

口腔扁平苔藓病损区 STAT1 和 IFN- γ 的表达*

何娟^{1,2}, 蔡扬^{1△}

1. 贵阳医学院附属医院 口腔内科 (贵阳 550004); 2. 贵阳中医学院第二附属医院 口腔科 (贵阳 550003)

【摘要】目的 探讨信号转导与转录激活因子 1(STAT1)、干扰素- γ (IFN- γ)在口腔扁平苔藓(OLP)病损发生发展中的作用。**方法** 48 例 OLP 及 10 例正常口腔黏膜石蜡包埋组织,采用免疫组化 SABC 法检测相应组织中 STAT1 和 IFN- γ 蛋白的表达情况,分析其与 OLP 患者临床病理特征的相关性。**结果** ①STAT1、IFN- γ 在 OLP 病损区表达阳性率均高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。②OLP 病损区 STAT1 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($\chi^2=5.042, P<0.05$);IFN- γ 和 STAT1 表达之间存在正相关关系($r=0.324, P<0.05$)。③ STAT1 阳性表达率在病程短于 6 个月 OLP 组高于病程长于 6 个月 OLP 组,差异有统计学意义($\chi^2=5.077, P<0.05$);IFN- γ 阳性表达与基底细胞液化程度呈负相关($r=-0.388, P<0.05$)。**结论** OLP 局部组织中存在 STAT1 和 IFN- γ 蛋白高表达,IFN- γ /STAT1 通路在 OLP 局部病损形成过程中起到推动作用。

【关键词】 口腔扁平苔藓 信号转导与转录激活因子 1 干扰素- γ 免疫组织化学

The Over-expression of STAT1 and IFN- γ in Lesions of Human Oral Lichen Planus HE Juan^{1,2}, CAI Yang^{1△}.
1. Deptment of Stomatology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China;
2. Deptment of Stomatology, No. 2 Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China

△ Corresponding author, E-mail: caiyang85@163.com

【Abstract】 Objective To understand the possible role of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and interferon- γ (IFN- γ) in the generation of local lesions of oral lichen planus (OLP). **Methods** Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 10 cases of normal oral epithelium and 48 cases of OLP were investigated for STAT1 and IFN- γ proteins by using immunohistochemistry SABC method. The correlation between the expression of STAT1 and IFN- γ proteins and the clinical and pathological characteristics in OLP were statistically analyzed. **Results** ① STAT1 and IFN- γ were over expressed compared with healthy oral mucosa ($P<0.05$). ② The percentage of STAT1 over-expression in OLP with positive IFN- γ staining was significantly higher than that in OLP with negative IFN- γ staining ($\chi^2=5.042, P<0.05$). A positive correlation between the over-expression of STAT1 and IFN- γ was seen in OLP ($r=0.324, P<0.05$). ③ The percentage of over-expression of STAT1 in OLP with disease course less than 6 months was higher than that in OLP with disease course more than 6 months ($\chi^2=5.077, P<0.05$), and a positive correlation was observed between the over-expression of IFN- γ and the liquefaction of base cells in local lesions of OLP ($r=-0.388, P<0.05$). **Conclusion** The over-expression of STAT1 and IFN- γ may participate in the generation of local pathological damnification of OLP at the early stage.

【Key words】 Oral lichen planus (OLP) Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) Interferon- γ (IFN- γ) Immunohistochemistry

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是一种慢性非感染性炎症性疾病,是最常见的口腔黏膜病之一,免疫因素是其最为重要的发病机制之一^[1]。目前多数研究显示,在 OLP 局部病损中以 Th1 型细胞因子占主导^[2],Th1 典型的细胞因子干扰素- γ

(IFN- γ)在 OLP 病损区表达上调,可能参与了 OLP 病损形成。信号转导与转录激活因子 1(STAT1)是一种新型的具有双功能的信号分子,参与了 IFN- γ 的信号转导过程,Th1 型细胞分化依赖于并列信号转导。IFN- γ 的信号转导有多种通路,其中 JAK (Janus kinase)/STAT 是核心通路,该通路能够将细胞膜表面的信号迅速带到细胞核中,指导基因转录和翻译^[3]。STAT1 通过干扰素作用途径调控机体免疫应答及炎症反应,但两者共同在 OLP 中的作

* 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金 (No. 省专合字 2009-38)资助
△ 通讯作者, E-mail: caiyang85@163.com

用尚未见相关报道。本研究拟通过了解 OLP 局部病损中 STAT1 及 IFN- γ 蛋白的表达及分布情况,探讨 IFN- γ /STAT1 信号通路在 OLP 病损形成及发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究标本

研究标本来自贵阳医学院附属医院口腔内科,选择 2005~2008 年临床及病理资料完整且未经任何治疗并不伴有皮损的 OLP 活检组织存档标本,经 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋、常规 HE 染色及严格的病理诊断。OLP 组织 48 例,其中男 20 例,女 28 例,年龄 21~70 岁,平均年龄 45.5 岁,参照《口腔黏膜病学》第 3 版^[1]的 OLP 临床分型标准。其中,单纯型(非糜烂型)36 例,糜烂型 12 例;病程<6 个月(短病程组)26 例, ≥ 6 个月(长病程组)22 例;病损部位包括颊、舌、腭部黏膜。10 例正常对照组来自拔牙或清创时周围多余的正常口腔黏膜组织(组织取得均经患者及家属知情同意)。对照组在年龄、性别及部位上与 OLP 组匹配。

每例标本作 4 μm 连续切片 5 张,1 张 HE 染色片由两位病理医生盲法重新核实组织病理学诊断,并参考张筱林等^[4]提出的 OLP 固有层淋巴细胞浸润和基底层细胞变性程度的计分标准对 OLP 组织病理改变程度进行计分。其余作免疫组织化学染色。本研究获贵阳医学院生物医学伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 实验试剂 兔抗人 STAT1 多克隆抗体(BA0619),兔抗人 IFN- γ 多克隆抗体(BA0952),SABC 试剂盒(SA1022),DAB 显色试剂盒(AR1022),0.02 mol/L PBS 缓冲液(pH7.2~7.6),0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)均购自于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 按照 SABC 法步骤进行,微波抗原修复(0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 pH=6.0,微波炉中高火加热 10 min,间隔 10 min 后,重复加热 5 min),一抗浓度分别为 STAT1(1:100)、IFN- γ (1:100)。每批染色同时设置阳性和阴性对照,STAT1 以已知阳性片作为阳性对照,IFN- γ 以胰腺癌标本作为阳性对照,PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.3 免疫组化染色结果判定

光镜下观察,STAT1、IFN- γ 均以细胞浆出现明确的棕黄色或淡黄色颗粒为阳性细胞。两者均按

染色颜色深浅,将阳性细胞表达强度分为 3 级,浅黄色计分 1 分,深黄色计分 2 分,褐色计分 3 分。分别采用盲法每张切片随机选择 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 个视野的平均数做染色分级。

STAT1 半定量计分参照文献^[5]:STAT1 阳性细胞数占总淋巴细胞数 $\leq 5\%$:0 分;6%~25%:1 分;26%~75%:2 分; $> 75\%$:3 分。同时每张切片最终分数按以上阳性率和表达强度两个参数的乘积计分,0 分为阴性(-),1~4 分为阳性(+), > 5 分为强阳性(++)。阳性、强阳性都归为阳性。

IFN- γ 参照潘玉霞等^[6]的方法:IFN- γ 阳性细胞数占总淋巴细胞数 $\leq 10\%$ 计分为 1 分;11%~30%计分为 2 分; $> 30\%$ 计分为 3 分,同样每张切片最终分数按以上阳性率和表达强度两个参数的乘积计分,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。

1.4 统计学方法

计数资料的比较采用卡方检验、Fisher's 确切概率法,等级资料相关分析采用 Spearman 秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OLP 病理改变分析

HE 染色显示 48 例 OLP 组织均有不同程度的病理改变,按照计分标准分别计分:OLP 组织中固有层淋巴细胞浸润程度为 1 分的 10 例,2 分的 20 例,3 分的 18 例;OLP 组织中基底层细胞液化程度为 1 分的 22 例,2 分的 19 例,3 分的 7 例。Spearman 相关分析显示,OLP 组织中固有层淋巴细胞浸润程度与基底层细胞液化变性程度之间存在正相关关系($r = 0.414, P < 0.05$)。

2.2 OLP 中 STAT1、IFN- γ 的表达情况

10 例正常口腔黏膜中 STAT1、IFN- γ 均为阴性表达。48 例 OLP 组织中 STAT1 阳性表达率为 66.67%(32/48),分布在固有层淋巴细胞浸润带(图 1)。IFN- γ 阳性表达率为 70.83%(34/48),主要分布在固有层淋巴细胞和部分上皮角质形成细胞(图 2)。STAT1、IFN- γ 在 OLP 病损区阳性表达率均高于在正常口腔黏膜组织中的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

2.3 OLP 病损区 STAT1、IFN- γ 表达相关性分析

在 OLP 组织中,IFN- γ 阳性组 STAT1 阳性表

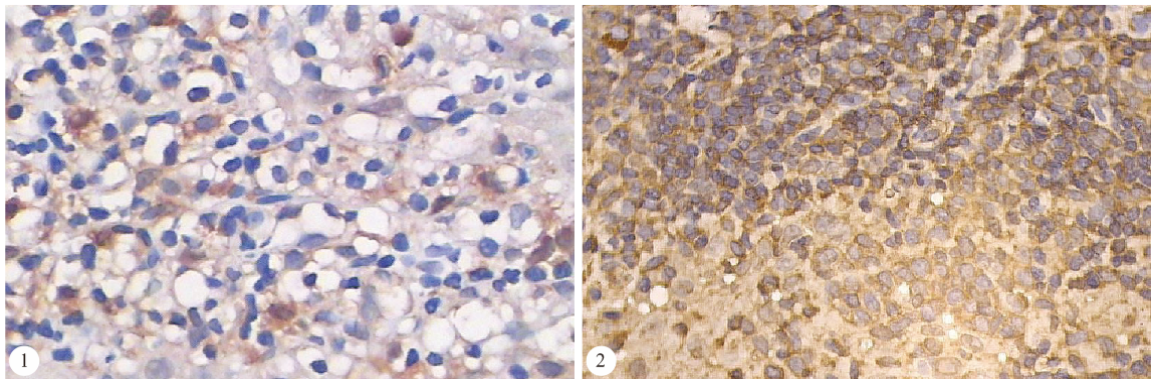


图 1 STAT1 在 OLP 病损区固有层淋巴细胞阳性表达。SABC ×400

图 2 IFN- γ 在 OLP 病损区固有层淋巴细胞阳性表达。SABC ×400

Fig 1 Positive expression of STAT1 in lymphocytes cell in OLP lesions. SABC ×400

Fig 2 Positive expression of IFN- γ in lymphocytes cell in OLP lesions. SABC ×400

表 1 OLP 病损区 STAT1 及 IFN- γ 的表达情况											
Table 1 The expression of STAT1 and IFN- γ in OLP lesions											
Group	<i>n</i>	STAT1 [case (%)]				<i>P</i>	IFN- γ [case (%)]				<i>P</i>
		—	+	++	Positive rate		—	+	++	Positive rate	
Normal	10	10	0	0	0 (0.00)	0.00	10	0	0	0 (0.00)	0.00
OLP	48	16	24	8	32 (66.67)		14	21	13	34 (70.83)	

达率 (76.47%) 高于 IFN- γ 阴性组的表达率 (42.86%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经 Spearman 秩相关分析结果显示, IFN- γ 和 STAT1 表达强度存在正相关关系 ($r = 0.324, P < 0.05$), 见表 2。

表 2 OLP 病损区 STAT1、IFN- γ 表达相关性分析

Table 2 The relativity analysis between the expression of STAT1 and IFN- γ in OLP

IFN- γ	<i>n</i>	STAT1		Positive rate (%)
		Positive (case)	Negative (case)	
Positive	34	26	8	76.47
Negative	14	6	8	42.86
Total	48	32	16	

2.4 IFN- γ 、STAT1 表达与 OLP 临床病理特征的关系

见表 3。在 48 例 OLP 组织中, STAT1 在短病程组 (< 6 月) 阳性表达率 80.77% (21/26) 高于长病程组 (≥ 6 月) 阳性表达率 50.00% (11/22), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.077, P < 0.05$); IFN- γ 阳性表达与基底细胞液化程度呈负相关 ($r = -0.388, P < 0.05$), 但与 STAT1 表达无相关性 ($P > 0.05$)。临床类型和淋巴细胞浸润都与 STAT1 及 IFN- γ 的表达无关 ($P > 0.05$)。

表 3 STAT1、IFN- γ 表达与 OLP 临床病理特征相关性分析

Table 3 The correlation between the expression of STAT1, IFN- γ and clinicopathological characteristics in OLP

	<i>n</i>	STAT1 ⁺		IFN- γ ⁺	
		Case (%)	<i>P</i>	Case (%)	<i>P</i>
Clinical type			0.480		0.714
No-evosion	36	25 (69.44)		25 (69.44)	
Erosion	12	7 (58.33)		9 (75.00)	
Duration of disease			0.024		0.313
< 6 month	26	21 (80.77)		20 (76.92)	
≥ 6 month	22	11 (50.00)		14 (63.64)	
Lymphocytes infiltration			0.140		0.614
1 score	10	5 (0.00)		6 (60.00)	
2 score	20	13 (65.00)		15 (75.00)	
3 score	18	14 (77.78)		13 (72.22)	
Basal cells liquefaction			0.086		0.006
1 score	22	12 (59.09)		11 (50.00)	
2 score	19	14 (73.68)		17 (89.47)	
3 score	7	6 (85.71)		6 (85.71)	

3 讨论

OLP 是一种慢性非感染性炎症性疾病, 临床表现以珠光白色损害为主要特点, 可伴或不伴有充血糜烂, 极少数病例有恶变倾向。OLP 病因尚不明确, 多数学者认为它是一种 T 淋巴细胞介导的炎症性疾病, T 细胞的激活及其产物的表达异常与 OLP 病损的发生、发展密切相关。

OLP 典型的病理表现是上皮固有层内大量的

T 淋巴细胞呈带状浸润, 基底膜断裂以及基底细胞液化变性^[1]。本研究中, 48 例 OLP 均有不同程度的病理改变, 淋巴细胞浸润程度与基底细胞液化程度两者的计分呈正相关, 即 OLP 组织中固有层浸润的淋巴细胞越多, 基底细胞液化变性也越严重, 与相关研究一致^[6,7], 提示基底细胞液化有可能与浸润的淋巴细胞有关。

STAT 是一新型的转录因子家族, STAT1 是具有信号转导和转录调节功能的蛋白质家族的第一个成员, 是一种双功能的信号分子, 不仅能够把细胞外的信号传递到细胞内, 而且能直接参与细胞的基因调控, 调节人体免疫反应、炎症反应^[3]。IFN- γ 是一种具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的细胞因子。本研究发现 STAT1、IFN- γ 在正常口腔黏膜中无表达, 而在 OLP 病损中表达均增高, 提示 STAT1、IFN- γ 可能在 OLP 病损形成中有一定的作用。Li 等^[8]研究了 IFN- γ 与 STAT1 在非小细胞肺癌细胞基因表达中的作用, 结果提示 IFN- γ 和 STAT1 的主要功能是导致促炎基因的表达。由此推测, OLP 组织中 STAT1 与 IFN- γ 表达增高可能促进了 OLP 的局部炎症的形成, 参与 OLP 病损发生的免疫调节作用。

OLP 病理学特征为固有层淋巴细胞呈带状分布, 其中多数是 CD4⁺ T 细胞, 主要负责 OLP 免疫损伤的调节。本研究结果中, OLP 病损区 STAT1、IFN- γ 阳性细胞都主要分布在固有层淋巴细胞浸润带, 与 CD4⁺ T 细胞分布部位基本一致。另外, 本研究中通过分析 STAT1、IFN- γ 阳性表达率与 OLP 临床与病理特征相关性发现: STAT1 在 OLP 病损形成早期即存在于病变组织中, 而在后期病损中的表达量相对减少。IFN- γ 阳性表达与基底细胞液化程度呈负相关。我们推测, 在 OLP 形成初期, 由于受到特异性抗原的攻击, 多种因素共同作用激活转录因子 STAT1, 使局部促炎基因增加, 导致病损区局部炎症的形成; 随着病程的延长, STAT1 相对降低, 当机体自身保护性免疫形成后, Th2 型抗炎细胞因子分泌, 使 OLP 局部可能形成慢性损伤修复机制。IFN- γ 在 Th1 细胞和细胞毒性 T 细胞识别抗原促发角质细胞的凋亡过程中起到关键作用, 角质形成细胞长期提呈抗原, 不断刺激抗原特异性 T 细胞在局部的增殖和活化, 导致细胞因子的不断产生和病损的慢性持续。因此说明 STAT1、IFN- γ 可能参与了 OLP 病损区病理损伤的过程, 并促进了

OLP 局部病损的炎症反应。研究表明^[9], STAT1 参与了 IFN- γ 的信号转导过程, 通过干扰素作用途径调控机体免疫应答及炎症反应, 同时调控大量促凋亡基因表达。现已发现^[10], 在 Th1 漂移性疾病中, STAT1、IFN- γ 表达上调, Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移。因此, IFN- γ /STAT1 通路可能参与了 OLP 免疫调节过程, 促进炎症反应的形成。本研究通过分析 STAT1 与 IFN- γ 表达相关性发现: 在 IFN- γ 阳性表达组 STAT1 阳性率明显高于 IFN- γ 阴性表达组, 两者间存在正相关关系, 提示 IFN- γ /STAT1 通路可能参与了 OLP 病损形成过程。

本研究结果提示: STAT1 与 IFN- γ 在 OLP 局部病损中的异常表达, 可发生在不同临床类型, 不同病程的病损中; 在病损形成过程中存在 IFN- γ /STAT1 通路的调控, 两者共同作用加重了局部免疫应答反应, 促使 OLP 病损局部炎症的发生, 参与 OLP 病损区病理损伤过程。

参 考 文 献

- 1 陈谦明, 周曾同. 口腔黏膜病学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008; 101-104.
- 2 Khan A, Farah CS, Savage NW, *et al.* Th1 cytokines in oral lichen planus. *Oral Pathol Med*, 2003; 32(2): 77-83.
- 3 Stark GR, Darnell JE Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*, 2012; 36(4): 503-514.
- 4 张筱林, 吴奇光, 郑麟蕃. 口腔扁平苔藓的组织病理学分析. *中华口腔科学杂志*, 1984; 19(1): 9-12.
- 5 叶明珠, 薛 敏. 信号转导和转录激活因子 1 及其抑制因子 PIAS1 在 I 期及 II 期宫颈鳞癌中的表达及意义. *中国实用妇科与产科杂志*, 2010; 26(11): 837-840.
- 6 潘玉霞, 蔡 扬, 余红兵. 口腔扁平苔藓病损区白细胞介素 12p40 及干扰素 γ 的表达及意义. *华西口腔医学杂志*, 2011; 29(2): 179-181.
- 7 付 伟, 蔡 扬, 潘玉霞等. 口腔扁平苔藓病损区细胞间黏附分子 1、干扰素 γ 表达及意义. *实用口腔医学杂志*, 2010; 26(4): 519-522.
- 8 Li J, Yu B, Song L, *et al.* Effects of IFN-gamma and Stat1 on gene expression, growth, and survival in non-small cell lung cancer cells. *Interferon Cytokine Res*, 2007; 27(8): 209-220.
- 9 Klampfer L. The role of signal transducers and activators of transcription in colon cancer. *Front Biosci*, 2008; 13(3): 2888-2899.
- 10 Oestreich KJ, Weinmann AS. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 2012; 24(2): 191-195.

(2013 - 05 - 20 收稿, 2013 - 09 - 03 修回)

编辑 汤 洁