腮腺与颌下腺,头颈部肿瘤放疗后患者口腔黏膜容易出现口腔溃疡,可能与唾液减少或者EGF减少有关<sup>[8]</sup>。

从口腔黏膜上皮细胞层的生长趋向来看,口腔黏膜上皮层次的稳定性取决于基底细胞层增殖分化的速度与角化细胞层脱落的速度相等,当前者变慢和/或后者变快时都会导致口腔黏膜上皮变薄,抵抗力降低,易于发生溃疡。唾液EGF质量浓度升高时,黏膜修复能力加快;降低时基底细胞层增殖分化的速度变慢,溃疡愈合减慢。本研究结果显示RAU患者间隙期唾液EGF质量浓度低于正常人,这提示EGF与口腔溃疡复发性之间存在相关性,但是RAU患者病程长短是否与唾液中EGF质量浓度高低有关,尚待进一步研究。由于影响口腔黏膜上皮生长的因素很多,除EGF外,还有成纤维细胞生长因子b、转化生长因子 $\beta$ 、表皮内五肽等,因此还需深入探讨。

本实验结果表明,RAU患者间隙期唾液EGF质量浓度虽然低于正常人,但在临床实践中恰当使用免疫调节剂、免疫增强剂或免疫抑制剂均能有效减少RAU的发作频率,那么免疫系统是否也参与了EGF的生成呢?虽然有关EGF生成的具体机制还不明确,但是目前可以肯定的是巨噬细胞及其他淋巴细胞和角化细胞都可以内分泌EGF,并与颌下腺和腮腺外分泌EGF并行不悖。另外EGF也可以影响人类白细胞抗原II的表达,后者的表达紊乱与免疫失控有关。笔者推测,免疫制剂可双向调节免疫细胞的活性,可能使EGF的内分泌达到恰当的水平,弥补了唾液EGF的不足,间接缩短了RAU病程和减少溃疡的复发。

口腔中EGFR存在于黏膜上皮和黏膜下结缔组织中。目前认为,一种生长因子可以对应一种或者多种受体,一种受体也可以对应一种或多种生长因子,相互间有不同的亲和力和选择性<sup>[9]</sup>。目前有关这方面的研究虽然很多,但具体机制仍不明朗。有学者在动物实验中发现,EGFR在消化道溃疡愈合期上皮细胞中的表达高于正常对照组<sup>[10]</sup>。本实验中RAU2组EGFR表达强度高于对照2组,且有统计学意义( $P<0.05$ ),推测可能是由于EGFR大量表达有助

于EGF与EGFR大量结合,同时EGFR与转化生长因子 $\alpha$ 等细胞因子的结合增加,加快细胞的分裂与增殖,加快血管形成,从而有利于溃疡愈合。本研究表明轻型RAU患者尚无EGFR表达缺陷。

综上所述,RAU患者口腔溃疡的复发性可能与间隙期唾液EGF质量浓度减少有关;口腔溃疡的自愈性可能与溃疡期唾液EGF质量浓度增加和溃疡区EGFR表达增加有关。

### [参考文献]

- [1] Royce LS, Baum BJ. Physiologic levels of salivary epidermal growth factor stimulate migration of an oral epithelial cell line [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1092(3):401-403.
- [2] Whitcomb SS, Eversole LR, Lindemann RA. Immunohistochemical mapping of epidermal growth-factor receptors in normal human oral soft tissue[J]. *Arch Oral Biol*, 1993, 38(9):823-826.
- [3] Bor MV, Sørensen BS, Rammer P, et al. Calibrated user-friendly reverse transcriptase-PCR assay: Quantitation of epidermal growth factor receptor mRNA[J]. *Clin Chem*, 1998, 44(6 Pt 1):1154-1160.
- [4] Wright NA, Pike C, Elia G. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells[J]. *Nature*, 1990, 343(6253):82-85.
- [5] 张镜如. 生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995:2-5.  
ZHANG Jing-ru. *Physiology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1995:2-5.
- [6] 许春娣, 袁曜宗, 陈殉年, 等. 体液中表皮生长因子水平变化与消化性溃疡愈合的关系[J]. *上海医学*, 2000, 23(5):296-298.  
XU Chun-di, YUAN Yao-zong, CHEN Xun-nian, et al. The relationship between the changes of epidermal growth factor in human digest secretion and the cure of digest system ulcers[J]. *Shanghai Medicine*, 2000, 23(5):296-298.
- [7] 顾杨, 郭荣春, 李红梅, 等. 唾液腺分泌功能在复发性阿弗它性溃疡发病期中变化的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 1996, 14(4):272-273, 282.  
GU Yang, GUO Rong-chun, LI Hong-mei, et al. The research for change of the secretory capacity of salivary gland in RAU [J]. *West China J Stomatol*, 1996, 14(4):272-273, 282.
- [8] Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KH, et al. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000, 89(6):710-716.
- [9] 付小兵, 王德文. 创伤修复学基础[M]. 北京:人民军医出版社, 1997:127-139.  
FU Xiao-bing, WANG De-wen. *The theory basis of wound restores*[M]. Beijing: People's Military Medical Press, 1997:127-139.
- [10] Lee H, Hansson HA, Norström E, et al. Immunoreactivities for epidermal growth factor (EGF) and for EGF receptors in rats with gastric ulcers[J]. *Cell Tissue Res*, 1991, 265(2):211-218.

(本文编辑 吴爱华)