文章编号:1000-5404(2011)18-1943-04

论著

口腔扁平苔藓局部浸润淋巴细胞颗粒酶B和穿孔素蛋白表达与上皮细胞凋亡的关系

雷 蕾[1],詹丽华[2],谭为霞[3],周序珑[4] (510632 广州,暨南大学:医学院口腔系[1],第一附属医院口腔内科[2],医学院病理学教研室[4];518008 广东 深圳,深圳市瑞尔齿科门诊部[3])

[摘要] **目的** 检测口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)上皮细胞凋亡状况,观察颗粒酶B、穿孔素在OLP固有层浸润淋巴细胞中的蛋白表达,探讨细胞毒作用对OLP上皮细胞凋亡的影响。**方法** 采用原位缺口末端DNA标记技术,定位检测OLP上皮细胞凋亡情况;分别使用免疫组化法检测颗粒酶B和穿孔素在组织总淋巴细胞以及$CD8^+$细胞中的表达,以健康口腔黏膜组织(NOM)作对照。**结果** 与NOM相比,OLP上皮细胞凋亡显著增加($P=0.037$);OLP淋巴细胞中颗粒酶B、穿孔素表达明显增强(P值分别为0.016和0.012),其部分阳性细胞接近上皮基底层。OLP中$CD8^+$/颗粒酶B^+细胞双阳性表达和$CD8^+$/穿孔素$^+$细胞双阳性表达较NOM明显升高(P值分别为0.043和0.032)。OLP上皮细胞凋亡与淋巴细胞颗粒酶B和穿孔素表达成正相关($r=0.56, P=0.038; r=0.42, P=0.041$)。**结论** OLP浸润淋巴细胞包括$CD8^+$ T细胞中颗粒酶B、穿孔素表达增强,提示OLP淋巴细胞可能以颗粒酶B、穿孔素作为细胞毒介质攻击口腔上皮细胞引起其凋亡。

[关键词] 口腔扁平苔藓;T淋巴细胞;颗粒酶B;穿孔素;细胞凋亡
[中图法分类号] R781.5;R392.3;R363.21 [文献标志码] A

Correlation between expression of granzyme B and perforin and apoptosis in epithelial cells in oral lichen planus with local lymphocyte infiltration

Lei Lei[1], Zhan Lihua[2], Tan Weixia[3], Zhou Xulong[4] ([1]Faculty of Stomatology, [2]Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Medical College of Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510632; [3]Clinic of Shenzhen Arrail Dentistry, Shenzhen, Guangdong Province, 518008; [4]Teaching and Research Section of Pathology, Medical College of Jinan University, Guangzhou, 510632, Guangdong Province, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of granzyme B and perforin and the effect of cytotoxin on apoptosis of epithelial cells in oral lichen planus (OLP) with lymphocyte infiltration by detecting the apoptosis of epithelial cells. **Methods** Apoptosis of epithelial cells in OLP with lymphocyte infiltration was detected with the terminal deoxymuleotigyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) technique. Expression of granzyme B and perfoin in lymphocytes and $CD8^+$ cells was detected with the immunohistochemcial method. Normal oral mucosa (NOM) was used as a control. **Results** The apoptosis level of epithelial cells and the expression level of granzyme B and perforin were significantly higher in epithelium of OLP than in control ($P<0.05$). Some positive cells were observed in the basal lamina of epithelium. The double positive expression levels of $CD8^+$/granzyme B^+ and $CD8^+$/perfoin$^+$ were significantly higher in OLP than in control ($P<0.05$). The apoptosis of epithelial cells in OLP was positively correlated with the expression of granzyme B and perfoin in OLP with lymphocyte infiltration ($r=0.56$, $r=0.42$, $P<0.05$). **Conclusion** Increased expression of granzyme B and perfoin in OLP with lymphocyte infiltration, including $CD8^+$ T cells, suggests that lymphocytes in OLP may attack oral epithelial cells as a cytotoxin of granzyme B and perfoin, thus leading to apoptosis of oral epithelial cells.

[**Key words**] oral lichen planus; T lymphocyte; granzyme B; perforin; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (8151063201000065). Corresponding author: Lei Lei, Tel: 86-20-85220266, E-mail: tleil@jnu.edu.cn

口腔扁平苔藓是发生在口腔黏膜的非感染慢性炎症性疾病,其主要病理特点是固有层浅部存在带状密集的浸润淋巴细胞,其中以T细胞为主,包括$CD8^+$细胞毒性T细胞和$CD4^+$辅助性T细胞,这些细胞或分

[基金项目] 广东省自然科学基金(8151063201000065)
[通信作者] 雷 蕾,电话:(020)85220266, E-mail: tleil@jnu.edu.cn

泌炎性细胞因子,或以细胞毒性直接攻击靶细胞,从而构成对口腔上皮细胞的损伤。颗粒酶B和穿孔素是参与细胞毒性的重要介质,主要表达于NK细胞和$CD8^+$ T淋巴细胞,是效应T淋巴细胞杀伤靶细胞的主要细胞毒蛋白。研究表明皮肤扁平苔藓$CD8^+$ T细胞颗粒酶B染色阳性,并观察到淋巴细胞向正经历凋亡的上皮细胞分泌颗粒酶B[1]。但颗粒酶B和穿孔素在OLP $CD8^+$细胞毒性T细胞的表达以及与OLP上皮细胞凋亡的关系尚不清楚。本实验在检测OLP上皮细胞凋亡情况的基础上,针对OLP浸润淋巴细胞,特别是$CD8^+$ T细胞,检测颗粒酶B和穿孔素的表达情况,以探讨其在OLP发病中的作用以及对OLP上皮细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取暨南大学附属第一医院口腔内科2007年9月至2010年1月收治的OLP初诊患者31例。就诊前至少1个月未曾作任何相关治疗;OLP病损邻近牙无银汞充填物或修复体;患者否认全身性疾病,包括肝脏疾病、消化道疾病、糖尿病、高血压等。其中男性13例,女性18例,年龄(43.00±8.64)岁。病变类型包括萎缩、糜烂型12例,非糜烂型19例。局麻下切取病变组织,一部分送病检(病变呈OLP病理变化:上皮过角化或不全角化,棘层增生或萎缩,基底细胞液化变性,固有层炎性细胞浸润带),另一部分用10%甲醛固定。另取10例临床健康口腔黏膜,10%甲醛固定。

1.2 试剂

原位凋亡检测试剂盒购自罗氏(Roche,瑞士)生物制品有限公司,颗粒酶B和穿孔素多克隆抗体以及免疫组化试剂盒、免疫组化双染试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 凋亡检测 石蜡标本切片,片厚4 μm,行脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色,按操作流程进行。切片常规脱蜡至水,微波修复5 min,加3% H_2O_2阻断内源性过氧化物酶,加TUNEL反应混合液,湿盒37 ℃孵育60 min,滴加辣根过氧化物酶标记的抗荧光素酶于37 ℃孵育30 min,DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片。用已知阳性片作阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)作阴性对照。

1.3.2 免疫组化染色 石蜡包埋标本行连续切片,逐级脱蜡,PBS冲洗3次(3 min/次),柠檬酸缓冲液高温高压行抗原修复,3%过氧化氢孵育10 min,PBS冲洗3次(3 min/次),去血清,加一抗后4 ℃过夜,PBS冲洗3次(3 min/次),滴加生物素标记的二抗,室温下孵育10 min,再滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液室温下孵育10 min,PBS冲洗(3 min/次),DAB显色5 min,清水冲洗,苏木精复染,中性树胶封片。已知阳性片作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。

1.3.3 免疫组化双标记 将标本按试剂盒说明书,采用S-P法分别对OLP组织的$CD8^+$ T细胞的颗粒酶B、穿孔素行双重标记免疫组化染色。先标记细胞膜$CD8^+$,用BCIP/NBT显色,蒸馏水充分漂洗,再分别标记细胞质颗粒酶B、穿孔素,AEC显色,苏木精衬染细胞核,明胶甘油封片。

1.4 结果判定

1.4.1 TUNEL结果判定 光镜下,凋亡阳性细胞核呈棕褐色,每张切片选取5个视野进行计数,以凋亡阳性上皮细胞数除以该视野上皮细胞总数即为上皮细胞凋亡率(AI)。

1.4.2 OLP组织中颗粒酶B、穿孔素检测结果判定 将组织固有层中的淋巴细胞作为判定对象(光镜下,淋巴细胞多呈圆形,细胞核大而圆)。光镜下,颗粒酶B和穿孔素阳性淋巴细胞胞浆、细胞膜染棕黄色或棕褐色。选择5个高倍视野,计数阳性细胞在细胞总数中所占的百分比,根据阳性细胞的比例进行计分:阳性细胞<5%:(-);阳性细胞占6%~25%:(+);占26%~50%:(++),阳性细胞>51%:(+++)。光镜下CD8阳性细胞膜或细胞质染蓝黑色,颗粒酶B和穿孔素阳性细胞细胞质染红色,细胞核显蓝色。CD8/颗粒酶双染阳性细胞和CD8/穿孔素双染阳性细胞呈紫红色。每张切片在高倍(×400)下随机选取5个视野,采用Leica公司Qwin真彩图像分析系统对切片中的双染阳性细胞计数,拍照。计数方法同前。

1.5 统计学处理

采用SPSS 11.5软件进行非参数秩和检验,Pearson法分析各指标间的相关性。

2 结果

2.1 TUNEL原位检测凋亡细胞

OLP上皮凋亡细胞多分布于深层,如基底层、颗粒层或棘层(正常口腔上皮凋亡细胞多位于浅层),部分切片基底层凋亡细胞密集呈栅栏状排列(图1)。细胞凋亡AI值(6.76±6.55)%,与NOM凋亡AI值(1.43±3.82)%相比,凋亡显著升高($P=0.037$),其中萎缩、糜烂型阳性10例,网纹型阳性7例,二者AI值分别是(11.42±5.79)%、(3.81±5.23)%,两者存在统计学差异($P=0.011$)。

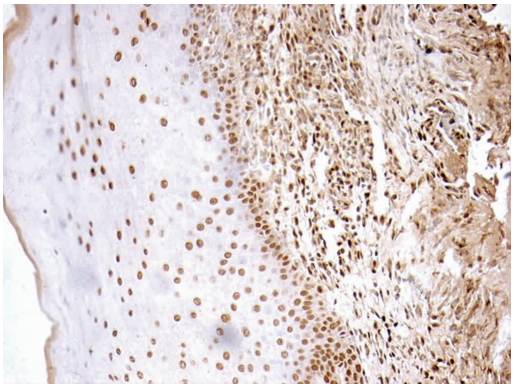


图1 TUNEL法染色观察OLP上皮凋亡细胞(×100)

2.2 颗粒酶B和穿孔素在OLP淋巴细胞中表达增强

颗粒酶B染色阳性的淋巴细胞多位于OLP固有层浅部,接近上皮基底层,呈簇或散在分布,并见个别阳性细胞侵入上皮层(图2)其阳性率41.93%,比正常对照组相比显著升高($P=0.016$)。OLP萎缩糜烂型的颗粒酶B表达较非糜烂型升高($P=0.003$)。穿孔素染色阳性的淋巴细胞位于OLP固有层浅部,与上皮基底层相近,主要呈簇分布(图3)。其阳性率45.16%,比正常对照组相比升高($P=0.012$)。见表1。

表 1 颗粒酶 B、穿孔素在口腔扁平苔藓中的表达

组别	*n*	颗粒酶 B				*P*	穿孔素				*P*
		(−)	(+)	(++)	(+++)		(−)	(+)	(++)	(+++)	
NOM	10	10	0	0	0		10	0	0	0	
OLP	31	18	8	5	0	0.016	17	4	7	3	0.012
萎缩糜烂型	12	4	5	3	0	0.003	4	3	3	2	0.002
非糜烂型	19	14	3	2	0	0.081	13	1	4	1	0.051

表 2 $CD8^+$ 颗粒酶 B^+ 和 $CD8^+$ 穿孔素 $^+$ 在口腔扁平苔藓中的表达

组别	*n*	$CD8^+$/颗粒酶 B^+				*P*	$CD8^+$/穿孔素 $^+$				*P*
		(−)	(+)	(++)	(+++)		(−)	(+)	(++)	(+++)	
NOM	10	10	0	0	0		10	0	0	0	
OLP	31	21	4	6	0	0.043	20	4	5	2	0.032
萎缩糜烂型	12	8	1	3	0	0.021	6	2	3	1	0.012
非糜烂型	19	13	3	3	0	0.104	14	2	2	1	0.081

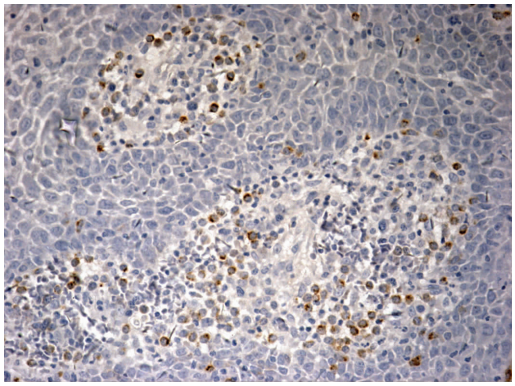


图 2 免疫组化染色观察口腔扁平苔藓局部浸润淋巴细胞颗粒酶阳性表达 (S-P ×200)

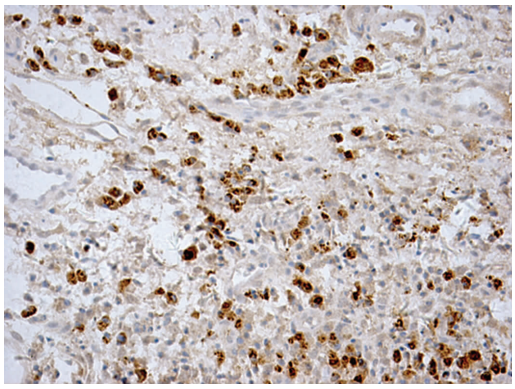


图 3 免疫组化染色观察口腔扁平苔藓局部浸润淋巴细胞穿孔素阳性表达 (S-P ×200)

2.3 颗粒酶 B 和穿孔素在 OLP $CD8^+$ T 细胞中表达增强

$CD8^+$/颗粒酶 B 双染阳性细胞在 OLP 固有层中多集中分布,与基底细胞邻近(图 4),阳性率 32.25%。$CD8^+$/穿孔素双染阳性细胞在 OLP 中的分布情况与前者相似(图 5),阳性率 35.48%。二者均比正常对照组升高(*P* 值分别为 0.043 和 0.032)。见表 2。

2.4 颗粒酶 B 和穿孔素在 OLP 淋巴细胞中的共表达

18 例颗粒酶阳性表达的 OLP 以及 14 例穿孔素阳性表达的 OLP 中,有 13 例同时表达颗粒酶和穿孔素,其中 11 例为糜烂型 OLP,2 例为非糜烂型 OLP。

2.5 OLP 上皮凋亡细胞 AI 值与淋巴细胞颗粒酶 B、穿孔素表达的相关关系

Pearson 法分析结果显示:糜烂萎缩型 OLP 上皮凋亡细胞的 AI 值与 OLP 上皮下淋巴细胞颗粒酶 B 表达成正相关关系($r=0.56$, $P=0.038$),与穿孔素表达成正相关关系($r=0.42$, $P=0.041$),即随着颗粒酶、穿孔素表达增强,糜烂萎缩型 OLP 上皮细胞的凋亡率也随之升高。

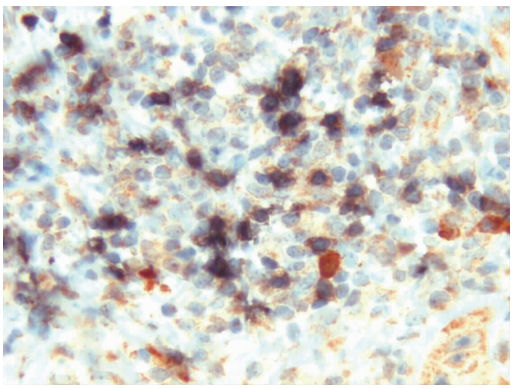


图 4 口腔扁平苔藓局部 $CD8^+$ 淋巴细胞与颗粒酶双标阳性表达 (S-P ×200)

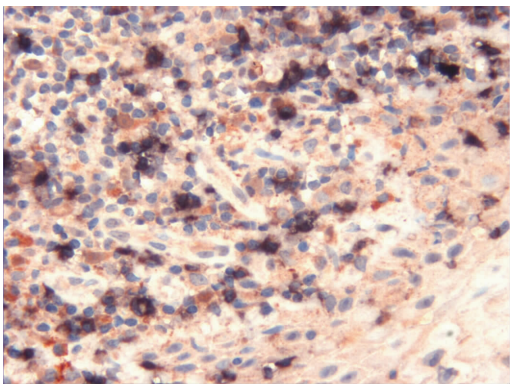


图 5 口腔扁平苔藓局部 $CD8^+$ 淋巴细胞与穿孔素双标阳性表达 (S-P ×200)

3 讨论

研究表明,OLP是由于局部T淋巴细胞所介导的细胞免疫造成的损害,口腔上皮细胞成为T细胞特别是$CD8^+$细胞毒性T细胞(CTL)进行攻击的靶细胞。理论上,CTL主要通过两种方式实现对靶细胞的杀伤作用,一是激活靶细胞上的死亡受体(如Fas)启动凋亡程序;二是针对靶细胞定向释放细胞毒颗粒(如颗粒酶、穿孔素等),诱导细胞凋亡。本实验发现OLP上皮细胞凋亡增加,且糜烂萎缩型尤为严重。其淋巴细胞表达颗粒酶B和穿孔素明显增强,与以往研究结果类似[2-3],且糜烂萎缩型OLP上皮细胞的凋亡与颗粒酶、穿孔素表达呈正相关关系。进一步作免疫组化双标记实验,结果OLP $CD8^+$ T细胞中以上2种抗原表达升高,提示颗粒酶B/穿孔素途径可能是CTL参与OLP发病机制的方式之一,在OLP上皮细胞异常凋亡过程中可能起作用。

颗粒酶B属丝氨酸蛋白家族成员,存在于活化的细胞毒性细胞(如CTL和NK细胞)中,依赖穿孔素在靶细胞膜上形成的孔道或其他方式进入靶细胞中,通过多种途径(如Caspas/ICAD凋亡途径、线粒体途径、死亡底物途径等)迅速引起靶DNA断裂、细胞死亡[4]。穿孔素在结构和功能上类似补体C9,同样存在于细胞毒性细胞中,一旦细胞受到激活,其表达则显著升高。穿孔素能在靶细胞膜上形成孔道,使膜通透性增加[5]。

OLP上皮细胞的破坏与其固有层密集的T淋巴细胞浸润有直接联系[6]。本实验显示OLP上皮细胞凋亡显著升高,其淋巴细胞表达颗粒酶B和穿孔素增强,提示OLP中的T淋巴细胞在受到多种因素如炎性细胞因子IL-2、IFN-γ的刺激下得以激活,从而以颗粒外吐的形式作用于OLP上皮细胞,从不同途径启动凋亡机制,发挥细胞毒作用,使细胞凋亡。而且,萎缩糜烂型OLP表达颗粒酶B和穿孔素较非糜烂型更高,且其上皮细胞凋亡与颗粒酶B和穿孔素表达呈正比,提示T细胞的细胞毒强弱与OLP病情变化有关,当细胞毒作用增强时,在数量上和程度上对上皮细胞的破坏愈加严重,致使细胞大量死亡,临床表现为口腔上皮萎缩、糜烂,病情趋于恶化。OLP中对口腔上皮细胞起细胞毒效应作用的T细胞主要是$CD8^+$ T细胞[7]。本实验的另一侧重点是采用免疫组化双标记技术,对颗粒酶B和穿孔素在$CD8^+$ T细胞中的表达情况进行定位检测,结果显示OLP中$CD8^+$ T细胞表达颗粒酶和穿孔素较正常对照组有明显升高,且双染阳性细胞多集中分布于基底层下方,提示$CD8^+$ T细胞可能通过分泌颗粒酶B和穿孔素,作用于上皮基底细胞,使其凋亡、溶解等。

传统理论认为,细胞毒细胞激活后,与靶细胞接触,释放穿孔素和颗粒酶B,穿孔素以单体形式,在有Ca^{2+}存在的条件下,于靶细胞膜上形成多聚穿孔素,即所谓"孔道",颗粒酶通过此孔道进入靶细胞发挥细胞毒效应。虽然近年有证据提示颗粒酶还可通过其他途径如受体内化途径、静电交换模型等进入靶细胞[4]。但研究表明,当颗粒酶在亚剂量的穿孔素存在时,颗粒酶胞吐不但速度快,而且效率高,快速引起靶细胞凋亡[8]。本实验18例颗粒酶阳性OLP和14例穿孔素阳性OLP中,有13例表现为2种抗原共表达,且13例中糜烂型OLP占多数,提示颗粒酶与穿孔素协同作用,导致上皮基底细胞大量凋亡和死亡,促使基底层液化变性,糜烂形成。其他分别表达颗粒酶与穿孔素的例次,多数是非糜烂型OLP,可能二者单独损伤上皮细胞的作用较小,因而不容易造成上皮基底细胞的大量破坏。

本实验表明,OLP淋巴细胞包括$CD8^+$ T细胞,表达颗粒酶B和穿孔素增强,显示颗粒酶B和穿孔素作为细胞毒介质,可能对靶细胞——OLP上皮细胞起细胞毒作用,从而参与OLP的发病。

参考文献:

[1] Shimizu M, Higaki Y, Higaki M, *et al*. The role of granzyme B-expressing CD8-positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus[J]. Arch Dermatol Res, 1997, 289(9): 527-532.

[2] Pimentel V N, de-Matos L S, Soares T C, *et al*. Perforin and granzyme B involvement in oral lesions of lichen planus and chronic GVHD[J]. J Oral Pathol Med, 2010, 39(10): 741-746.

[3] Santoro A, Majorana A, Bardellini E, *et al*. Cytotoxic molecule expression and epithelial cell apoptosis in oral and cutaneous lichen planus[J]. Am J Clin Pathol, 2004, 121(5): 758-764.

[4] Christensen M E, Waterhouse N J. Mechanisms of CTL cytotoxicity. A reactive response to granzyme B[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(5): 500-501.

[5] Voskoboinik I, Dunstone M A, Baran K, *et al*. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology[J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 35-54.

[6] Roopashree M R, Gondhalekar R V, Shashikanth M C, *et al*. Pathogenesis of oral lichen planus-a review[J]. J Oral Pathol Med, 2010, 39(10): 729-734.

[7] Zhou X J, Sugerman P B, Savage N W, *et al*. Intra-epithelial $CD8^+$ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2002, 31(1): 23-27.

[8] Pipkin M E, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works[J]. Cur Opin Immunol, 2007, 19(3): 301-308.

(**收稿**:2011-03-28;**修回**:2011-05-05)

(编辑 张 维)