

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.020

Th1 型和 Th2 型细胞因子在口腔扁平苔藓患者外周血中的表达及临床意义

王一敏¹ 周 军^{2△} 傅 升¹ 王 琤¹ 周 冰¹

(1 南京军区福州总医院口腔科 福建 福州 350025; 2 南京军区福州总医院医务部 福建 福州 350025)

摘要 目的:研究口腔扁平苔藓(OLP)患者 Th1 型和 Th2 型细胞因子的表达及临床意义。**方法:**选取 2013 年 1 月至 2014 年 3 月于我院就诊的 21 例充血糜烂型及 14 例光滑型 OLP 患者为研究对象,18 例正常人作为对照组,采用密度梯度离心法对各组外周血单个核细胞进行分离,酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法对各组外周血单个核细胞中的 IL-4 和 IFN- γ 的表达进行检测,逆转录-聚合酶链反应法对各组血清中 IL-4 mRNA 和 IFN- γ mRNA 的表达进行检测。**结果:**与正常对照组相比,OLP 患者 IL-4 mRNA 及蛋白的表达均增高,而 IFN- γ mRNA 及蛋白的表达则降低,差异均有显著统计学意义(均 $P < 0.01$)。充血糜烂型及光滑型 OLP 患者组间比较发现,IL-4 mRNA 和 IFN- γ mRNA 及蛋白的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**OLP 发病机制与 Th1 与 Th2 的表达失衡有关,为临床治疗提供参考。

关键词:Th1 型细胞因子;Th2 型细胞因子;口腔扁平苔藓;外周血

中图分类号:R781.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6877-03

Effect and Clinical Significance of Expression of Th1 and Th2 in Oral Lichen Planus

WANG Yi-min¹, ZHOU Jun^{2△}, FU Sheng¹, WANG Zheng¹, ZHOU Bing¹

(1 Department of Stomatology, Fuzhou General Hospital of Nanjingmilitary region, Fuzhou, Fujian, 350025, China;

2 Medical Administration Division, Fuzhou General Hospital of Nanjingmilitary region, Fuzhou, Fujian, 350025, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the expression of Th1 and Th2 in peripheral blood of oral lichen planus (OLP) and its clinical significance. **Methods:** 21 cases of hyperaemia erosion OLP and 14 cases of smooth OLP patients in our hospital from January 2013 to March 2014 were researched and 18 healthy people were studied as control group. The peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation, the expression of IL-4 mRNA and IFN- γ mRNA in peripheral blood mononuclear cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction method and IL-4 and IFN- γ were tested by ELISA. **Results:** The expression of IL-4 mRNA and the protein was higher in OLP group than in control group, expression of IL-4 mRNA and the protein was lower in OLP group with a statistically significant difference (all $P < 0.01$). However, there were no significant differences in the expression of IL-4 mRNA, IFN- γ mRNA and protein between hyperaemia erosion and smooth OLP patients ($P > 0.05$). **Conclusion:** The pathogenesis of OLP involves the unbalanced expression of Th1 and Th2, and it provides the reference for the clinical treatment.

Key words: Th1 cytokine; Th2 cytokine; Oral lichen planus; Peripheral blood

Chinese Library Classification(CLC): R781.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6877-03

前言

口腔扁平苔藓(Oral Lichen Planus, OLP)是一种口腔黏膜非感染性浅表炎症性疾病,是常见的黏膜角化异常疾病之一,其发病原因不明确且难治愈,易癌变^[1,2]。临床调查显示,OLP 常见于中年群体,女性较多,发病率约为 0.11%-4.0%,仅次于复发性阿弗他溃疡,而癌变率可达 0.14%-3.17%,大量研究结果发现患者的组织渗出液、病损处和唾液等分泌物中的辅助性 T 细胞 1(helper T cell, Th1)与辅助性 T 细胞 2(helper T cell, Th2)失衡,推测其发病机制与 T 淋巴细胞介导的免疫功能有关^[3-5]。白

细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)是由 Th2 细胞产生的细胞因子干扰素,而干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)是 Th1 细胞产生的细胞因子干扰素^[6]。本研究中对正常人与 OLP 患者的外周血中 IL-4 和 IFN- γ 表达水平进行检测,探索 OLP 患者 Th1 型和 Th2 型细胞因子的表达及临床意义。

1 资料和方法

1.1 一般资料

本研究选取 2013 年 1 月至 2014 年 3 月于我院就诊的 35 例经病理确认的 OLP 患者为研究对象。入录参检者 3 月内无用药史,且无免疫性疾病。依据疾病分类标准,将其分为充血糜烂型和光滑型 OLP。充血糜烂型患者 21 例,年龄 19-65 岁,平均年龄(45.4 $\pm$ 5.1),男性 8 例,女性 13 例;光滑型患者 14 例,年龄 21-66 岁,平均年龄(43.8 $\pm$ 3.7),男性 6 例,女性 8 例。18 例正常自愿者为对照组,年龄 21-67 岁,平均年龄(44.8 $\pm$ 4.8),男性 8 例,女性 10 例。三组受试者年龄、性别等一般资料差异

作者简介:王一敏(1966-),女,本科,副主任医师,从事牙体牙周病及口腔黏膜病方面的研究, E-mail:wangyimin1966@126.com

△通讯作者:周军(1967-),男,本科,副主任医师,从事预防医学及医疗管理方面的研究

(收稿日期:2014-05-27 接受日期:2014-06-25)

无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 方法

采用密度梯度离心法对各组外周血单个核细胞进行分离,酶联免疫吸附剂测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法对各组外周血单个核细胞中的 IL-4 和 IFN- γ 的表达进行检测,逆转录-聚合酶链反应法对各组血清中白细胞介素 4 信使核糖核酸(IL-4 mRNA)和干扰素- γ 信使核糖核酸(IFN- γ mRNA)的表达进行检测。

1.2.1 外周血单个核细胞分离 于无菌条件下采集受检者 7 mL 静脉血,5 mL 用枸橼酸钠抗凝,等量 D-Hank's 溶液进行稀释,密度离心法离心分离,进行单个核细胞收集。2 mL 静置 30 min,离心取上清,-70℃ 保存;

1.2.2 ELISA 法测定 IL-4 和 IFN- γ 的表达的检测 采用美国 Sigma 公司免疫试剂盒检测上清液中 IL-4 和 IFN- γ 的含量,灵敏度为 2 pg/mL,测定范围为 2-200 pg/mL,重复 3 次。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应检测 IL-4 mRNA 和 IFN- γ mRNA 表达 使用美国 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂对 1×10^7 个单个核细胞的总 RNA 进行提取,进行逆转录,并用日本 TaKaRa 公司的 Ex-Taq 酶进行 PCR 扩增。IL-4 引物序列:下游:5'-TTTGTATGATCTCCTGTA, 上游:5'-TATGCTGAAA

CTTTGTAGT,401bp 为目的片段,55℃ 为退火温度; β -actin 序列:下游:5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC, 上游:5'-CTC-CATCCTGGCCTCGCTGT,268bp 为目的片段,50℃ 为退火温度;IFN- γ 引物序列:下游:5'-TTTCGCTTCCCTGTTT-TA, 上游:5'-CATTCAGATGTAGCGGATAA,335 bp 为目的片段,57℃ 退火温度。使用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳后,比较 IL-4、 β -actin 和 IFN- γ 的相对密度值,并进行半定量分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件对检测结果进行统计处理及分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,计数资料采用卡方卡方检验, $P<0.05$ 表明差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-4 mRNA 和 IFN- γ mRNA 表达水平的比较

检测结果显示,与对照组相比,IL-4 mRNA 在充血糜烂型和光滑型 OLP 患者体内的表达明显增高,而 IFN- γ mRNA 表达则显著降低,两组患者与对照组的检测结果差异均有统计学意义($P<0.01$)。而充血糜烂型和光滑型患者相比较差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表 1。

表 1 IL-4 mRNA 和 IFN- γ mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Table 1 Comparison of the expression of IL-4 mRNA and IFN- γ mRNA($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别 Groups	例数 Cases	IL-4 mRNA	IFN- γ mRNA
充血糜烂型 Hyperaemia erosion	21	0.569 $\pm$ 0.064 [#]	0.341 $\pm$ 0.073 [#]
光滑型 Smooth	14	0.624 $\pm$ 0.138 [#]	0.294 $\pm$ 0.105 [#]
对照组 Control group	18	0.269 $\pm$ 0.091	0.591 $\pm$ 0.116

注:与对照组比较, $\#P<0.01$ 。

Note: compared with control group, $\#P<0.01$.

2.2 IL-4 和 IFN- γ 表达水平的比较

ELISA 检测结果表明,与对照组相比,IL-4 在 OLP 患者体内的表达较高,而 IFN- γ mRNA 表达显著降低,差异均有

统计学意义($P<0.01$)。而两种不同类型的 OLP 患者组间相比较差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表 2。

表 2 IL-4 和 IFN- γ 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Table 2 Comparison of the expression of IL-4 A and IFN- γ ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别 Groups	例数 Cases	IL-4 mRNA	IFN- γ mRNA
充血糜烂型 Hyperaemia erosion	21	50.569 $\pm$ 0.064 [#]	19.341 $\pm$ 0.073 [#]
光滑型 Smooth	14	52.624 $\pm$ 0.138 [#]	19.294 $\pm$ 0.089 [#]
对照组 Control group	18	32.269 $\pm$ 0.091	31.591 $\pm$ 0.116

注:与对照组比较, $\#P<0.01$ 。

Note: compared with control group, $\#P<0.01$.

2.3 IFN- γ /IL-4 mRNA 和蛋白表达量比值的比较

检测结果显示,与对照组相比,OLP 患者 IFN- γ /IL-4 mRNA 和蛋白表达量的比值明显降低,且 IFN- γ /IL-4 蛋

白表达量呈现相同变化趋势,在患者体内表达明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$);而两种不同类型的 OLP 患者组间相比较差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表 3。

表 3 IFN- γ /IL-4 mRNA 和蛋白表达量比值的比较

Table 3 Comparison of mRNA and protein expression ratio of IFN- γ /IL-4

组别 Groups	例数 Cases	IFN- γ /IL-4	IFN- γ /IL-4 mRNA
充血糜烂型 Hyperaemia erosion	21	0.419 $\pm$ 0.124 [#]	0.458 $\pm$ 0.153 [#]
光滑型 Smooth	14	0.354 $\pm$ 0.127 [#]	0.539 $\pm$ 0.157 [#]
对照组 Control group	18	1.069 $\pm$ 0.392	2.331 $\pm$ 0.531

注:与对照组比较, $\#P<0.01$ 。

Note: compared with control group, $\#P<0.01$.

3 讨论

OLP 是发生于口腔黏膜的常见疾病之一,其病因可能与免疫因素、精神因素、感染因素、内分泌因素等有关,对该病病理机制的探索是相关临床研究的热点。大量相关研究认为其属于自身免疫性疾病的一种,主要是由于患者对自体产生的抗原发生免疫反应从而引起自体组织损伤,且有慢性迁延和反复发作的特点^[78]。人体 Th1 细胞可产生白细胞介素 -2、Th1 型细胞因子干扰素 -gamma、肿瘤坏死因子 -α 三种免疫因子,而最典型的则是 IFN-gamma,不仅参与细胞介导的免疫应答,且与迟发型超敏反应和巨噬细胞的活化有关^[9,12]。而 Th2 细胞则主要产生白细胞介素 -4(IL-4)、IL-5 等,可介导体液免疫、促进抗体产生,并参与嗜酸性粒细胞和 B 细胞的活化和 IgE 的生成^[12-14]。分子免疫学研究结果表明 T 淋巴细胞的 Th1 与 Th2 亚群存在制衡机制,二者可相互调节机体存在水平。当其中一者功能升高、另一亚群功能会相应降低,Th1/Th2 比值发生变化,两个亚群的平衡状态对于机体免疫反应有极其重要的作用^[15,16]。

在本研究中对正常人和 OLP 患者的外周血进行研究,通过比较两者外周血中 IL-4 和 IFN-gamma 表达水平,观察 Th1/Th2 比值平衡在 OLP 发病机制中起到的作用。实验结果发现,与健康对照组相比,IFN-gamma 在 OLP 患者体内表达较低,而 IL-4 表达增高,IFN-gamma/IL-4 值降低,显示 OLP 患者外周血中免疫平衡向 Th2 偏移,属于 Th2 呈现优势的免疫应答^[17]。而相关研究发现 OLP 患者病损部位存在的是 Th1 免疫应答,与比值研究结果不一致^[18]。由此可推设 OLP 患者外周血中发生体液免疫亢进,而免疫复合物引发了病损。而病损处的沉积物可刺激局部细胞的免疫功能,引起病损处细胞免疫功能亢进,OLP 患者免疫功能被破坏。

OLP 临床类型主要可分为光滑型与充血糜烂型,还有斑纹型与瘤型,临床患者还可出现几种病损的更迭与重叠^[19,20]。在本研究中选择了光滑型与充血糜烂型患者为研究对象,结果呈现 Th1/Th2 的表达在两种类型患者体内无统计学差异。推测可能由于 OLP 病程具有反复发作和慢性迁延的特点,而不同分型是介于不同时期的临床表现,患者就诊时处于 OLP 病程的某一阶段,病理变化都存在固有层大量淋巴细胞呈带状浸润。提示无论何种类型 OLP 发病表现,其机制可能都是由于 T 淋巴细胞介导的自身免疫疾病。

综上所述,OLP 发病机制与 Th1 与 Th2 的表达失衡有关,对该病病理机制的探索是相关研究将有助于临床上对于 OLP 的认识并从细胞分子学水平上提供新的治疗思路。

参考文献(References)

- [1] 肖丽婷,邹杰,陶人川,等.人类 β-防御素 2 在口腔扁平苔藓病损中表达的研究[J]. 广西医学,2011,33(5):516-519
- Xiao Li-ting, Zou Jie, Tao Ren-chuan, et al. Study of the Expressions of Human β-defensin-2 in the Oral Epithelium of Patients with Oral Lichen Planus[J]. Guangxi Medical Journal, 2011,33(5):516-519
- [2] Sang T, Xu HM, Yang YJ, et al. Study of tape A behavior in patients with oral lichen planus[J]. Shanghai Journal of Stomatology, 2014,23(1):91-94
- [3] Mahdavi O, Boostani N. Use of low level laser therapy for oral lichen planus: report of two cases[J]. J Dent (Shiraz),2013,14(4): 201-204
- [4] Cheng YS, Jordan L, Rees T, et al. Levels of potential oral cancer salivary mRNA biomarkers in oral cancer patients in remission and oral lichen planus patients [J]. Clin Oral Investig,2014,18(3):985-993
- [5] Sheikh S, Gupta D, Pallagatti S, et al. Role of topical drugs in treatment of oral mucosal diseases. A literature review [J]. N Y State Dent J,2013,79(6):58-64
- [6] Adami GR, Yeung AC, Stucki G, et al. Gene expression based evidence of innate immune response activation in the epithelium with oral lichen planus [J]. Arch Oral Biol,2014,59(3):354-361
- [7] 刘丽,臧磊,吕晓丹,等.Egr-1 在口腔扁平苔藓及口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J].宁夏医科大学学报,2010,32(2):204-206,封 3
- Liu Li, Zang Lei, Lv Xiao-dan, et al. Expression and Significance of Egr-1 in Oral Lichen Planus and Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. Journal of Ningxia Medical University,2010,32(2):204-206,3
- [8] Nafarzadeh S, Ejtehadi S, Amini Shakib P, et al. Comparative study of expression of smad3 in oral lichen planus and normal oral mucosa [J]. Int J Mol Cell Med,2013, 2(4):194-198
- [9] Nafarzadeh S, Jafari S, Bijani A. Assessment of bax and bcl-2 immunoexpression in patients with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma[J]. Int J Mol Cell Med,2013,2(3):136-142
- [10] Divya VC, Sathasivasubramanian S. Estimation of serum and salivary immunoglobulin G and immunoglobulin A in oral pre-cancer: A study in oral submucous fibrosis and oral lichen planus [J]. J Nat Sci Biol Med,2014,5(1): 90-94
- [11] Seyedmajidi M, Shafaei S, Bijani A, et al. VCAM1 and ICAM1 expression in oral lichen planus [J]. Int J Mol Cell Med,2013,2(1): 34-40
- [12] De Rossi SS, Ciarrocca K. Oral Lichen Planus and Lichenoid Mucositis[J]. Dent Clin North Am,2014,58(2):299-313
- [13] López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Sánchez-Siles M. Dental implants in patients with oral lichen planus: a cross-sectional study[J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2014,16(1):107-115
- [14] He J, Cai Y. The over-expression of STAT1 and IFN-gamma in lesions of human oral lichen planus[J]. Journal of Sichuan University Medical Science Edition, 2014,45(1):70-73
- [15] Sang T, Xu HM, Yang YJ, et al. Study of tape A behavior in patients with oral lichen planus [J]. Shanghai Journal of Stomatology,2014,23(1):91-94
- [16] Greaney L, Brennan PA, Kerawala C, et al. Why should I follow up my patients with oral lichen planus and lichenoid reactions? [J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2014,52(4):291-293
- [17] Singh V, Pal M, Gupta S, et al. Plaque control improves the painful symptoms of oral lichen planus gingival lesions. A short-term study [J]. Br Dent J, 2014,216(6): 355
- [18] Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review [J]. J Am Dent Assoc, 2014, 145(1):45-56
- [19] Zargarani M, Jamshidi S, Eshghyari N, et al. Suitability/unsuitability of cell proliferation as an indicator of malignant potential in oral lichen planus: an immunohistochemical study [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013,14(11):6979-6983
- [20] Popovska M, Grchevska L, Popovski V, et al. T-cell subpopulations in lesions of oral lichen planus [J]. Prilozi, 2013,34(2):144-150