

口腔扁平苔藓患者黏膜脱落上皮中人 β 防御素 -2 和白色念珠菌的研究

赵雯雯 毕庆伟 李 岩 鲍 莉 王君芳 崔丽华

摘 要 **目的** 研究口腔扁平苔藓(OLP)患者口腔黏膜脱落上皮中的人 β 防御素 -2(HBD -2)及白色念珠菌的情况。**方法** 运用 RT -PCR 和沙堡琼脂培养基细菌培养方法分析 10 例健康人、70 例口腔扁平苔藓患者(35 例充血糜烂型、35 例斑纹型)口腔黏膜脱落上皮细胞中 HBD -2、白色念珠菌的情况。**结果** 10 例健康对照组中 HBD -2 和白色念珠菌的实验结果均为阴性;70 例病例组患者中,HBD -2 在充血糜烂型组阳性表达率为 45.71% (16/35),在斑纹型组阳性表达率为 22.86% (8/35),HBD -2 在充血糜烂组与在斑纹组中的表达结果比较,差异具有显著性意义($P < 0.05$),HBD -2 在病例组与在健康对照组的表达结果比较,差异具有显著性意义($P < 0.05$);白色念珠菌在充血糜烂型组阳性检测率为 37.14% (13/35),在斑纹型组阳性检测率为 14.29% (5/35),白色念珠菌在充血糜烂组与在斑纹组中的检测结果比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);白色念珠菌在病例组中阳性检测率为 25.71% (18/70),与在正常组中的阳性检测结果(0/10)比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);病例组中 HBD -2 与白色念珠菌的相关关系比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 口腔扁平苔藓患者口腔黏膜脱落上皮中 HBD -2 的表达情况和白色念珠菌的检测情况与扁平苔藓的病变程度有密切的关系,并随病情的加重所得结果均有增高表现。

关键词 口腔扁平苔藓 脱落上皮 人 β 防御素 -2 RT -PCR 白色念珠菌

中图分类号 R781.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.025

Study of Human β - defensin -2 and Candida albicans in Oral Mucosal Exfoliated Epithelial of Oral Lichen Planus. Zhao Wenwen, Bi Qingwei, Li Yan, et al. Heilongjiang Stomatological Disease Center, Heilongjiang 150001, China

Abstract **Objective** To study the expression of HBD -2 and Candida albicans in the oral mucosal exfoliated epithelium of patients with oral lichen planus(OLP). **Methods** Analysis expression of HBD -2 and Candida albicans in oral mucosa exfoliated epithelial cells of 70 cases(35 cases atrophic - erosive and 35 cases reticular)of patients with oral lichen planus and 10 cases of normal with RT -PCR and bacterial culture method. **Results** The expression of HBD -2 and Candida albicans in the 10 normal cases is negative;in the 70 cases,the positive expression of HBD -2 in the reticular lichen planus was 22.86% (8/35). The positive expression of atrophic - erosive of HBD -2 was 45.71% (16/35). Compare the atrophic - erosive with the reticular ,the difference was statistically significant($P < 0.05$). The experimental group compared with control group,the difference was statistically significant($P < 0.05$). The positive expression of Candida albicans in the lichen planus atrophic - erosive was 37.14% (13/35). The positive expression of reticular of Candida albicans was 14.29% (5/35),the difference was statistically significant($P < 0.05$). The positive expression of Candida albicans in the lichen planus was 25.71% (18/70). The experimental group compared with control group,the difference was statistically significant($P < 0.05$). The experimental group HBD -2 with Candida albicans group,the difference was no statistically significant($P > 0.05$). **Conclusion** There is a close relationship between the severity of oral lichen planus with the HBD -2 and Candida albicans expression of exfoliated epithelial in lichen planus,the expression is increase with the aggravation of the disease.

Key words Oral lichen planus; Exfoliated epithelium;HBD -2; RT -PCT; Candida albicans

口腔扁平苔藓(oral lichen planus,OLP)是病因未明的口腔黏膜慢性炎症性疾病,发生率为 0.5% ~ 4.0%,最近的 Meta 分析计算出在一般人群中的发生

率为 1.27%^[1]。糜烂型口腔扁平苔藓属于癌前状态,OLP 患者中的 1% ~ 2% 最终会发展成口腔鳞状细胞癌,其病因及致病机制尚不清楚,可能涉及免疫、遗传、社会心理、感染等因素,其中免疫学异常已得到较多证据的支持,但多数研究表明它是和细胞凋亡有关的自身免疫性疾病^[2]。近年来研究表明,HBD -2(human beta - defensin -2)与口腔扁平苔藓有密切关系,并在口腔扁平苔藓病理组织中有较高表达,但在

基金项目:黑龙江省卫生与计划生育委员会科研课题(2014 - 177)

作者单位:150001 哈尔滨,黑龙江省口腔病防治院

通讯作者:赵雯雯,电子信箱:youyi7707@163.com

口腔黏膜脱落上皮中表达的研究鲜有报道^[3]。脱落上皮检测是一种快速无创伤的病变检查方法,如能在临床中利用脱落上皮检测技术及相关标志物追踪口腔扁平苔藓病变进程,将会对临床治疗产生深远影响。本研究借助脱落上皮检测方法,运用 RT-PCR 和细菌培养技术分析口腔扁平苔藓不同类型中 HBD-2 和白色念珠菌的情况,探讨在口腔扁平苔藓的研究中应用脱落上皮检测技术及相关标志物的可行性。

材料与方法

1. 样本来源:黑龙江省口腔病防治院 2012 年 5 月~2014 年 10 月被临床和病理证实诊断为扁平苔藓的患者,临床上取其口腔黏膜脱落上皮。所有患者均无全身系统性疾病,近 3 个月内未接受激光、激素、免疫调节治疗及外用药治疗,不伴其他口腔感染性疾病,牙体牙周基本正常,残根少,口干亦少见。共采集 70 例样本(男性 24 例,女性 46 例,年龄 12~75 岁),充血糜烂型 35 例,斑纹型 35 例,排除不典型病例。另外收集健康志愿者 10 例为对照组。

2. 主要试剂和仪器:试剂:Easy Taq DNA Polymerase(北京全式金公司),M-MLV Reverse Transcriptase(Promega 公司),100bp DNA Marker /Ladder(上海博彩生物科技有限公司),HBD-2 上游引物(5'-ATGAGGGTCTTGTATCTCCT-3'),下游引物(5'-TATCTTTGGACACCATAGTT-3')(Invitrogen 公司), β -actin, Trizol(Invitrogen 公司),Oligo dT, dNTP(B. M 公司),DEPC 处理水(北京普利来公司),沙堡琼脂培养基各组份(北京奥博星公司),PBS 缓冲液。

3. 样本采集:脱落上皮样本采集方法:上皮标本

采集时间段一般为上午,口腔扁平苔藓患者在治疗前采集。患者取坐位,口腔清洁,患者黏膜病损处干燥,口腔隔湿防止唾液污染,头前倾底位,张口,用刮舌板刮取患处 5~7 次,将脱落上皮放入含有 PBS 液的无菌试管中,重复取样本 3 次。置于 -80℃ 冰箱保存。

4. 唾液培养:唾液样本培养方法:取全唾液 100 μ l,用 900 μ l 无菌生理盐水稀释,取 500 μ l 稀释后样本接种在平板培养基上;放入 37℃ 培养箱 48h;计算菌落数观察真菌感染结果。

5. RT-PCR 法检测 HBD-2 的表达:从脱落上皮细胞 PBS 悬液中提取总 RNA,测出浓度,取每个样品 1.5 μ g 反转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行聚合酶链式反应,将扩增后的产物加入到 2% 的琼脂糖凝胶中,以 5V/cm 电泳约 40min 后在数码成像系统中记录 PCR 结果。结果判断以出现肉眼可见的荧光条带为阳性。

6. 统计学方法:数据应用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析,用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HBD-2 在口腔扁平苔藓口腔黏膜脱落上皮中的表达:充血糜烂型扁平苔藓:本组 35 例口腔脱落上皮中,检测出 HBD-2 阳性表达数为 16 例,表达率 45.71% (16/35),并且表达强度相对较高(图 1);斑纹型扁平苔藓:本组 35 例口腔脱落上皮中,检测出 HBD-2 阳性表达数为 8 例,表达率 22.86% (8/35),并且表达强度相对较低(图 2);正常组织中无阳性表达(0/10,图 3);HBD-2 在充血糜烂型与斑纹型中表达结果比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$);HBD-2 在病例组与正常组中表达结果比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

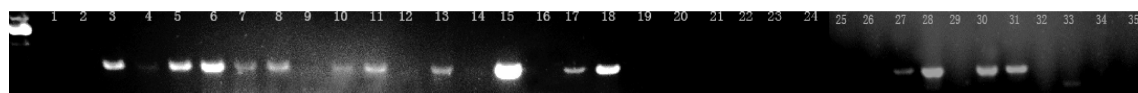


图 1 HBD-2 在口腔扁平苔藓患者中糜烂组的表达

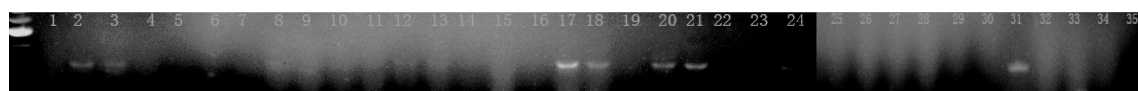


图 2 HBD-2 在口腔扁平苔藓患者中斑纹组的表达

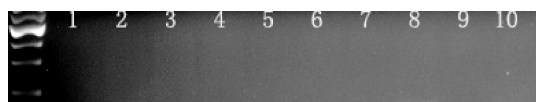


图 3 HBD-2 在正常组织中的表达情况

2. 白色念珠菌在口腔扁平苔藓口腔黏膜脱落上皮中的检测:充血糜烂型扁平苔藓:本组 35 例口腔脱落上皮中,检测出白色念珠菌阳性为 13 例,阳性率 37.14% (13/35);斑纹型扁平苔藓:本组 35 例口腔

脱落上皮中,检测出白色念珠菌阳性为 5 例,阳性率 14.29% (5/35);正常组织中白色念珠菌检测无阳性 (0/10);白色念珠菌在充血糜烂型与斑纹型中检测

结果比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);白色念珠菌在病例组与正常组中检测结果比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$,表 1)。

表 1 HBD-2 和白色念珠菌在口腔扁平苔藓中的情况

组别	n	HBD-2 的表达			白色念珠菌的检测		
		(-)	(+)	阳性率 (%)	(-)	(+)	阳性率 (%)
糜烂型扁平苔藓	35	19	16	45.71	22	13	37.14
斑纹型扁平苔藓	35	27	8	22.86	30	5	14.29
正常组	10	10	0	0	10	0	0

糜烂型与斑纹型中 HBD-2、白色念珠菌的比较, $P < 0.05$

3. HBD-2 和白色念珠菌的相关关系: HBD-2 表达的 24 例扁平苔藓组织中:白色念珠菌检测阳性为 8 例, HBD-2 未有表达的 46 例扁平苔藓组织中:白色念珠菌检测阴性为 36 例, HBD-2 和白色念珠菌的相关关系比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

讨 论

防御素是先天性和获得性免疫系统的重要组成部分,是一种具有强效广谱抗菌性(包括革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌)的抗微生物肽,可以调节细胞免疫和体液免疫,在机体的抗感染等非特异性免疫功能中具有重要作用,参与机体的获得性免疫反应。防御素家族之一的人 β 防御素-2 (HBD-2) 主要存在于上皮细胞中。肖丽婷等^[3]、Abiko 等^[4]观察到,在口腔扁平苔藓、口腔白斑和口腔念珠菌感染的病损组织中 HBD-2 表达增强,并且 HBD-2 的强阳性免疫染色出现在上皮的角化层和颗粒层。但是, HBD-2 的表达受各种炎性介质或细胞因子刺激也会发生明显变化,研究报道 IL-1、TNF- α 、白色念珠菌等刺激因素诱导 HBD-2 基因表达上调,因有抗有氧菌、厌氧菌、念珠菌的特性, HBD-2 在牙周病和念珠菌病治疗中起到重要的积极作用^[5]。

牙龈炎、慢性牙周炎患者唾液和龈沟液、炎症腺体均出现过 HBD-2 的高表达,在肿瘤组织中也有 HBD-2 的阳性表达^[6-8]。Kamino 等^[9]研究发现 HBD-2 会抑制肿瘤生长,去甲基化或基因转染会引起人 β 防御素-2 的表达增强,进而提出了治疗口腔癌可能有效的方法。Sawaki 等^[10]也报道了口腔鳞状细胞癌组织有 HBD-2 存在并且其浓度水平较高,部分 HBD-2 浓度高的患者术后预后较好,有些浓度低的患者可发生 3 年内转移和复发,结果说明 HBD-2 在抗肿瘤过程中起到了积极作用。

口腔扁平苔藓(OLP)、口腔苔藓样病变(OLL)和

口腔白斑(OL)是可能癌变的口腔疾病,其中念珠菌定植是常见的,朱建华等^[11]研究发现白色念珠菌在口腔扁平苔藓不同类型中均有阳性表现,随着病情加重阳性检测率增加。Bokor-Bratic 等^[12]研究表明白色念珠菌与口腔扁平苔藓关系密切,义齿、唾液 pH 值、降压药、吸烟等均与 OLP 患者口腔念珠菌感染相关。Jainkittivong 等^[13]研究发现 OLP 患者唾液培养念珠菌阳性检测率高达 76.7%,同时也对应用类固醇和相关的风险因素(药物、义齿)会诱导念珠菌生长的观点给予支持。念珠菌属已证明具有从乙醇氧化和葡萄糖发酵过程中产生乙醛的能力^[14,15]。Gainza-Cirauqi 等^[16]研究发现在念珠菌感染的口腔疾病中检测到乙醛,乙醛会促进上皮异常增生和口腔癌的发生,研究结果表明白色念珠菌可以分离出大量乙醛,吸烟和饮酒会促使乙醛水平上调,导致 OLP 的恶变。

HBD-2 的表达主要集中在上皮的角化层和颗粒层,笔者分析在上皮脱落组织中也可能存在 HBD-2 表达,并且根据 HBD-2 在病变组织中的积极表现,推测在口腔扁平苔藓病变脱落上皮中检测出的 HBD-2 的表达情况或许可以反映出病变的严重程度。通过分析本研究的结果,可发现病例组 HBD-2 和白色念珠菌的阳性结果显著高于正常组,与肖丽婷等和朱建华等的研究结果一致^[3,11]。充血糜烂型口腔扁平苔藓中 HBD-2 和白色念珠菌阳性结果均高于斑纹型,结果比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),分析 HBD-2 和白色念珠菌是伴随炎症或感染等进展程度而表现出反应强弱,只是由于口腔环境复杂及口腔脱落上皮中细胞成分较少, HBD-2 的表达准确性会受到影响,白色念珠菌与口腔扁平苔藓发病机制的关系也没有明确指出,未来研究中通过提高标本提纯技术和仪器检测敏感度,或许能收集到更准

确的数据。

白色念珠菌作为生理菌群的一部分,停留在上皮表面,人 β -防御素(HBDS)又是宿主在黏膜表面防御的重要组成部分。Steubesand 等^[17]研究表明,念珠菌性食管炎中 HBD-2 和 HBD-3 表达被上调,分析白色念珠菌可能激活 NF- κ B 和 AP-1 诱导 HBD-2 和 HBD-3 表达的上调。在 Gácsér 等^[18]研究中,调查白色念珠菌可以通过诱导防御素,刺激 HBD-2 的阳性表达,研究强调了上皮细胞局部产生的 β 、 α 防御素和中性粒细胞在全身抗真菌防御中的重要作用。虽然有研究提示了白色念珠菌与 HBD-2 存在一定相关性,但是本研究可能是由于样本量的限制,没有发现 HBD-2 与白色念珠菌的相互关系,对于 HBD-2 是否是由白色念珠菌诱导表达也没有给出数据支持。

利用脱落上皮检测技术对口腔扁平苔藓进行的研究很少见,通过本实验可以初步说明,脱落上皮检测技术在口腔扁平苔藓病损处进行相关指标的检查是可行的,也提示在脱落上皮检测技术中或许可以把 HBD-2 作为一个检测指标来评估口腔扁平苔藓的病变程度。本研究发现口腔脱落上皮中 HBD-2 表达水平和病变处白色念珠菌的变化与口腔扁平苔藓临床病理分型呈一定相关性,提示口腔脱落上皮中 HBD-2 的表达情况可能反映口腔扁平苔藓的病变程度,通过对脱落上皮中 HBD-2 的表达分析,笔者希望将脱落上皮技术纳入到口腔扁平苔藓病理检查范畴中,为口腔扁平苔藓临床早期诊断及治疗提供快速、无创的检测方式,同时也希望为这种检测方式找到合适的标志物。由于方法和样本量的局限,通过检测口腔黏膜脱落上皮 HBD-2 不同水平来评估该类感染性疾病的进展程度等方面有待于深入研究。

参考文献

- 1 Carrozzo M. How common is oral lichen planus? [J]. Evidence - Based Den, 2008, 9(4): 112 - 113
- 2 Georgakopoulou EA, Achdari MD, Achdari M, et al. Oral lichen planus as a preneoplastic inflammatory model [J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 759626
- 3 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]. 广西医学杂志, 2011, 33: 516 - 519
- 4 Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi T, et al. Upregulation of human beta - defensin - 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. an immunohistochemical study [J]. Pathol Res Pract, 2002, 198(8): 537 - 542

- 5 Joly S, Maze C, McCray PB Jr, et al. Human beta - defensins 2 and 3 demonstrate strain - selective activity against oral microorganisms [J]. Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1024 - 1029
- 6 王天, 陶人川. 人类防御素 - 2 在舍格伦综合征患者中的表达及其意义 [J]. 国际口腔医学杂志, 2013, 40(2): 148 - 151
- 7 Dommisch H, Açı Y, Dunsche A, et al. Differential gene expression of human β -defensins (hBD-1, -2, -3) in inflammatory gingival diseases [J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(3): 186 - 190
- 8 Pereira AL, Holzhausen M, Franco GC, et al. Human β -defensin 2 and protease activated receptor - 2 expression in patients with chronic periodontitis [J]. Arch Oral Biol, 2012, 57(12): 1609 - 1614
- 9 Yoshitaka K, Yoshihito K, Osamu U, et al. HBD - 2 is downregulated in oral carcinoma cells by DNA hypermethylation, and increased expression of hBD - 2 by DNA demethylation and gene transfection inhibits cell proliferation and invasion [J]. Oncol Rep, 2014, 32(2): 462 - 468
- 10 Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, et al. High concentration of β -defensin - 2 in oral squamous cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2002, 22(4): 2103 - 2107
- 11 朱建华, 赵雯雯, 毕庆伟, 等. 口腔扁平苔藓与念珠菌感染相关性研究 [J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 97 - 98
- 12 Bokor - Bratic M, Cankovic M, Dragnic N. Unstimulated whole salivary flow rate and anxiolytics intake are independently associated with oral Candida infection in patients with oral lichen planus [J]. Eur J Oral Sci, 2013, 121(5): 427 - 33
- 13 Jainkittivong A, Kuvatanasuchati J, Pipattanagovit P, et al. Candida in oral lichen planus patients undergoing topical steroid therapy [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007, 104(1): 61 - 66
- 14 Nieminen MT, Uttamo J, Salaspuro M, et al. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non - Candida albicans yeasts in vitro [J]. Oral Oncol, 2009, 45: e245 - e248
- 15 Uttamo J, Siikala E, Kaihovaara P, et al. Chronic candidosis and oral cancer in APECED - patients: production of carcinogenic acetaldehyde from glucose and ethanol by Candida albicans [J]. Int J Cancer, 2009, 124: 754 - 756
- 16 Gainza - Cirauqui ML, Nieminen MT, Novak Frazer L, et al. Production of carcinogenic acetaldehyde by Candida albicans from patients with potentially malignant oralmucosal disorders [J]. J Oral Pathol Med, 2013, 42(3): 243 - 249
- 17 Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, et al. The expression of the beta - defensins hBD - 2 and hBD - 3 is differentially regulated by NF - kappaB and MAPK/AP - 1 pathways in an in vitro model of Candida esophagitis [J]. BMC Immunol, 2009, 12: 10: 36
- 18 Gácsér A, Tiszlavicz Z, Németh T, et al. Induction of human defensins by intestinal Caco - 2 cells after interactions with opportunistic Candida species [J]. Microbes Infect, 2014, 16(1): 80 - 85

(收稿日期: 2015 - 10 - 19)

(修回日期: 2015 - 12 - 15)