

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.09.003

· 基础研究 ·

丝聚蛋白在口腔黏膜下纤维性变中的表达

尹丽芬¹, 柳志文², 吴昊¹, 凌天牖²

1. 长沙市口腔医院牙周黏膜科, 湖南长沙(410004); 2. 中南大学湘雅二医院口腔中心, 湖南长沙(410008)

【摘要】目的 研究丝聚蛋白(filaggrin, FLG)在口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)组织中的表达与分布,探讨FLG在OSF发生发展中的意义。**方法** 选取10例人正常口腔颊黏膜组织(正常口腔黏膜组)和OSF早期(OSF早期组)、中期(OSF中期组)、晚期(OSF晚期组)各10例颊黏膜组织,采用免疫组织化学方法检测各组FLG的表达和分布情况,观察FLG在上皮中的表达情况,对FLG表达阳性的细胞进行计数,计算各组的FLG阳性细胞表达率。**结果** 正常口腔颊黏膜组大部分标本上皮中FLG表达为阴性;OSF颊黏膜上皮中均可见FLG的阳性表达,随着OSF病变程度加重,FLG阳性表达细胞数目增加。在OSF早期组FLG阳性表达主要集中在上皮的颗粒层和角化层,OSF中期组FLG阳性表达的上皮细胞逐渐增多;在OSF晚期组中几乎整个上皮层细胞可见胞浆胞核中呈FLG阳性表达。OSF早期组、OSF中期组、OSF晚期组的FLG阳性细胞表达率分别为 $(24.63 \pm 9.06)\%$ 、 $(54.23 \pm 10.63)\%$ 和 $(83.97 \pm 8.72)\%$,且OSF组中的FLG阳性细胞表达率均高于正常黏膜组($P < 0.05$),差异具有统计学意义。**结论** FLG在OSF上皮中表达较正常口腔黏膜上皮增强,且随着OSF病变加重,FLG在OSF上皮中的表达水平上调。FLG的表达异常可能与OSF上皮角质形成细胞的终末分化发生紊乱有关。

【关键词】 颊黏膜; 口腔黏膜下纤维性变; 丝聚蛋白; 免疫组织化学; 角质形成细胞

【中图分类号】 R781.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)09-0557-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 尹丽芬, 柳志文, 吴昊, 等. 丝聚蛋白在口腔黏膜下纤维性变中的表达[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(9): 557-560.

The expression of filaggrin in oral submucosal fibrosis YIN Lifan¹, LIU Zhiwen², WU Hao¹, LING Tianyou².

1. Department of Periodontal & Oral Medicine, Changsha Stomatological Hospital, Changsha 410004, China; 2. Department of Stomatology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: LING Tianyou, Email: 772660166@qq.com, Tel: 86-731-85295012

【Abstract】Objective To study the expression and distribution of filaggrin (FLG) in oral submucous fibrosis (OSF) and to explore the significance of FLG in the occurrence and development of OSF. **Methods** Ten cases with a normal oral mucosa (normal buccal mucosa group) and 30 cases of tissues with OSF lesions, including 10 cases each in the early (early OSF group), moderate (middle OSF group) and advanced stages (late OSF group), were selected. FLG was analyzed by immunohistochemistry. The FLG-positive cells were counted to calculate the percentages of cells with FLG-positive expression in each group. **Results** FLG expression was negative in most of the normal buccal mucosa group specimens and was positive in the OSF buccal mucosal epithelial specimens. With aggravation of the OSF lesion, the number of FLG-positive cells increased. In the early OSF group, FLG-positive expression was mainly concentrated in the granular and keratinized epithelial layers. In the middle OSF group, the number of FLG-positive epithelial cells increased gradually. In the late OSF group, almost all epithelial cells were FLG-positive in the cytoplasmic nucleus. The percentages of FLG-positive cells in the early, middle and late OSF groups were $(24.63 \pm 9.06)\%$, $(54.23 \pm 10.63)\%$ and $(83.97 \pm 8.72)\%$, respectively. The percentage of FLG-positive cells was significantly higher in the OSF group than in the nor-

【收稿日期】 2018-11-19; **【修回日期】** 2019-03-29

【基金项目】 湖南省卫生计生委科研计划项目(C2016103)

【作者简介】 尹丽芬, 医师, 硕士, Email: 756233497@qq.com

【通信作者】 凌天牖, 教授, 学士, Email: 772660166@qq.com, Tel: 86-731-85295012

mal mucosa group ($P < 0.05$). **Conclusion** FLG was expressed at a higher level in the OSF epithelium than in the normal oral mucosal epithelium and was upregulated in the OSF epithelium with aggravation of the OSF lesions. Abnormal FLG expression may be related to the terminal differentiation disorder of OSF epithelial keratinocytes.

【Key words】 oral buccal mucosa; oral submucous fibrosis; filaggrin; immunohistochemistry; keratinocyte

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(9): 557-560.

口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)是一种慢性、进行性的口腔黏膜病,属于口腔潜在恶性疾患,主要临床表现为口腔灼痛、口干,渐进性张口困难,黏膜变白僵硬,出现纤维条索和水疱,较重者进食和语言甚至吞咽功能障碍。OSF的主要病理变化包括上皮组织增生或萎缩、黏膜固有层及黏膜下层胶原纤维堆积、变性,早期血管出现扩张,中、后期表现为血管闭塞、减少^[1-3]。大量研究表明,咀嚼槟榔是OSF最主要的致病因素^[4],但发病机制不清,多数认为槟榔成分和添加物导致细胞外基质的合成和降解失衡可能是OSF病变的主要原因^[5]。丝聚蛋白(filaggrin, FLG)是表皮终末分化和屏障形成的重要结构蛋白,是组成角质层角化包膜(cornified envelope, CE)的蛋白成分之一,它是存在于体表角质形成细胞(keratinocyte, KC)中的一种溶于水的酸性或中性蛋白,其前身是丝聚合蛋白原,半胱氨酸基天冬氨酸特异性蛋白酶14(caspase-14)是调节FLG成为天然保湿因子的关键酶之一^[6-8]。一些学者对FLG在口腔黏膜上皮中的表达和分布进行了观察,发现在正常口腔黏膜中FLG主要分布在角化上皮的角化层和颗粒层,在非角化上皮中不表达或微表达,在口腔白斑和疣状癌中呈不规则分布,而在恶性肿瘤中与肿瘤的分级有关,未分化癌中基本不表达^[9-10]。已有研究表明,角质层角化包膜的组成成分之一兜甲蛋白(loricrin, LOR)在OSF组织中出现高表达^[11]。本研究旨在检测OSF中FLG蛋白的表达和分布状况及与病变进展的关系,评价在病理检查中FLG可否作为OSF病变的一种有价值的免疫组化标记物。

1 材料和方法

1.1 标本和主要试剂

标本选取2014年1月—2014年11月送检于中南大学湘雅口腔医院口腔病理科,排除皮肤疾病,经临床和病理确诊后的保存完好的30例OSF石蜡标本,OSF确诊与分期参照pindborg病理学标准。

包括OSF早期(OSF早期组)、中期(OSF中期组)、晚期(OSF晚期组)各10例。选取10例正常口腔黏膜组织作为正常口腔黏膜组,10%福尔马林固定,石蜡包埋。所选择的正常口腔黏膜组对象排除了皮肤疾病、系统性疾病、过敏性疾病、长期服药史,无咀嚼槟榔嗜好,无吸烟饮酒嗜好。

鼠抗人FLG单克隆抗体(SC20019, Santa Cruz公司,美国),即用型免疫组织化学UltraSensitive-T-MSP试剂盒、DAB显色试剂盒(UltraMount)、pH6.0柠檬酸组织抗原修复液(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2 免疫组化染色法

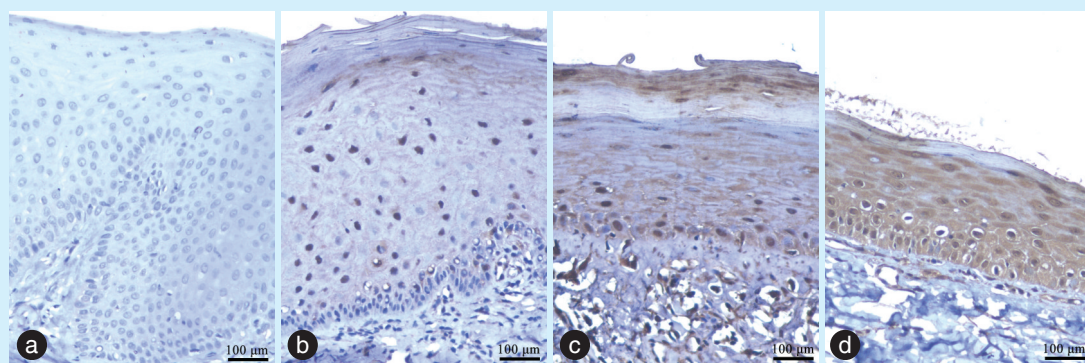
免疫组化SP法检测各组FLG的表达,用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 统计学分析

采集数据经统计学SPSS 19.0软件处理数据,本实验采用随机区组方差分析的方法分析数据。在进行检验前所有数据进行方差齐性检验和正态性检验,若两者都符合采用单因素方差分析和LSD-*t*检验;若两者有一项不符合则采用Kruskal-Wallis *H*检验和Mann-Whitney *U*检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

正常口腔黏膜组上皮大部分标本未见FLG表达(图1a),而部分标本FLG在上皮中间层个别细胞的胞浆和部分胞核中微弱表达;在OSF早期组FLG阳性表达主要集中在上皮的颗粒层和角化层(图1b),OSF中期组FLG阳性表达的上皮细胞逐渐增多(图1c);在OSF晚期组中几乎整个上皮层细胞可见胞浆胞核中呈FLG阳性表达(图1d)。4组阳性细胞表达率如表1所示。4组阳性细胞表达率差异具有统计学意义($F = 185.73, P < 0.05$),OSF组中的FLG阳性细胞表达率均高于正常口腔黏膜组($P < 0.05$);OSF晚期组表达高于OSF中期组($P < 0.05$);OSF中期组的表达高于OSF早期组($P < 0.05$)。



a: 正常口腔黏膜组; b: OSF 早期组; c: OSF 中期组; d: OSF 晚期组。OSF: 口腔黏膜下纤维性变 bar=100 μm

图1 各组丝聚蛋白免疫组化染色

Figure 1 Immunohistochemical staining for filaggrin in each group bar=100 μm

表1 各组FLG阳性细胞表达率

Table 1 Expression rates of FLG positive cells in each group

组别	例数	$\bar{x} \pm s, \%$ 阳性细胞表达率
正常口腔黏膜组	10	1.8±1.42
OSF 早期组	10	24.63±9.06 ¹⁾
OSF 中期组	10	54.23±10.63 ¹⁾²⁾
OSF 晚期组	10	83.72±8.72 ¹⁾³⁾
F		185.73
P		< 0.05

注 1) 为与正常口腔黏膜组比较, $P < 0.05$; 2) 为与 OSF 早期组比较, $P < 0.05$; 3) 为与 OSF 中期组比较, $P < 0.05$; FLG: 丝聚蛋白; OSF: 口腔黏膜下纤维性变

3 讨论

近年来有关于 FLG 在口腔黏膜疾病中呈异常表达的报道。其中, 研究发现 FLG 在口腔扁平苔藓上皮中呈稀疏表达, 较正常颊黏膜上皮中表达增强; 在硬腭过角化病损中表达增强并位于粒层和角化层中; 在舌白斑中弥散分布于上皮的角化区域等^[12-13]。但是, 这些改变仅限于上皮中的某些局部, 同时缺少动态变化的观察。目前对 OSF 组织中 FLG 的研究较为少见, 本课题观察到正常情况下几乎不表达 FLG 的颊黏膜, 在 OSF 组织中出现阳性表达, 并随 OSF 病变程度的增加, 该表达在晚期病变组织中扩展到上皮的全层, 揭示了 OSF 组织的上皮在终末分化阶段即角化过程中发生的另外一种病理现象。

FLG 是由丝聚蛋白原(profilaggrin)衍生来的, 丝聚蛋白原的调控对 FLG 的表达产生重要影响。激活子蛋白-1 (activator protein 1, AP-1) 是 FLG 的

重要调控因子, 抑制 AP-1 因子可导致丝聚蛋白表达降低^[14-15]。对 FLG 的基因结构特征的研究发现 FLG 基因 5' 末端非编码区 2 个外显子的 mRNA 转录起始点附近和内含子中各含有一个核转录因子 AP-1 的结合位点。有研究表明, 如佛波酯 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 通过增加 c-Fos 和 c-jun 的结合能力可以激活有 AP-1 位点的基因, 从而诱导 FLG 基因的表达^[16]。FLG 的基因结构中的另一个特征为 N 末端含有“EF”手功能区, “EF”手为 12 个氨基酸组成的钙结合环, 这种钙结合区的存在提示 Ca^{2+} 调节的结合基础, Ca^{2+} 在丝聚蛋白原降解为 FLG 过程中发挥重要作用, 研究表明低钙浓度培养的角质形成细胞不发生分层和分化, 而高钙环境下角质形成细胞出现分层分化并表达分化标志细胞角蛋白 CK1、CK10 和 FLG^[17-18]。此外, FLG 的降解也需要 Ca^{2+} 。由于熟石灰为市售槟榔嚼物中的添加物, 因此长期咀嚼槟榔习惯使 OSF 患者的口腔上皮角质形成细胞处于高 Ca^{2+} 的环境中, 这是导致 OSF 上皮中 FLG 表达增高的一种原因。

Murakami 等^[19] 研究认为, 口腔上皮的角化与 FLG 的表达密切相关。文献已报道丝聚蛋白原的表达仅发生在有分化特异性角蛋白 CK1 和 CK10 的表达后, 并且在角化增强的情况下表达也增加。正常的颊黏膜不表达 CK1 和 CK10, 因此不表达 FLG。但由于 OSF 颊黏膜组织中角蛋白的分布和组成发生了重要改变, 原不表达的 CK1 和 CK10 明显增加, 基底层出现 CK6 的表达, 上皮全层 CK19 全部消失, 基底上层中 CK17 表达显著增加等^[20]。OSF 中 CK 的表达改变明显有利于 FLG 的表达, 推

测 FLG 随 CK1、CK10 的表达而出现在 OSF 上皮中。

此外, FLG 的表达还受到 Caspase-14 的调控, Caspase-14 是调节丝聚蛋白原去磷酸化成为 FLG 的关键酶。敲除小鼠的 Caspase-14 基因的 FLG 的表达明显降低, 用茶多酚刺激角质形成细胞可使 Caspase-14 和 FLG 表达同步增加^[19]。同样在一些未分化的恶性肿瘤中由于缺少 Caspase-14 基因未见 FLG 的表达。由此推测引起 Caspase-14 表达增强的因素会使 FLG 的表达增加。已有体外研究表明皮肤和黏膜的外伤、紫外线照射、维生素 D 和衍生物、茶多酚等可使 Caspase-14 表达增强, 而游离维 A 酸可使其活性降低。槟榔生物碱、槟榔多酚等槟榔成分具有细胞毒性和遗传代谢紊乱毒性作用, 对细胞 DNA 的损伤也许通过使 Caspase-14 的表达增强从而提高 FLG 在组织中的表达。

本研究关于 FLG 在 OSF 中的表达和分布以及随病变进展越发明显的特征表明, FLG 可作为病理检验中诊断 OSF 的一种有用的免疫组化标志物。同时, 进一步研究槟榔成分对包括 FLG 在内的诸多口腔黏膜上皮屏障组成成分和参与代谢酶的影响并探讨它们之间的相互作用, 将有助于深入了解 OSF 的发病机制和寻找 OSF 临床有效的治疗靶点。

参考文献

- [1] Bari S, Metgud R, Vyas Z, et al. An update on studies on etiological factors, disease progression, and malignant transformation in oral submucous fibrosis[J]. J Cancer Res Ther, 2017, 13(3): 399-405.
- [2] Wollina U, Verma SB, Ali FM, et al. Oral submucous fibrosis: an update[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2015, 8: 193-204.
- [3] Biradar SB, Munde AD, Biradar BC. Oral submucous fibrosis: a clinico - histopathological correlational study[J]. J Cancer Res Ther, 2018, 14(3): 597-603.
- [4] Arakeri G, Brennan PA. Oral submucous fibrosis: an overview of the aetiology, pathogenesis, classification, and principles of management[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2013, 51(7): 587-593.
- [5] Arakeri G, Rai KK, Hunasgi S, et al. Oral submucous fibrosis: an update on current theories of pathogenesis[J]. J Oral Pathol Med, 2017, 46(6): 406-412.
- [6] Hassani B, Isaian A, Shariat M. Filaggrin gene polymorphisms in Iranian ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis patients[J]. Int J Dermatol, 2018, 57(12): 1485-1491.
- [7] Oh Y, Lim HW, Kim K, et al. Ginsenoside Re improves skin barrier function in HaCaT keratinocytes under normal growth conditions[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2016, 80(11): 2165-2167.
- [8] Cabanillas B, Novak N. Inactivation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway reduces caspase - 14 expression in impaired keratinocytes[J]. Curr Opin Immunol, 2016, 19(1): 28-33.
- [9] Smith SA, Dale BA. Immunologic localization of filaggrin in human oral epithelia and correlation with keratinization[J]. J Invest Dermatol, 1986, 86(2): 168-172.
- [10] Grosso M, Lentini M, Bellizi DME, et al. Immunohistochemical localization of filaggrin in benign and malignant lesions of the human oral mucosa[J]. Basic Appl Histochem, 1990, 34(1): 51-58.
- [11] 李宁, 翦新春. 兜甲蛋白和细胞色素 P4503A5 口腔黏膜下纤维化中的表达及意义[J]. 华西口腔医学杂志, 2009, 27(1): 29-33.
- [12] Makino T, Mizawa M, Inoue S, et al. The expression profile of filaggrin-2 in the normal and pathologic human oral mucosa[J]. Arch Dermatol Res, 2016, 308(3): 213-217.
- [13] Larsen KR, Johansen JD, Reibe J, et al. Filaggrin gene mutations and the distribution of filaggrin in oral mucosa of patients with oral lichen planus and healthy controls[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2017, 31(5): 887-893.
- [14] Young CA, Eckert RL, Adhikary G, et al. Embryonic AP1 transcription factor deficiency causes a collodion baby-like phenotype [J]. J Invest Dermatol, 2017, 137(9): 1868-1877.
- [15] Young CA, Rorke EA. Loss of epidermal AP1 transcription factor function reduces filaggrin level, alters chemokine expression and produces an ichthyosis - related phenotype[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2840.
- [16] Jang SI, Steinert PM, Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene[J]. J Biol Chem, 1996, 271(39): 24105-24114.
- [17] Lee SE, Lee SH. Skin barrier and calcium[J]. Ann Dermatol, 2018, 30(3): 265-275.
- [18] Yuspa SL, Kilkenny AE, Steinert PM, et al. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*[J]. J Cell Biol, 1989, 109(3): 1207-1217.
- [19] Murakami H, Okamura K, Aoki S, et al. Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models[J]. J Periodontal Res, 2014, 49(6): 703-710.
- [20] Ranganathan K, Kavitha R, Sawant SS, et al. Cytokeratin expression in oral submucous fibrosis -- an immunohistochemical study [J]. J Oral Pathol Med, 2006, 35(1): 25-32.

(编辑 张琳, 殷操)



官网



公众号