

[文章编号] 1000-1182(2011)02-0179-04

口腔扁平苔藓病损区白细胞介素12p40 和干扰素- γ 的表达及意义

潘玉霞^{1,2} 蔡扬¹ 余红兵³

(1.贵阳医学院附属医院 口腔科, 贵阳 550004; 2.深圳市南山人民医院 口腔科, 深圳 518052;
3.深圳市南山区慢性病防治院 口腔科, 深圳 518052)

[摘要] 目的 探讨白细胞介素12p40(IL-12p40)及干扰素- γ (IFN- γ)在口腔扁平苔藓(OLP)病损形成及发展中的意义。方法 正常口腔黏膜组织11例, OLP组织43例, 采用免疫组织化学Envision二步法检测IL-12p40和IFN- γ 的表达情况, 分析其与OLP患者临床病理特征的关系。结果 1)OLP组IL-12p40与IFN- γ 的阳性表达率均高于正常对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。2)在OLP组中, IL-12p40阳性表达率在IFN- γ 阳性组高于IFN- γ 阴性组, 差异有统计学意义($\chi^2=5.828$, $P=0.016$), IFN- γ 和IL-12p40表达之间存在正相关关系($r=0.357$, $P=0.019$)。3)IL-12p40的阳性表达率在病程短于6个月组高于病程长于6个月组($\chi^2=7.935$, $P=0.005$); 基底细胞液化程度高分组中的IFN- γ 阳性表达率高于低分组($\chi^2=9.070$, $P=0.011$)。结论 IL-12可能通过促进典型Th1型细胞因子IFN- γ 的产生参与了OLP病损区的病理损伤过程, 在OLP局部病损形成初始阶段起到关键作用。

[关键词] 口腔扁平苔藓; 细胞因子; 免疫组织化学

[中图分类号] R 781.5 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.02.020

Expression of interleukin-12p40 and interferon- γ in local lesions of human oral lichen planus PAN Yu-xia^{1,2}, CAI Yang¹, YU Hong-bing³. (1. Dept. of Stomatology, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Stomatology, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518052, China; 3. Dept. of Stomatology, Shenzhen Nanshan Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518052, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the significance of cytokine interleukin-12p40(IL-12p40) and interferon- γ (IFN- γ) in tissues formation and development of human oral lichen planus(OLP). **Methods** The tissues of 11 cases of normal oral epithelium and 43 cases of OLP were investigated for the expression of IL-12p40 and IFN- γ proteins by using Envision two-step immunohistochemistry. The correlations between the expressions of these two cytokines, and their clinical and pathological significance in OLP were analyzed. **Results** 1)IL-12p40 and IFN- γ proteins were up-regulated in OLP comparing with that in normal oral mucosa and there was statistical significance between their difference($P<0.05$). 2)The percentage of positive IL-12p40 staining in OLP of IFN- γ positive group was higher than IFN- γ negative group and there was statistical significance between their difference($\chi^2=5.828$, $P=0.016$). A positive correlation was found between IL-12p40 and IFN- γ proteins in OLP(Spearman $r=0.357$, $P=0.019$). 3)The percentage of positive IL-12p40 staining in OLP with short course(<6 months) was higher than that in OLP with long course(≥ 6 months; $\chi^2=7.935$, $P=0.005$), and a significant association was found between IFN- γ over expression and the degeneration of base cells in OLP lesions($\chi^2=9.070$, $P=0.011$). **Conclusion** These results indicate that at the primary phase of OLP, IL-12 may drive the pathological destruction in OLP lesions by elevating IFN- γ protein locally. IFN- γ may play an important role for the pathological destruction in OLP lesions.

[Key words] oral lichen planus; cytokine; immunohistochemistry

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是口腔

黏膜慢性非感染性炎症性疾病, 免疫异常是其重要的发病因素。研究^[1]表明: CD4⁺T细胞中的Th1和Th2亚群之间的平衡状态尤为重要。近年来发现: 干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)作为典型Th1型细胞因子在OLP病损区表达上调。白细胞介素-12(interleukin-12, IL-12)能促使Th细胞向Th1方向分化, 并促进Th1细

[收稿日期] 2010-08-19; [修回日期] 2010-12-21

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目(省合字2009-38)

[作者简介] 潘玉霞(1980—), 女, 湖北人, 住院医师, 硕士

[通讯作者] 蔡扬, Tel: 0851-6774432

胞分泌IFN- γ ,是决定Th细胞分化方向的关键因素^[2]。本研究通过了解OLP局部病损中IL-12蛋白的功能亚基之一IL-12p40蛋白的表达,探讨其与OLP局部病损IFN- γ 表达间的相关性及其在OLP病损形成中的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

研究标本来自贵阳医学院附属医院口腔内科,选择2005—2008年经病理确诊的OLP组织43例,其中男17例,女26例;糜烂型13例,非糜烂型30例;病程小于6月24例,病程大于6月19例。所有患者均不伴皮损,无系统性疾病及免疫性疾病,且未经任何治疗。11例正常对照组为外伤清创的口腔黏膜。所有标本经10%甲醛溶液固定,石蜡包埋,常规苏木精-伊红染色及严格的病理诊断。

1.2 研究方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人IFN- γ 多克隆抗体(BA0952)、兔抗人IL-12p40克隆抗体(BA0563)、0.02 mol·L⁻¹ PBS缓冲液、0.1 mol·L⁻¹枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)均购自武汉博士德生物工程有限公司,Envision二步法免疫组化试剂盒购自丹麦DAKO公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 按Envision二步法步骤进行,一抗工作浓度分别为IFN- γ (1:100)、IL-12p40(1:150)。每批染色用PBS代替一抗作阴性对照及已知阳性片作阳性对照。

1.3 结果观察

1.3.1 苏木精-伊红染色片 参考张筱林^[3]提出的标准对OLP病损淋巴细胞浸润程度和基底细胞液化程度分别进行评分:固有层淋巴细胞带浅、窄,细胞分布密度低,计1分;淋巴细胞带浅、窄,但细胞分布密度密集或淋巴细胞带宽而细胞分布密度低,计2分;淋巴细胞带宽且细胞分布密集,计3分。基底细胞中出现水肿,计1分;出现破损、液化退变或基底细胞层下方出现小裂隙,计2分;基底细胞层下方有水疱形成,计3分。

1.3.2 免疫组织化学染色结果判定 IFN- γ 、IL-12p40染色以细胞膜、细胞质出现明确棕黄色或淡黄色颗粒为阳性细胞。每张切片采用盲法随机选择5个高倍视野($\times 400$),每个视野计数100个细胞,至少计数500个细胞,计数阳性细胞百分比,取5个视野的平均数参照文献^[4]做染色分级,IL-12p40阳性细胞数占上皮细胞总数 $<20\%$,计1分; $20\% \sim 50\%$,计2分; $>50\%$,计3分。IFN- γ 阳性细胞数占总淋巴细胞数 $<10\%$,计1分; $10\% \sim 30\%$,计2分; $>30\%$,计3分。按染色颜色深浅,阳性细胞表达强度可分为

3级,浅黄色计1分,深黄色计2分,褐色计3分。每张切片的最终分数按阳性率和表达强度2个参数的乘积来计算,0~1分为阴性(-),2~5分为阳性(+),6~9分为强阳性(++)。阳性、强阳性都归为阳性来计算。

1.4 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件进行分析,率的比较采用卡方检验及Fisher's确切概率法。相关分析采用Spearman相关分析及秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OLP病理改变情况

苏木精-伊红染色切片观察结果显示:43例OLP组织均有不同程度淋巴细胞浸润和基底细胞液化的病理改变。其中淋巴细胞浸润程度为1分的OLP组织13例、2分20例、3分10例,基底细胞液化程度为1分的OLP组织有25例,2分的有12例,3分有6例(图1、2)。

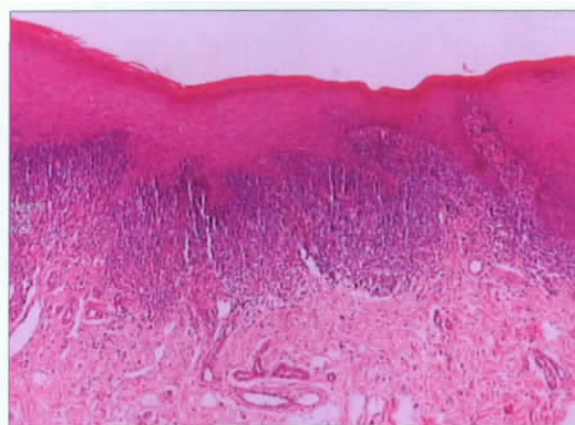


图1 淋巴细胞浸润程度3分 HE $\times 100$

Fig 1 Accounting three scores of lymphocyte in tissue HE $\times 100$

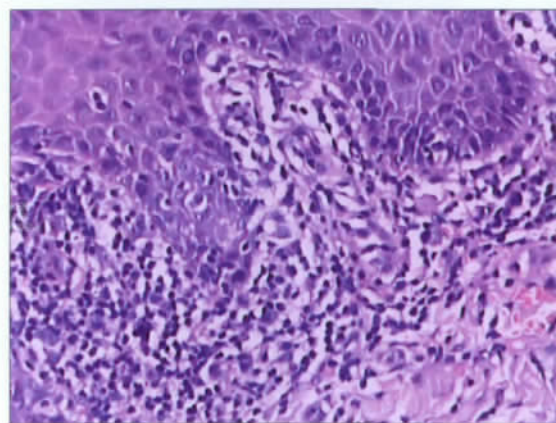


图2 基底细胞浸润程度3分 HE $\times 400$

Fig 2 Accounting three scores of base liquefaction cells in tissue HE $\times 400$

Spearman相关分析显示:OLP病损区淋巴细胞

浸润程度与基底细胞液化程度之间存在正相关关系($r=0.535$, $P<0.05$, 表1)。

表 1 OLP病理改变程度相关性分析

Tab 1 The connection analysis of OLP pathological characteristics

淋巴细胞 浸润	基底细胞液化			合计
	1	2	3	
1	11	1	1	13
2	12	6	2	20
3	2	5	3	10
合计	25	12	6	43

2.2 IL-12p40和IFN-γ表达情况

IL-12p40在正常口腔黏膜组中的阳性表达率为27.27%(3/11), 在OLP组中的阳性表达率为65.12%(28/43), 阳性细胞主要是上皮的角质形成细胞和部分形状呈蟹足状的朗格罕氏细胞(图3), 2组间差异有统计学意义($P=0.024$)。IFN-γ在正常口腔黏膜阴性表达, 在OLP组织中阳性表达率为69.77%(30/43), 阳性细胞为固有层淋巴细胞(图4), 2组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

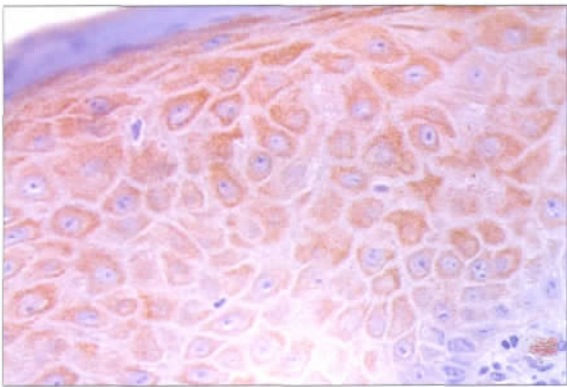


图 3 IL-12p40在OLP组织中的阳性表达 Envision ×400
Fig 3 Positive expression of IL-12p40 in OLP tissue Envision ×400

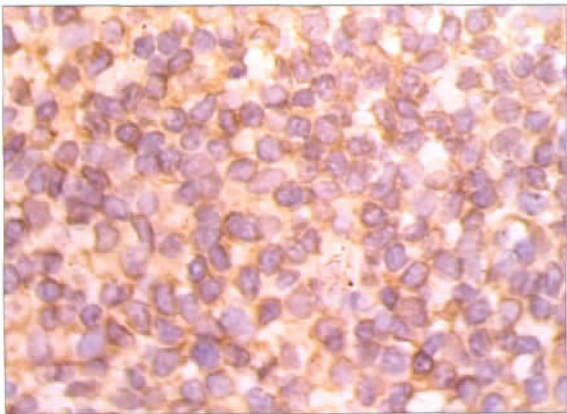


图 4 IFN-γ在OLP组织中的阳性表达 Envision ×400
Fig 4 Positive expression of IFN-γ in OLP tissue Envision ×400

2.3 IL-12p40、IFN-γ表达与OLP临床病理特征相关性

IFN-γ阳性表达率在基底细胞液化程度高分组高于低分组($\chi^2=9.070$, $P=0.011$); IL-12p40阳性表达率在短病程组(<6个月)高于长病程组(≥ 6 个月), 2组间差异有统计学意义($\chi^2=7.935$, $P=0.005$); 但IL-12p40及IFN-γ阳性表达率在不同临床类型、不同淋巴细胞浸润程度OLP组中差异无统计学意义($P>0.05$, 表2)。

表 2 IL-12p40、IFN-γ表达与OLP临床和病理特征的相关性分析

Tab 2 The relational analysis IL-12p40 and IFN-γ expressions and clinic pathological characteristics of OLP

临床病理特征	例数	IL-12p40表达		IFN-γ表达	
		阳性例数	P值	阳性例数	P值
临床类型			0.307		0.439
非糜烂型	30	21		22	
糜烂型	13	7		8	
病程			0.005*		0.131
<6个月	24	20		19	
≥ 6 个月	19	8		11	
淋巴细胞浸润			0.915		0.713
1	13	8		8	
2	20	13		15	
3	10	7		7	
基底细胞液化			0.843		0.011*
1	25	17		13	
2	12	7		11	
3	6	4		6	

注: * $P<0.05$ 。

2.4 IL-12p40与IFN-γ表达的相关性分析

IL-12p40阳性表达率在IFN-γ阳性的OLP组为76.67%(23/30), 在IFN-γ阴性的OLP组为38.46%(5/13), 2组间差异有统计学意义($\chi^2=5.828$, $P=0.016$); Spearman相关分析显示: IFN-γ和IL-12p40表达间存在正相关关系($r=0.357$, $P=0.019$)。

3 讨论

人类Th1细胞主要产生Th1型细胞因子IFN-γ、IL-2、肿瘤坏死因子-β, 主要介导细胞免疫应答。其中IFN-γ是典型的Th1型细胞因子。Th1细胞和Th1型细胞因子亚群功能升高主要表现为细胞免疫亢进, 出现以单个核细胞浸润为主的炎症反应或(和)特异性的细胞毒作用。

研究表明：在IFN- γ OLP局部组织中表达升高，但其高表达的调控机制仍不清楚。IL-12是决定Th细胞分化方向的关键因素之一，IL-12由抗原呈递细胞分泌，是一个相对分子质量为 7.0×10^4 的异二聚体细胞因子，由 4.0×10^4 (p40)和 3.5×10^4 (p35)2条多肽链组成，IL-12p35和IL-12p40亚单位必须在同一细胞表达才能产生具有生物活性的异二聚体IL-12p70单体^[5]。IL-12p35亚单位在许多细胞中持续低表达，而IL-12p40受抗原呈递细胞诱导表达，IL-12p40的存在是IL-12蛋白发挥生物活性的必要条件，因此测定IL-12p40亚基能间接反映IL-12蛋白的表达水平。

在本研究中，与正常口腔黏膜相比，OLP局部病损中存在IFN- γ 蛋白表达的上调，与目前研究报道一致^[6]。IFN- γ 阳性细胞主要为近基底膜的淋巴细胞，与OLP病损中CD4⁺T细胞分布基本一致。IFN- γ 阳性表达率在基底细胞液化程度高分组高于低分组($\chi^2=9.070$, $P=0.011$)，提示IFN- γ 可能参与了OLP病损区病理损伤的过程。目前已有研究充分证实：IFN- γ 在Th1细胞和淋巴细胞毒细胞识别抗原、促发角质细胞的凋亡中起到关键的作用，IFN- γ 可以诱导凋亡相关蛋白Fas抗原的表达，通过促角质形成细胞凋亡而在OLP病损基底细胞液化形成中起到一定的作用。

IL-12是促使Th0细胞向Th1细胞方向分化的关键细胞因子，主要由抗原呈递细胞分泌，IL-12p40作为功能亚基之一，是IL-12发挥生物学功能的必要条件。本研究中，OLP病损中IL-12p40阳性表达率65.12%(28/43)，而正常口腔黏膜组织IL-12p40阳性表达率仅为27.27%(3/11)，OLP病损中IL-12p40蛋白阳性表达率明显高于正常口腔黏膜，这一研究结果与丁政云等^[7]在皮肤扁平苔藓中的研究结果基本一致。

本研究结果中，OLP病损上皮角质形成细胞表达IL-12p40，推测OLP上皮的角质形成细胞在IFN- γ 等细胞因子作用下被激活，激活的角质形成细胞作为抗原呈递细胞分泌细胞因子IL-12参与局部免疫应答。分析IL-12p40与IFN- γ 阳性表达的相关性发现：IFN- γ 的阳性表达率在IL-12p40阳性表达组明显高于IL-12p40阴性表达组。Spearman相关分析显示：IL-12p40与IFN- γ 阳性表达间存在正相关关系，提示在OLP局部IL-12p40对IFN- γ 的生成可能起到正向调节作用。推测：当口腔黏膜局部受到抗原攻击，

上皮角质形成细胞等抗原呈递细胞被活化后分泌IL-12诱导Th0细胞向Th1方向分化、促进IFN- γ 等Th1型细胞因子的形成从而加重和延续局部免疫应答。本研究中IL-12p40在OLP中阳性表达率与病程相关，IL-12p40阳性表达率在病程短于6个月的OLP高于病程长于6个月的OLP($\chi^2=7.935$, $P=0.005$)。提示：IL-12在病损形成的早期能够诱导Th1细胞的分化，从而，为IFN- γ 等Th1型细胞因子的定植提供先决条件。

本研究结果提示：IL-12可能通过诱导Th细胞向Th1细胞方向分化，促进典型Th1型细胞因子IFN- γ 的产生，参与了病损区病理损伤的过程，在OLP病损形成初始阶段起到重要作用。

[参考文献]

- [1] Bai J, Lin M, Zeng X, et al. Association of polymorphisms in the human IFN- γ and IL-4 gene with oral lichen planus: A study in an ethnic Chinese cohort[J]. J Interferon Cytokine Res, 2008, 28(6) 351-358.
- [2] Dickensheets HL, Freeman SL, Donnelly RP. Interleukin-12 differentially regulates expression of IFN- γ and interleukin-2 in human T lymphoblasts[J]. J Interferon Cytokine Res, 2000, 20(10) 897-905.
- [3] 张筱林. 口腔扁平苔藓的组织病理学分析[J]. 中华口腔科学杂志, 1984, 19(1) 9-12.
ZHANG Xiao-lin. The analysis of tissular and pathological characteristics[J]. Chin J Stomatol, 1984, 19(1) 9-12.
- [4] Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, et al. Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. Cancer Res, 1999, 59(9) 2041-2044.
- [5] 赵武述. 免疫平衡研究及其临床意义[M]. 北京：科学出版社，2005 90-106.
ZHAO Wu-shu. The investigation and clinical significance of immunologic balance[M]. Beijing: Science Publishing Company, 2005: 90-106.
- [6] Tao XA, Li CY, Rhodus NL, et al. Simultaneous detection of IFN- γ and IL-4 in lesional tissues and whole unstimulated saliva from patients with oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2008, 37(2) 83-87.
- [7] 丁政云, 李鑫, 蔡丽, 等. 扁平苔藓皮损中白介素12p40的表达及外周血T细胞免疫功能检测[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(7) 403-404.
DING Zheng-yun, LI Xin, CAI Li, et al. Expression of IL-12p40 in local lesions and detection of immunological function of peripheral blood T lymphocyte of lichen planus[J]. Chin J Dermatol, 2006, 39(7) 403-404.

(本文编辑 汤亚玲)