

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2017.11.007

· 基础研究 ·

血管生成相关因子在口腔扁平苔藓中的表达

孟文霞, 郭薇, 李志强, 谢宝仪, 殷操, 姚艳梅, 李菊兄
南方医科大学口腔医院, 广东 广州 (510280)

【摘要】 目的 研究血管生成相关因子血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)在口腔扁平苔藓患者血清和组织中的表达情况。**方法** 30例扁平苔藓患者纳入扁平苔藓组, 15例健康志愿者作为对照(正常组)用于血清收集, 收集扁平苔藓组织患者活检组织30例及外科手术切除的多余正常口腔黏膜组织15例, 应用免疫组织化学技术分析 VEGF、ICAM-1、VCAM-1 分别在扁平苔藓病损局部组织及正常黏膜组织中的表达情况。**结果** ELISA 结果显示 VEGF 在 2 组血清中表达差异无统计学意义($t = 1.837, P = 0.074$), 而 ICAM-1($t = 2.730, P = 0.009$)、VCAM-1($t = 2.167, P = 0.035$)在扁平苔藓组血清中的表达明显高于正常组。免疫组织化学染色结果显示 VEGF、ICAM-1、VCAM-1 在口腔黏膜正常上皮中呈现少量阳性表达或阴性表达, 而在扁平苔藓组织中 VEGF($\chi^2 = 33.632, P < 0.05$)、ICAM-1($\chi^2 = 45.000, P < 0.05$)、VCAM-1($\chi^2 = 37.286, P < 0.05$)表达较正常黏膜组织均出现上调趋势。**结论** 在扁平苔藓患者的血清和病变组织中, 血管生成相关因子表达上调。

【关键词】 口腔扁平苔藓; 血管生成; 酶联免疫吸附测定; VEGF; ICAM-1; VCAM-1

【中图分类号】 R781.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)11-0712-06

【引用著录格式】 孟文霞, 郭薇, 李志强, 等. 血管生成相关因子在口腔扁平苔藓中的表达[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(11): 712-717.

Angiogenesis-related factors expression in oral lichen planus MENG Wenxia, GUO Wei, LI Zhiqiang, XIE Baoyi, YIN Cao, YAO Yanmei, LI Juxiong. Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: MENG Wenxia, Email: 37709882@qq.com, Tel: 0086-20-84427024

【Abstract】 Objective To detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in oral lichen planus (OLP). **Methods** Thirty OLP patients and fifteen healthy subjects were enrolled in the study. Serum were collected from 15 healthy volunteers as controls. Normal tissues were collected from surgical department as immunohistochemical analysis. The levels of VEGF, ICAM-1, VCAM-1 in serum were measured by ELISA. Immunohistochemical analysis of VEGF, ICAM-1, VCAM-1 were carried out by the means of primary antibodies and anti-VEGF, anti-CD106 antigen (VCAM-1) and anti-CD54 antigen (ICAM-1). **Results** ELISA results showed no expression differences for VEGF between the two groups. Whereas, the levels of ICAM-1, VCAM-1 in OLP group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical results reveal the presence of a significant angiogenesis in OLP patients through the immunoexpression of VEGF, ICAM-1, VCAM-1 according to the percentage of stained cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Regarding the results, it seems that high expression of VCAM-1 and ICAM-1 are related to oral lichen planus.

【Key words】 Oral lichen planus; Angiogenesis; ELISA; VEGF; ICAM-1; VCAM-1

【收稿日期】 2017-08-07; **【修回日期】** 2017-09-19

【基金项目】 国家自然科学基金(81500850); 广东省医学科学技术研究基金(A2015537)

【通信作者】 孟文霞, 副主任医师, 博士, Email: 37709882@qq.com

口腔扁平苔藓是一种多因素参与并介导的,发生于口腔黏膜的慢性炎症性疾病。临床上主要表现为以小丘疹连成的线状、树枝状、网状白色条纹,可伴有充血、糜烂、溃疡、萎缩和水疱形成。口腔扁平苔藓好发于中年女性,其患病率为0.4%~4.0%,为口腔黏膜常见病之一,发病年龄逐渐趋向年轻化^[1]。口腔扁平苔藓易受多因素影响,导致病情反复发作,迁延难愈,长期糜烂区域不仅可导致局部纤维增生,影响张口,还有潜在恶变现象。目前国内学者对T淋巴细胞介导的自身免疫反应在口腔扁平苔藓的发病中所起的重要作用已进行深入研究,且被广泛认同。但是其病理特点提示,口腔扁平苔藓以炎性浸润为主,如基底细胞层液化变性、固有层淋巴细胞呈带状浸润等。血管生成被认为是连接慢性炎症和肿瘤之间的桥梁,过度的血管生成同时也是多种慢性炎症及肿瘤进一步发展的标志^[2]。研究显示:促炎因子如肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1等都具有促血管生成的作用,而炎症细胞如巨噬细胞可分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种血管生长因子,所以炎症通常可以诱发血管生成^[3]。在炎症组织内,不断新生的毛细血管增加了血管内皮细胞的表面积,从而产生更多的细胞黏附分子,如细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)等,使更多的炎症细胞迁移或渗透到局部炎症区域,导致炎症状态迁延不愈。随着研究深入,学者发现血管生成与口腔扁平苔藓慢性炎症息息相关^[4-5]。ICAM-1和VCAM-1为免疫球蛋白超家族的成员,在介导细胞免疫机制以及炎症疾病、肿瘤等多种生理、病理过程中均具有重要作用,通过调节造血干细胞动员和归巢到病损处,诱发局部血管生成来促进炎症反应。然而,继Scardina等^[6]在2007年和2009年首次报道ICAM-1和VCAM-1与扁平苔藓的相互关系后至今,目前关于血管生成与口腔扁平苔藓的研究报道仍较少,尚处于起步阶段,且研究结果不一致。进一步阐述血管生成在口腔扁平苔藓的进程中所发挥的作用,有利于为深入揭示扁平苔藓的发病机制奠定基础,同时为扁平苔藓的治疗提供新的理论指导。

1 资料和方法

1.1 研究对象

扁平苔藓组纳入的口腔扁平苔藓患者,根据

临床表现和病理学检查,符合世界卫生组织关于口腔扁平苔藓的诊断标准,排除患有其他系统性疾病、其他口腔黏膜疾病以及近3个月使用过免疫制剂者。对于符合纳入标准的患者,详细记录其口腔扁平苔藓病损部位、类型、累计范围等临床资料。社会招募健康成人志愿者作为对照(正常组)用于血清收集,要求正常组和扁平苔藓组在年龄、性别等基线无统计学差异。扁平苔藓组30例,对照组15例,患者知情同意。

外周血样本采集:无菌采集口腔扁平苔藓患者、健康正常对照外周非抗凝血5 mL,离心分离血清,-80℃保存。

组织标本收集:活检法获取口腔扁平苔藓及正常口腔黏膜上皮组织(外科手术中切除的多余正常黏膜组织),将活检组织置于10%中性福尔马林溶液中石蜡包埋,用于组织病理学诊断,并采用免疫组织化学染色方法检测VEGF、ICAM-1、VCAM-1的表达。患者知情同意。

1.2 主要试剂

人ICAM-1/CD54非等位基因特异性酶联免疫试剂盒(R&D Systems,美国);人sVCAM-1/CD106酶联免疫试剂盒(R&D Systems,美国);人VEGF酶联免疫试剂盒(R&D Systems,美国);免疫组化DAB显色试剂盒(DAKO,美国);HRP标记羊抗兔鼠通用抗体(DAKO,美国);VEGF鼠单克隆抗体(1:500; Santa Cruz,美国)、VCAM-1(1:200; Abcam,美国)、ICAM-1(1:3 000; Abcam,美国)。

1.3 酶联免疫吸附实验

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中VEGF、ICAM-1、VCAM-1的浓度。根据说明书,用针对VEGF、ICAM-1、VCAM-1的推荐检测参数,分别将不同浓度的标准品和实验样本加入相对应的孔中,室温摇床上震荡孵育,孵育一定时间后,将板内液体吸去并向每孔加洗涤工作液400 μ L,用手轻轻晃动10 s,然后将板内洗涤液甩出,并在吸水纸上轻拍,去除残留液体。重复洗涤操作4次。向每个孔中加入酶标检测抗体,室温摇床上震荡孵育,所加体积及孵育时间依检测项目而定。通过洗涤液清洗彻底后,向每孔中加入显色底物,封住反应孔,室温摇床孵育。待一定时间后加入终止液,其颜色由蓝色变为黄色。终止后30 min内于450 nm处测量吸光度(OD值)。所有样品均测定3次取其平均值。

1.4 免疫组织化学染色

组织经10%中性福尔马林固定,石蜡包埋制作标本切片。切片脱蜡至水,置于盛满EDTA抗原修复缓冲液(pH 9.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。切片放入3%过氧化氢液室温避光孵育25 min, PBS洗涤3次,行血清封闭。轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加PBS按一定比例配好的一抗,切片平放于湿盒内4℃孵育过夜。磷酸盐缓冲液洗涤3次,每次5 min;滴加生物素化二抗,37℃孵育50 min。磷酸盐缓冲液洗涤3次,每次5 min;滴加DAB显色,镜下观察,适时终止;苏木素复染,自来水冲洗15 min;氨水返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,加拿大树胶或中性树胶封片。所有标本均在同一条件下染色。

免疫组织化学染色结果判读:每例随机选取10个高倍镜视野计数,染色分值及结果记录如下:染色分值“0”(表达缺失),分值1(低表达,阳性细胞数 $\leq 25\%$),分值2(中度表达, $25\% <$ 阳性细胞数 $\leq 75\%$),分值3(高表达,阳性细胞数 $> 75\%$)进行蛋白表达水平研究^[3,7]。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行数据分析,组间百分数的比较采用多个独立样本非参数检验(K Independent Samples Tests),各组间均数的比较采用 t 检验,检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 血清中VEGF、ICAM-1、VCAM-1的表达

扁平苔藓组患者与正常组血清中VEGF、ICAM-1、VCAM-1表达水平如表1所示。

表1 扁平苔藓组患者和正常组血清中VEGF、ICAM-1、VCAM-1的总量比较

Table 1 Total amount of VEGF、ICAM-1、VCAM-1 in Lichen planus and normal group			
	$\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$		
组别	VEGF	ICAM-1	VCAM-1
扁平苔藓组	0.145 ± 0.096	278.023 ± 60.133	728.395 ± 207.599
正常组	0.077 ± 0.044	229.127 ± 39.219	598.863 ± 135.687
P 值	0.074	0.009	0.035
t 值	1.837	2.730	2.167

注 VEGF:血管内皮生长因子; ICAM-1:细胞间黏附分子-1; VCAM-1:血管细胞黏附分子-1。

扁平苔藓组患者血清中VEGF浓度与正常组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);扁平苔藓组患者血清中ICAM-1、VCAM-1的浓度显著高于正常

组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 口腔扁平苔藓组织中VEGF、ICAM-1、VCAM-1的表达

扁平苔藓组30例具有扁平苔藓临床表现的患者均经病理切片染色证实,符合扁平苔藓的病理学特点。正常组15例正常组织来源于外科手术中切除的边缘多余的非炎性正常黏膜组织。45例组织均行VEGF、ICAM-1、VCAM-1免疫组化染色。

免疫组化结果显示:VEGF在正常组上皮和固有层中表达少量阳性表达或阴性表达,而在扁平苔藓组的上皮细胞胞质和固有层淋巴细胞浸润带中均有明显强阳性着色($\chi^2 = 33.632$, $P < 0.05$)(图1)。

ICAM-1在正常口腔黏膜固有层中呈阴性着色,本试验中15例全部表达为阴性。而在扁平苔藓的上皮层和固有层淋巴细胞浸润带中均有阳性着色($\chi^2 = 45.000$, $P < 0.05$)(图2)。

VCAM-1在扁平苔藓组织中表达明显高于正常黏膜组织($\chi^2 = 37.286$, $P < 0.05$)(图3)。

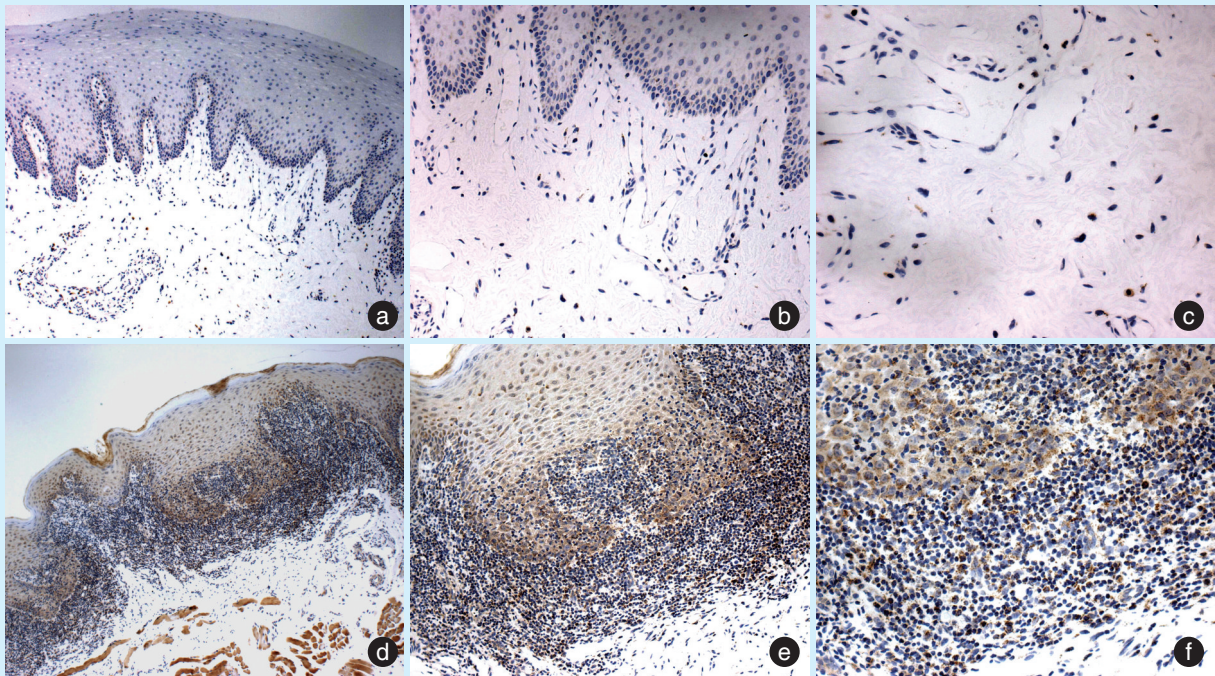
3 讨论

3.1 口腔扁平苔藓与血管生成

血管生成(Angiogenesis)是指机体从已有的微血管床上芽生出新的毛细血管的过程,在多种生理和病理过程中扮演着重要角色^[8-9]。在肿瘤组织内,肿瘤细胞也产生某些血管形成因子如bFGF、VEGF等,引发肿瘤的血管形成,并对其生物学行为产生重要的影响^[10]。针对扁平苔藓,以往研究多倾向认为:扁平苔藓病损中伴随着的血管生成与组织内缺氧有关,而炎症反应则提示了局部淋巴细胞的过度增生^[11]。随着研究深入,学者发现血管异常增生及内皮细胞的功能失调,与口腔扁平苔藓慢性炎症息息相关。已有学者采用免疫组织化学法检测到口腔扁平苔藓病损组织的微血管密度高于正常口腔黏膜组织,其中,糜烂型口腔扁平苔藓各项指标均高于非糜烂型^[12]。但也有研究证明口腔扁平苔藓不同病理类型间无显著差异^[13]。

3.2 VEGF、ICAM-1、VCAM-1在血清和扁平苔藓病损局部组织中的表达

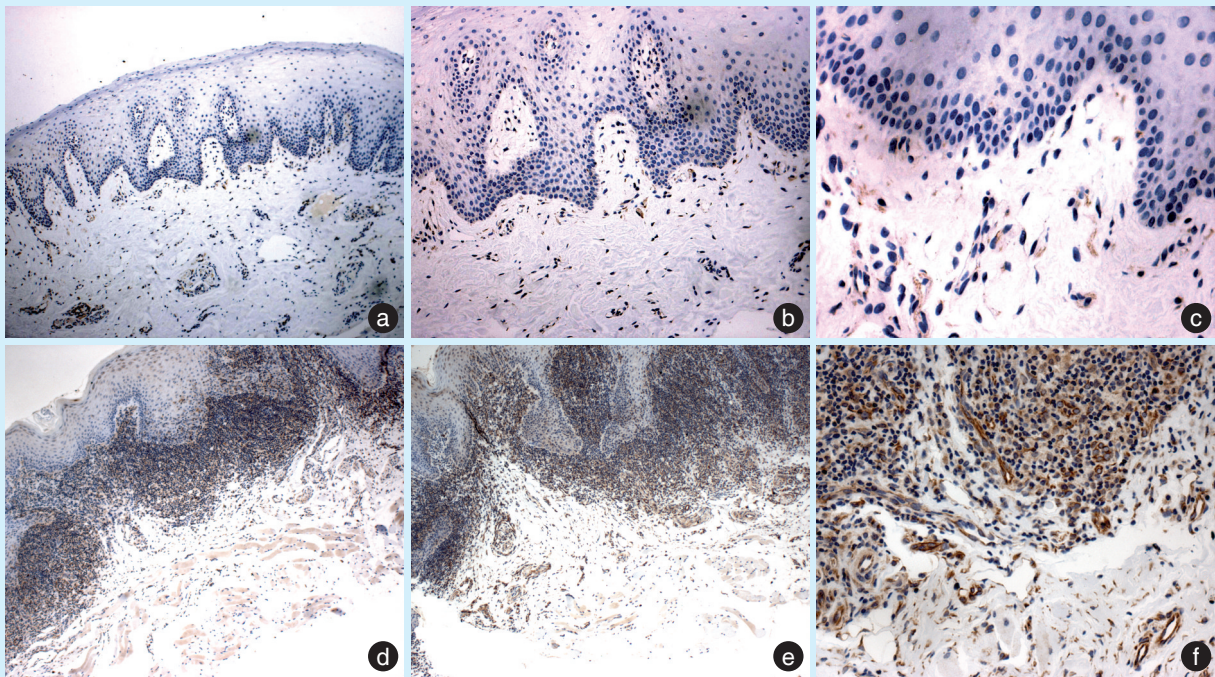
研究结果显示:ICAM-1和VCAM-1在口腔扁平苔藓患者血清和组织中的表达均明显高于正常人。虽然在血清中未检测到VEGF的表达差异,但在局部组织中VEGF表达两组中差异显著,这可能与本研究中样本量不足有关。一般情况下,ICAM-1



a: 正常组 $\times 100$; b: 正常组 $\times 200$; c: 正常组 $\times 400$; d: 扁平苔藓组 $\times 100$; e: 扁平苔藓组 $\times 200$; f: 扁平苔藓组 $\times 400$; VEGF: 血管内皮生长因子。

图1 VEGF在口腔正常组织与扁平苔藓组织中的表达 免疫组化

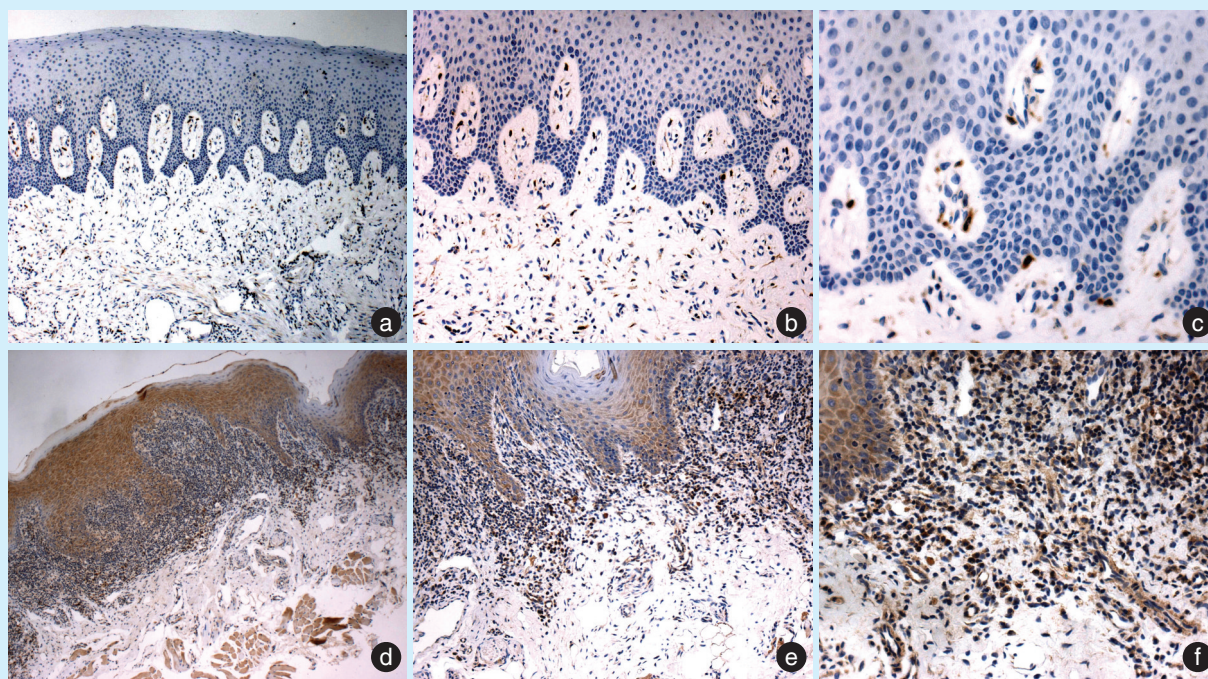
Figure 1 The expression of VEGF on normal and oral lichen planus tissues IHC



a: 正常组 $\times 100$; b: 正常组 $\times 200$; c: 正常组 $\times 400$; d: 扁平苔藓组 $\times 100$; e: 扁平苔藓组 $\times 200$; f: 扁平苔藓组 $\times 400$; ICAM-1: 细胞间黏附分子-1。

图2 ICAM-1在口腔正常组织与扁平苔藓组织中的表达 免疫组化

Figure 2 The expression of ICAM-1 on normal and oral lichen planus tissues IHC



a: 正常组 $\times 100$; b: 正常组 $\times 200$; c: 正常组 $\times 400$; d: 扁平苔藓组 $\times 100$; e: 扁平苔藓组 $\times 200$; f: 扁平苔藓组 $\times 400$; VCAM-1: 血管细胞黏附分子-1。

图3 VCAM-1在口腔正常组织与扁平苔藓组织中的表达 免疫组化

Figure 3 The expression of VCAM-1 on normal and oral lichen planus tissues IHC

和VCAM-1表达于内皮细胞和淋巴细胞中。扁平苔藓组织中两者的高表达可促使血管和淋巴细胞的增加。因此,推测血管生成在扁平苔藓的免疫炎症反应中起着重要的调节作用,血管反应是通过激活扁平苔藓内皮细胞活性和炎症因子释放形成的。

ICAM-1是免疫球蛋白家族成员,可以与整合素-2 β 、淋巴细胞相关抗原-1(lymphocyte associated antigen-1, LFA1)以及Mac1结合。血循环中几乎所有的淋巴细胞都表达LFA1, ICAM-1与LFA1结合反应对于淋巴细胞粘附并迁移到炎症区域具有十分重要作用。有研究发现,口腔扁平苔藓组织中,微血管密度的增加与ICAM-1高表达密切相关,提示ICAM-1在淋巴细胞从血循环迁移到局部组织中发挥重要作用^[14]。Little等^[15]研究发现, ICAM-1不仅表达于内皮细胞,在扁平苔藓的角质层上皮细胞中均检测到有表达,而在正常上皮层中不表达,这与本研究的结果相一致。VCAM-1同样属于免疫球蛋白结合家族,它与整合素-1 β 和细胞黏附分子缓慢抗原-4(very late antigen-4, VLA4)结合,通常存在于记忆性T细胞表面,在免疫性介导的炎症

组织中表达升高^[16]。而ICAM-1和VCAM-1可作为新生血管形成的生理性指标。

VEGF是重要的促血管生长因子,正常人组织中呈低水平表达,本试验中在扁平苔藓组织的上皮和淋巴细胞中均有高表达,提示临床上局部抗VEGF生成治疗有可能成为口腔扁平苔藓的一种替代治疗。巨噬细胞和其它免疫系统内细胞分泌的VEGF可促进血管增殖及内皮细胞迁移^[17]。VEGF在扁平苔藓病损局部的血管生成中起到了重要作用,而血管生成对于扁平苔藓的病程加重同样发挥着重要作用。抗血管生成疗法已对一些慢性炎症、糖尿病性视网膜病变起到了积极治疗作用,并逐渐成为肿瘤治疗的新策略^[18-19]。高效且可直接作用于口腔扁平苔藓病灶内的抗血管生成药物有望在口腔扁平苔藓的治疗中发挥积极作用,具有潜在应用前景。

参考文献

- [1] 刘铁军, 张杨杨, 刘健, 等. 化湿行瘀清热方剂对口腔扁平苔藓患者唾液中差异蛋白的影响[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(13): 2231-2235.

- [2] El-Rouby DH. Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas[J]. J Oral Pathol Med, 2010, 39(7): 559-564.
- [3] Seyedmajidi M, Shafaei S, Bijani A, et al. VCAM-1 and ICAM-1 expression in oral lichen planus[J]. Int J Mol Cell Med, 2013, 2(1): 34-40.
- [4] Mittal N, Shankari GM, Palaskar S. Role of angiogenesis in the pathogenesis of oral lichen planus[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2012, 16(1): 45-48.
- [5] Mardani M, Ghabanchi J, Fattahi MJ, et al. Serum level of vascular endothelial growth factor in patients with different clinical Sub-typeS of oral lichen planus[J]. Iran J Med Sci, 2012, 37(4): 233-237.
- [6] Scardina GA, Ruggieri A, Messina P, et al. Angiogenesis of oral lichen planus: a possible pathogenetic mechanism[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2009, 14(11): e558-e562.
- [7] 李艳章, 明放郭, 雪西. 结直肠癌患者组织和外周血中细胞黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1 的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2016, 23(8): 903-905.
- [8] Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(7): 505-514.
- [9] Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: Cause or consequence?[J]. Angiogenesis, 2007, 10(3): 149-166.
- [10] Shojaei F. Anti-angiogenesis therapy in cancer: Current challenges and future perspectives[J]. Cancer Lett, 2012, 320(2): 130-137.
- [11] Gavic L, Cigic L, Biocina Lukenda D, et al. The role of anxiety, depression, and psychological stress on the clinical status of recurrent aphthous stomatitis and oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2014, 43(6): 410-417.
- [12] Villarroel Dorrego M, Correnti M, Delgado R, et al. Oral lichen planus: immunohistology of mucosal lesions[J]. J Oral Pathol Med, 2002, 31(7): 410-414.
- [13] Scardina GA, Ruggieri A, Messina P, et al. Angiogenesis of oral lichen planus: a possible pathogenetic mechanism[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2009, 14(11): e558-e562.
- [14] Sangeetha S, Victor D. The molecular aspects of oral mucocutaneous diseases: a review[J]. Int J Genet Mol Biol, 2011, 3: 141-148.
- [15] Little MC, Griffiths CE, Watson RE, et al. Oral mucosal keratinocytes express RANTES and ICAM-1, but not interleukin-8, in oral lichen planus and oral lichenoid reactions induced by amalgam fillings[J]. Clin Exp Dermatol, 2003, 28(1): 64-69.
- [16] Verginelli F, Adesso L, Limon I, et al. Activation of an endothelial Notch1 - Jagged1 circuit induces VCAM1 expression, an effect amplified by interleukin - 1 β [J]. Oncotarget, 2015, 6(41): 43216-43229.
- [17] Liao KH, Chang SJ, Chang HC, et al. Endothelial angiogenesis is directed by RUNX1T1-regulated VEGFA, BMP4 and TGF- β 2 expression[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0179758.
- [18] Vignesh S, Deepthi S, Sivashanmugam A, et al. Pro-angiogenic molecules for therapeutic angiogenesis[J]. Curr Med Chem, 2017, Jul 24. doi: 10.2174/0929867324666170724142641.
- [19] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. Cell, 2011, 146(6): 873-887.

(编辑 张琳,徐平平)

欢迎投稿 欢迎订阅