

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.018

Egr-1 与 TNF- α 在口腔扁平苔藓病损中表达的研究张 新¹, 吕晓丹², 漆 明³, 韩恩善⁴, 师志云⁵

(1. 宁夏医科大学口腔医学院口腔内科, 银川 750004; 2. 石家庄市第二医院口腔科, 石家庄 050000; 3. 宁夏医科大学总医院口腔科, 银川 750004; 4. 宁夏医科大学总医院中心实验室, 银川 750004; 5. 宁夏医科大学总医院病理科, 银川 750004)

【摘 要】目的: 研究早期生长反应基因-1 (Early growth response gene-1, Egr-1) 和肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 在口腔扁平苔藓 (Oral lichen planus, OLP) 组织中的表达及其是否存在相关性。方法: 采用免疫组织化学法和 Western blot 技术检测 30 例正常口腔黏膜 (Normal oral mucosa, NOM) 组织与 30 例 OLP 组织中 Egr-1 和 TNF- α 的表达情况。结果: (1) 上皮层中 Egr-1、TNF- α 在 NOM 组和 OLP 组均有表达, 两组比较 Egr-1 表达无统计学意义 ($P>0.05$), TNF- α 表达为 OLP 组高于 NOM 组 ($P<0.05$); 在固有层中 Egr-1、TNF- α 的表达均为 OLP 组高于 NOM 组 ($P<0.05$)。 (2) Egr-1 与 TNF- α 的表达量均为 OLP 组高于 NOM 组 ($P<0.05$)。 (3) 在 OLP 组中 Egr-1、TNF- α 表达呈正相关 ($r=0.447, P<0.05$)。结论: Egr-1 和 TNF- α 是 OLP 发病的重要因素之一, Egr-1 可能调控 TNF- α 的过量释放引起 OLP 的发病; 两者的作用机制有待于进一步研究。

【关键词】口腔扁平苔藓; 早期生长反应基因-1; 肿瘤坏死因子- α

【中国图书分类法分类号】R781.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-07-19

The study on the expression of Egr-1 and TNF- α in oral lichen planusZHANG Xin¹, LV Xiaodan², QI Ming³, HAN Enshan⁴, SHI Zhiyun⁵

(1. Department of Oral Medicine, School of Stomatology, Ningxia Medical University; 2. Department of Stomatology, the Second Shijiazhuang Hospital; 3. Department of Stomatology, Hospital of Ningxia Medical University; 4. Center Laboratory, Hospital of Ningxia Medical University; 5. Department of Pathology, Hospital of Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of Egr-1 and TNF- α in normal oral mucosa (NOM) and oral lichen planus (OLP) and their correlation. Methods: Using immunohistochemistry and Western blot technique, the expressions of early growth response gene-1 (Egr-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the tissues samples (30 cases of NOM tissues and 30 cases of OLP tissues) were detected. Results: (1) In epithelial lamina Egr-1 and TNF- α had expressed both in NOM and OLP, the expression of Egr-1 was no significant difference in the two groups ($P>0.05$), the expression of TNF- α in OLP group was significantly higher than that in NOM group ($P<0.05$); in lamina propria the expression of Egr-1 and TNF- α in OLP group was significantly higher than that in NOM group ($P<0.05$). (2) The expressed quantity of Egr-1 and TNF- α in OLP group was significantly higher than that in NOM group ($P<0.05$). (3) The expression of Egr-1 and TNF- α in OLP showed a positive correlation ($r=0.447, P<0.05$). Conclusion: Egr-1 and TNF- α were one of the most important factor of OLP, TNF- α excess release of OLP onset may be caused by Egr-1 regulation; The mechanism of action remains to be further studied.

【Key words】oral lichen planus; Egr-1; TNF- α

早期生长反应基因-1 (Early growth response gene-1, Egr-1) 为核转录因子, 其生物学功能主要是通过激活或抑制靶基因的表达式来实现的, 其活化过程是许多炎症相关性疾病发生发展的重要环节^[1], 可调节多种炎症因子的表达, 有研究发现 Egr-1 参与了口腔扁平苔藓 (Oral lichen planus, OLP) 的发生发展^[2]。肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是

一种分子量为 17 kD 的蛋白质, 与其相应受体结合, 参与自身免疫的炎症过程^[3]。有研究发现 OLP 患者唾液^[4]、血清^[5]中 TNF- α 水平明显高于正常组, 是 OLP 炎症反应中关键性细胞因子。迄今, 有关 Egr-1 和 TNF- α 在 OLP 发病机制中的关系研究还未见报道。本文通过检测分析正常口腔黏膜 (Normal oral mucosa, NOM) 组织和 OLP 中 Egr-1 和 TNF- α 的表达情况, 探讨二者在 OLP 发病过程中的作用及相是否存在关联性。

作者介绍: 张 新 (1984-), 女, 硕士,

研究方向: 口腔黏膜病学。

通信作者: 漆 明, 女, 教授, Email: qiming61@sina.com。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 对照组 NOM 30 例正常口腔黏膜组织来自宁夏医科大学总医院口腔科门诊实习学生及工作人员自愿捐献(男 11 例,女 19 例),年龄 21~57 岁,无吸烟、饮酒习惯且无全身性系统疾病;黏膜组织均取自颊黏膜,约 0.5 cm × 1.0 cm 大,并经病理确诊。

1.1.2 实验组 OLP 30 例口腔扁平苔藓组织取自宁夏医科大学总医院口腔科门诊的初诊患者(男 10 例,女 20 例),年龄 27~63 岁,近两月内未使用过激素类或免疫调节等药物;征得患者同意,从未糜烂的病变颊黏膜切去约 0.5 cm × 1.0 cm 大的黏膜组织,并经病理确诊。

1.2 主要试剂

浓缩型兔抗人 Egr-1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),浓缩型兔抗人 TNF- α 多克隆抗体(北京博奥森公司),PV9001 免疫组化试剂盒,DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),ECL 化学发光试剂盒(美国 Thermo 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 采用免疫组织化学染色 PV9001 法检测 Egr-1 和 TNF- α 在组织中的表达部位及强度。操作步骤:切片 4 μ m,60℃烤片过夜;常规脱蜡水化,水洗;高温高压抗原修复 5 min;3% H₂O₂ 室温孵育 20 min;滴加一抗 37℃孵育 2 h;滴加二抗试剂 1(聚合物辅助剂),室温孵育 20 min;滴加二抗试剂 2(辣根酶标记抗 IgG 多聚体),室温孵育 20 min,每步骤间用 PBS 冲洗 5 min × 3 次;DAB 显色;复染;封片。阴性对照用 PBS 代替一抗,阳性对照用已知阳性切片。所有实验标本均经石蜡包埋,切片,HE 染色检查。

1.3.2 Western blot 技术检测 Egr-1 和 TNF- α 在组织中的表达量。操作步骤:组织等量称取,加入裂解液,超声匀浆后取总蛋白,蛋白定量(BCA 法);10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

分离,转移到 PVDF 膜上,稳定电流 40 min;加入 5%脱脂牛奶封闭液缓冲 2 h;加入一抗(Egr-1,1:300;TNF- α ,1:100)或 β -actin 抗体(1:300)4℃过夜,含 0.05%Tween20 的 PBS 液洗涤 3 次;加入二抗室温孵育 2 h;ECL 化学发光试剂盒进行检测。

1.4 结果判定

1.4.1 免疫组织化学结果判定 Egr-1 和 TNF- α 染色的阳性信号为胞浆或胞核出现棕黄色颗粒,每张切片随机选取 5 个高倍视野(计数 200 个细胞/视野),观察阳性细胞染色强度并计数阳性细胞百分率。首先按照染色强度记分:0 分为无染色,1 分为浅黄色,2 分为黄色,3 分为棕黄色;再按照阳性细胞百分比记分:阳性细胞 < 5% 为 0 分,5%~24% 为 1 分,25%~49% 为 2 分,50%~74% 为 3 分,≥ 75% 为 4 分。两者相乘 0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~7 分为阳性(++),8~12 分为强阳性(+++)。

1.4.2 Western blot 技术图象分析 显影结果经 Quantityone 软件进行图片分析、计算净光密度值。并以 Bio-Image Analysis System 进行半定量分析,结果以相对光密度值(Relative optical density,ROD) × 面积(mm²)表示。蛋白的相对含量=(目的蛋白条带 ROD × mm²)/(β -actin 条带 ROD × mm²)。

1.5 统计学处理

数据采用 SPSS11.5 统计软件处理,免疫组化数据为等级资料,采用 Wilcoxon 秩和检验。Western blot 的数据以均数 ± 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示,为计量资料,采用 *t* 检验;相关性分析用 Pearson 相关性分析;阳性率比较采用卡方检验。检验水准定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Egr-1、TNF- α 在 NOM 和 OLP 组织中的表达及定位

免疫组织化学染色结果见图 1~3,NOM 和 OLP 组表达强度比较表 1、表 2。Egr-1、TNF- α 的阳性染色均呈棕黄色颗粒;Egr-1 定位于细胞的胞浆和(或)胞核;TNF- α 定位于细

表 1 Egr-1 蛋白在 NOM 组与 OLP 组的表达及其比较分析

Tab.1 The expression and comparison of Egr-1 in NOM and OLP tissues

部位	组别	例数	Egr-1 的表达				Z	P
			-	+	++	+++		
上皮层	NOM	30	10	14	6	0	-0.437	> 0.05
	OLP	30	8	21	1	0		
固有层	NOM	30	30	0	0	0	-7.194	< 0.05
	OLP	30	0	9	15	6		

表 2 TNF- α 蛋白在 NOM 组与 OLP 组的表达及其比较分析

Tab.2 The expression and comparison of TNF- α in NOM and OLP tissues

部位	组别	例数	TNF- α 的表达				Z	P
			-	+	++	+++		
上皮层	NOM	30	13	16	1	0	-3.305	< 0.05
	OLP	30	8	5	8	9		
固有层	NOM	30	30	0	0	0	-6.806	< 0.05
	OLP	30	2	6	8	14		

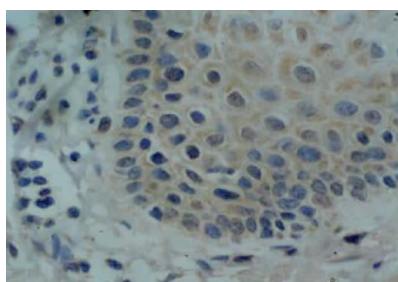


图 1 Egr-1 在 OLP 上皮层的表达
(400 ×)

Fig.1 The expression of Egr-1 in epithelial lamina in OLP (400 ×)

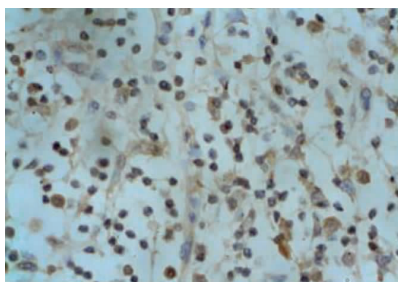


图 2 Egr-1 在 OLP 固有层的表达
(400 ×)

Fig.2 The expression of Egr-1 in lamina propria in OLP (400 ×)

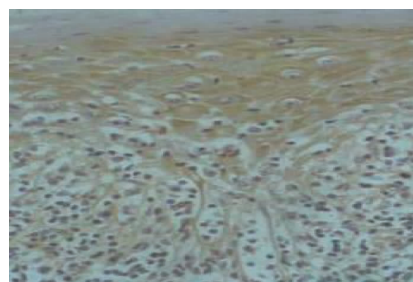


图 3 TNF-α 在 OLP 上皮层、固有层的表达
(200 ×)

Fig.3 The expression of Egr-1 in epithelial lamina and lamina propria in OLP (200 ×)

表 3 Egr-1、TNF-α 在 NOM 组和 OLP 组的表达

Tab.3 The expression of Egr-1 and TNF-α in NOM and OLP tissues

组别	例数	Egr-1		TNF-α	
		-	+	-	+
NOM	30	10	20	12	18
OLP	30	3	27	4	26
χ^2		4.812		5.455	
P		< 0.05		< 0.05	

表 4 Egr-1、TNF-α 在 NOM 组和 OLP 组的蛋白表达量及其比较分析

Tab.4 The expression and comparison of Egr-1 and TNF-α in NOM and OLP tissues

组别	例数	Egr-1	TNF-α
		Egr-1/β-actin	TNF-α/β-actin
NOM	30	0.315 ± 0.095	0.233 ± 0.219
OLP	30	0.501 ± 0.133	0.548 ± 0.277
t		-6.233	-4.886
P		< 0.05	< 0.05

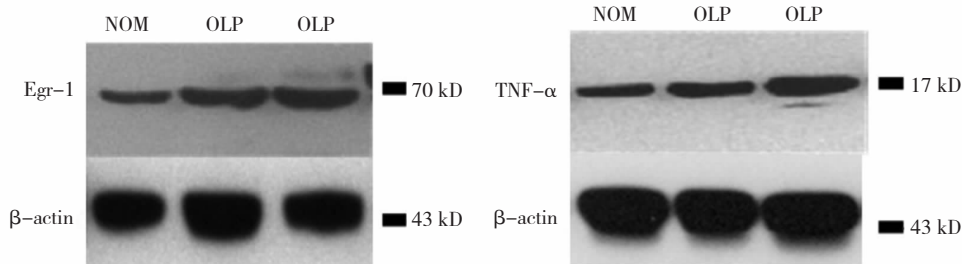


图 4 Western blot 法在 NOM 组、OLP 组检测到 Egr-1 和 TNF-α 蛋白表达

Fig.4 The expression of Egr-1 and TNF-α in OLP and NOM used Western blot

胞的胞浆和(或)胞膜。

2.2 Egr-1、TNF-α 在 NOM 和 OLP 组织中的表达量及相关性

Western blot 检测结果见图 4, 分别在 NOM 组和 OLP 组中检测到 Egr-1、TNF-α 蛋白的表达, 在 70 kD 处检测到 Egr-1 目的条带、在 17 kD 处检测到 TNF-α 目的条带, 43 kD 处检测到内参 β-actin。Egr-1、TNF-α 在 NOM 和 OLP 组织中蛋白表达量的比较分析结果见表 3、4。

在 OLP 组中, Egr-1 与 TNF-α 表达量经 Pearson 相关性分析, $r=0.447$, $P=0.013<0.05$ 。

3 讨 论

OLP 是一种常见的口腔黏膜疾病, 其临床表现为发生在口腔黏膜上的条纹状、网状、斑块状、萎缩状、糜烂状等改变, 可累及皮肤。病因和发病机制仍不明确, 但目前研究大多数

倾向于 OLP 是由 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病^[9]。

当前 OLP 的发病机制大多是从细胞因子角度来研究的。不同的细胞因子相互交叉相互影响, 随着近年来对 Egr-1 的研究, Egr-1 与炎症介质释放的关系也引起了人们的高度重视。有研究证实^[7]Egr-1 锌指蛋白在免疫系统中调控 T 细胞、B 细胞的活化及细胞因子的产生和作用, 通过信号转导分子和核转录因子的作用诱导产生细胞表面的受体。Egr-1 可以调节多种炎症介质, 如转化生长因子-β1、细胞间粘附因子-1 等的表达, 是炎症的关键转录因子^[8]。牛海艳^[9]等实验结果证明活化的 Egr-1 可以增强二氧化硅所致的巨噬细胞 TNF-α mRNA 的表达; Silverman ES^[10]等用卵白蛋白诱导 Egr-1 敲除小鼠气道炎症, 发现小鼠肥大细胞表达 TNF-α mRNA 明显减少, 小鼠气道对变应原的刺激反应迟钝。上述研究均说明 Egr-1 能调节 TNF-α 等多种细胞因子的表达, 同时证实细胞因子 TNF-α 含有转录因子 Egr-1 的结合位点。

本文研究结果显示 TNF- α 在 OLP 组上皮层中的表达明显高于 NOM 组,可能是 OLP 发病期间上皮层中 TNF- α 的过量释放,TNF- α 对上皮细胞作用显著,高浓度的 TNF- α 具有细胞毒作用,因而导致了口腔黏膜上皮的损伤。TNF- α 位于淋巴细胞浸润带。淋巴细胞是分泌 TNF- α 的主要细胞,而 TNF- α 促进淋巴细胞向上皮层的迁移与聚集,所以固有层中 TNF- α 的过量释放是 OLP 发病的基础。TNF- α 还是细胞凋亡的主要途径之一^[11],TNF- α 和特异性的上皮细胞表面死亡受体 TNFR1 结合后,将死亡信号从细胞外传递到细胞内,导致了上皮细胞的损伤。

Egr-1 在固有层 OLP 组的表达显著高于 NOM 组 ($P < 0.05$),说明 Egr-1 在 OLP 的发病过程中起着重要作用。前期的研究认为各种刺激激活了 Egr-1,其调节细胞因子的表达增生,如 TNF- α 、转化生长因子- β 1、细胞间粘附因子-1 因子,而这些细胞因子又可以诱导 Egr-1 的表达,由此形成了一个扩增环,进一步增加了 Egr-1 的效能^[12]。推测在 OLP 发病过程中由于大量的刺激导致了机体内免疫炎症的紊乱,激活了 Egr-1,引起了 TNF- α 的过量释放。在 OLP 病变组织中 Egr-1 与 TNF- α 的表达呈正相关 ($r = 0.447, P < 0.05$),说明可能是 TNF- α 随着 Egr-1 蛋白表达的增加而增高。已有研究证实:细胞外各种刺激诱导 Egr-1 的基因表达,Egr-1 蛋白与靶基因 5' 上游特定的结合位点作用,上调众多靶基因如 TNF- α mRNA 的转录与蛋白的合成;表达的 TNF- α 本身又可作为刺激原激活核转录因子 Egr-1^[13]。所以我们认为口腔黏膜受到刺激后,激活了 Egr-1,其诱导 TNF- α 的过量释放,导致了 OLP 的病理变化和临床症状。

通过本文研究,说明 Egr-1 和 TNF- α 是 OLP 发病的重要因素之一,TNF- α 的过量释放引起 OLP 的发病可能是通过 Egr-1 的调控;两者的作用机制有待于进一步研究。然而,也有研究认为 NF- κ Bp 在 OLP 发病过程中起重要作用,其同样调控 TNF- α 的释放;Egr-1、NF- κ Bp 两个核转录因子以及其他一些研究究竟哪一个在 OLP 发病中发挥得作用更大也有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Ogishima T, Shiina H, Breault J E, et al. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up regulation of transcription factor early growth response factor-1 in human prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1028-1036.
- [2] 刘丽, 臧磊, 吕晓丹, 等. Egr-1 在口腔扁平苔藓及口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(2): 204-206.
- [3] Liu L, Zang L, Lv X D, et al. Expression and significance of Egr-1 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2010, 32(2): 204-206.
- [4] 夏金晶, 李晓敏, 殷咏梅. TNF- α 调控乳腺癌细胞中 CD44 的表达及其机制的探讨[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(7): 593-597.
- [5] Xia J J, Li X M, Yin Y M, et al. TNF- α regulate the expression of CD44 in human breast cancer cell line MCF-7[J]. Chinese Clinical Oncology, 2009, 14(7): 593-597.
- [6] Sklavounou-AndrikoPoulou A, Chrysomali E, Iakovou M, et al. Elevated serum levels of the apoptosis related molecules TNF- α , Fas/Apo-1 and Bcl-2 in oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2004, 33(7): 386-390.
- [7] Khan A, Farah C S, Savage N W, et al. Th1 cytokines in oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2003, 32(2): 77-83.
- [8] 左雯鑫, 秦念红, 李晓宇, 等. 他克莫司软膏治疗口腔扁平苔藓的短期疗效评价[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(5): 422-424.
- [9] Zuo W X, Qin N H, Li X Y, et al. Short-term clinical evaluation of tacrolimus 0.1% ointment for treatment of oral lichen planus[J]. Journal of Oral Science Research, 2011, 27(5): 422-424.
- [10] 李荣平, 李伟毅. 锌指蛋白在免疫学研究中的进展[J]. 免疫学杂志, 2009, 5(25-3): 357-360.
- [11] Li R P, Li W Y. Approaches of zinc finger protein in immune researches[J]. Immunological Journal, 2009, 5(25-3): 357-360.
- [12] 高峰, 张中平, 陈育建. 胃癌 Egr-1 基因表达水平与临床病理的关系[J]. 广东医学, 2009, 30(6): 940-942.
- [13] Gao F, Zhang Z P, Chen Y J. Correlation of Egr-1 gene expression and clinicopathologic features in gastric cancer[J]. Guangdong Medical Journal, 2009, 30(6): 940-942.
- [14] 牛海艳, 王金胜, 马志健, 等. 早期生长反应基因-1 对巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(50): 9875-9878.
- [15] Niu H Y, Wang J S, Ma Z J, et al. Influence of early growth response gene-1 on tumor necrosis factor alpha in macrophages[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(50): 9875-9878.
- [16] Silverman E S, De Sanctis G T, Boyce J, et al. The transcription factor early growth response factor1 modulates tumor necrosis factor- α , immunoglobulin E, and airway responsiveness in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt 1): 778-785.
- [17] 陈昱铭, 曾晖, 康斌, 等. TNF- α 对人滑膜细胞 RANKL、OPG mRNA 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(9): 1301-1307.
- [18] Chen Y M, Zeng H, Kang B, et al. Effects of TNF- α on the expressions of RANKL and OPG mRNA in human synovial cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2009, 19(9): 1301-1307.
- [19] 房定珠, 廖清奎. 早期生长反应基因-1 生物学特性及与肿瘤的关系[J]. 国外医学儿科学分册, 2003, 30(5): 271-273.
- [20] Fang D Z, Liao Q K. Correlation of Egr-1 biological characteristics and tumour[J]. Foreign Medical Sciences Section of Pediatrics, 2003, 30(5): 271-273.
- [21] Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, et al. TNF- α induces expression of transcription factor c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2[J]. Atherosclerosis, 2001, 159(1): 93-101.

(责任编辑: 关蕴良)