

## 临床研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000568

## 口腔扁平苔藓患者外周血 Th1/Th2 型细胞因子表达及意义

罗 亮<sup>1</sup>,王冬平<sup>1</sup>,蔡 扬<sup>1</sup>,张 洛<sup>2</sup>

(1. 贵阳医学院附属医院口腔内科, 贵阳 550004; 2. 贵州省人民医院口腔科, 贵阳 550002)

**【摘要】目的:**了解口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)患者外周血中 Th1、Th2 型细胞因子表达水平,探讨 Th1/Th2 平衡在 OLP 发病中的作用及意义。**方法:**采用流式细胞术(cytometric bead array, CBA)检测 51 例 OLP 患者(网纹型 23 例,充血糜烂型 28 例)Th1 型细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2)及 Th2 型细胞因子(IL-4、IL-6、IL-10)表达水平,并分析其与 OLP 临床特征相关性。**结果:**①OLP 患者血清中 Th2 型细胞因子的 IL-6 与 IL-10 的表达水平明显高于正常对照组( $P<0.05$ ),但 Th1 型细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 及 Th2 型细胞因子 IL-4 表达水平与正常组差异无统计学意义( $P>0.05$ );②Th2 型细胞因子 IL-6 的表达水平与 OLP 临床类型、临床体征、临床症状均成正相关,IL-10 的表达水平与 OLP 临床类型、临床体征均成正相关(相关系数 0.285~0.364;  $P<0.05$ )。**结论:**OLP 患者外周血中 Th1 型细胞因子的表达水平与正常对照组 Th1 型细胞因子表达水平差异无明显改变,而 Th2 型细胞因子升高,表现为 Th2 占优势的免疫应答;Th2 型细胞因子 IL-6、IL-10 表达与 OLP 患者病情严重程度呈正相关,对 OLP 免疫治疗有一定指导意义。

**【关键词】**口腔扁平苔藓;辅助性 T 细胞;细胞因子微球检测技术

**【中图分类号】**R781.5<sup>9</sup>

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2014-09-11

## Expression and significance of Th1/Th2 cytokines in peripheral blood of patients with oral lichen planus

Luo Liang<sup>1</sup>, Wang Dongping<sup>1</sup>, Cai Yang<sup>1</sup>, Zhang Luo<sup>2</sup>

(1. Department of Stomatology, The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College;

2. Department of Stomatology, Guizhou Provincial People's Hospital)

**【Abstract】Objective:** To investigate the expression of Th1/Th2 cytokines in peripheral blood of patients with oral lichen planus (OLP) and to discuss the role and significance of Th1/Th2 cytokines in the pathogenesis of OLP. **Methods:** Totally 51 cases of OLP with different clinical characters (including 23 cases of reticular OLP and 28 cases of hyperaemia erosion OLP) were enrolled. Cytometric bead array was employed to detect the level of type 1 cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) and type 2 cytokines (IL-4, IL-6, IL-10) of T helper cells in serum of patients with OLP. The relationship between the levels of these cytokines and the clinical characteristics of patients with OLP was analyzed. **Results:** Expression levels of IL-6 and IL-10 in the peripheral blood of patients with OLP were statistically increased compared with those of controls ( $P<0.05$ ), but no statistical difference was observed in level of Th1 cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) and IL-4 between OLP patients and controls ( $P>0.05$ ). Expression levels of IL-6 and IL-10 were positively correlated with clinical characters ( $r: 0.285-0.364$ ;  $P<0.05$ ). **Conclusion:** Th1 cytokines remain unchanged and Th2 cytokines increase in OLP patients, showing the advantage of Th2 immune response. Levels of IL-6 and IL-10 are positively correlated with disease severity, which may be helpful for OLP immunotherapy.

**【Key words】** oral lichen planus; T helper cells; cytometric bead array

作者介绍: 罗 亮, Email: luoliang5@foxmail.com,

研究方向: 口腔黏膜病学。

通信作者: 蔡 扬, Email: caiyang85@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81460104); 贵州省优

秀科技教育人才省长资金资助项目(编号: 黔省专合字

(2009)38 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150318.1555.004.html>

(2015-03-18)

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)发病机制目前尚不明确,但已有大量研究表明 T 细胞介导的免疫功能改变与其发病机制密切相关。有学者认为,CD4<sup>+</sup>辅助性 T 细胞(T helper cell, Th)在 OLP 的发病机制中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞可以分化成 Th1、Th2 2 个细胞亚群。Th1 和 Th2 细胞的动态平衡对于维持机体正常的免疫功能十分重要。现已有研究表明 OLP 患者病损处、唾液、组织渗出液等中 Th1、Th2 出现失衡<sup>[2]</sup>,提示 OLP 的发病机制可能与 Th 细胞分化失衡有关,但对于 OLP 患者外周血中 Th1、Th2 细胞平衡状态的研究结果尚无统一结论。本研究通过检测 OLP 患者外周血中 Th1、Th2 型细胞因子表达水平,并分析其与 OLP 临床特征的相关性,探讨 Th1/Th2 平衡在 OLP 发病中的作用及意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 病例选择 病例选自 2011 年 9 月至 2012 年 9 月间贵阳医学院附属医院口腔内科黏膜病专科门诊 OLP 初诊患者 51 例,其中男 21 例,女 30 例;参照第 3 版《口腔黏膜病学》的 OLP 临床分型标准<sup>[3]</sup>:网纹型(非糜烂型)23 例,充血糜烂型 28 例,病损分布在颊、舌、口底、牙龈、唇等部位,均不伴皮损。所有病例均经过病理确诊。对象排除标准:(1)患者 1 个月内局部或全身使用过抗生素,3 个月内局部或全身使用过皮质激素,免疫制剂等相关药物者;(2)患者伴有全身系统性疾病(包括糖尿病、心血管疾病、肝炎、精神病),既往有免疫系统性疾病等;(3)口腔检查有牙龈炎、牙周炎以及除其他口腔黏膜疾病和肿瘤等;(4)女性处于月经期、妊娠期。24 例对照组来自贵阳医学院附属医院体检中心,年龄、性别与 OLP 组匹配的正常健康人。本研究经贵阳医学院附属医院伦理学委员会审核批准,所有研究对象均被告知研究内容并签定知情同意书。

1.1.2 评价标准 对纳入研究患者的临床观察指标参照中华口腔医学会口腔黏膜病专业委员会拟定的 OLP(萎缩型,糜烂型)疗效评价标准<sup>[4]</sup>;体征记分(sign)和症状记分(symptom)具体见表 1。

表 1 OLP 临床体征与临床症状标准

Tab.1 Scoring criteria of clinical signs and clinical symptoms of OLP

| Sign (分)                           | Symptom (分)   |
|------------------------------------|---------------|
| 0: 无病损,正常黏膜                        | 0: 无疼痛(0)     |
| 1: 轻微白色条纹,无充血、萎缩或糜烂面               | 1: 轻度疼痛(1~3)  |
| 2: 白色条纹伴充血或萎缩面小于 1 cm <sup>2</sup> | 2: 中度疼痛(4~6)  |
| 3: 白色条纹伴充血或萎缩面大于 1 cm <sup>2</sup> | 3: 重度疼痛(7~10) |
| 4: 白色条纹伴糜烂面小于 1 cm <sup>2</sup>    |               |
| 5: 白色条纹伴糜烂面大于 1 cm <sup>2</sup>    |               |

1.1.3 主要实验设备及试剂 Human Th1/Th2 Cytokine Kit II 试剂盒(美国 BD 公司);流式细胞仪(BD FACSCanto™ II Flow Cytometer, 美国 BD 公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 标本采集及处理 所有标本均采集于清晨 9 点以前,采集者空腹状态下,抽取非抗凝管血液标本 5 ml。1 500 r/min 离心 15 min,提取上清液冻存于 -80 °C 冰箱。

1.2.2 Th1、Th2 型细胞因子检测 按试剂盒要求制作细胞因子标准曲线及 6 种细胞因子混合 beads。每份样品各取 2 支试管分别加入 Th1/Th2 PE 检测试剂 50 μl 或 Th1/Th2 细胞因子标准品稀释液 50 μl,充分摇匀后室温避光孵育 3 h,分别加入 1 ml 洗涤液(2 000 r/min 离心 5 min,弃上清),再分别加 300 μl 洗涤液,漩涡振荡 3~5 s 后立即上机检测。用 BD CaliBRITE beads 运行 BDFACSCOMP Lyse/NO Wash 模式,建立、优化前向角散射,侧向角散射,阈值及补偿。在 BD CBAInstrument Setup template 运行 Cytometer Setup Beads。在 Cellquest 软件建立获取模式、检测细胞因子。

### 1.3 统计学处理

所有检测资料使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。因数据不符合正态分布,采用中位数  $M(Q_1-Q_3)$  进行描述,统计分析采用 K-WH 检验,组间两两比较采用 Nemenyi 检验;各因素间相关性分析采用 Spearman 相关分析;检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 OLP 患者 Th1、Th2 型细胞因子表达情况

Th1、Th2 型细胞因子表达量在正常对照组中为 0.1~20.5 pg/ml,在 OLP 患者中为 0.1~20.8 pg/ml,除正常对照组中 Th2 分泌的 IL-4、IL-6 外,其余数据离散程度均较大,呈非正态分布,故采用 K-WH 检验进行分析,组间两两比较采用 Nemenyi 检验。

在不同临床类型 OLP 患者中,Th1 型细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 的表达水平与对照组相比差异均无统计学意义( $P>0.05$ );Th2 型细胞因子 IL-6、IL-10 在充血糜烂型 OLP 患者中的表达水平与正常对照组相比均增高,差异有统计学意义( $H_1=7.10, P_1=0.03; H_2=8.01, P_2=0.02$ )。Th2 型细胞因子 IL-4 的表达水平,IFN- $\gamma$ /IL-4 比值在不同临床类型 OLP 患者与对照组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

### 2.2 Th1、Th2 型细胞因子与 OLP 临床特征的相关性

采用 Spearman 相关性分析;OLP 患者血清中 Th2 型细胞因子 IL-6 的表达水平与临床类型( $r=0.288, P=0.012$ )、临床体征( $r=0.332, P=0.004$ )及临床症状( $r=0.384, P=0.001$ )均成正相关;IL-10 的表达水平与临床类型( $r=0.285, P=0.013$ )及临床体征( $r=0.296, P=0.010$ )成正相关性;但 Th1 型细胞因子与 OLP 临床特征无相关性( $P>0.05$ )。见表 3。

表 2 OLP 患者血清 Th1、Th2 细胞因子水平 ( pg/ml,  $M(Q_1 \sim Q_3)$  )Tab.2 Th1, Th2 cytokines levels in blood serum of patients with OLP ( pg/ml,  $M(Q_1 \sim Q_3)$  )

| 组别      | 例数 | Th1 型细胞因子     |               |               | Th2 型细胞因子    |                           |                           | IFN- $\gamma$ /IL-4 |
|---------|----|---------------|---------------|---------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
|         |    | TNF- $\alpha$ | IFN- $\gamma$ | IL-2          | IL-4         | IL-6                      | IL-10                     |                     |
| 正常对照组   | 24 | 0.1(0.1~1.5)  | 0.1(0.1~0.1)  | 8.3(0.1~10.5) | 1.6(1.2~2.5) | 2.6(1.9~3.1)              | 1.4(0.1~2.1)              | 0.9(0.0~0.5)        |
| 网纹型 OLP | 23 | 0.1(0.1~0.1)  | 0.1(0.1~1.3)  | 6.8(2.9~8.7)  | 2.0(1.6~3.0) | 3.1(2.2~3.6)              | 1.5(0.1~1.6)              | 0.8(0.1~0.5)        |
| 充糜型 OLP | 28 | 0.1(0.1~1.0)  | 0.1(0.1~1.6)  | 8.0(4.3~9.1)  | 2.3(1.7~2.5) | 3.1(2.5~3.8) <sup>a</sup> | 1.8(1.6~2.6) <sup>a</sup> | 0.6(0.0~0.5)        |

注: a, 与正常对照组比较,  $P < 0.05$

表 3 Th1、Th2 型细胞因子与 OLP 临床特征的相关性

Tab.3 Correlation between Th1, Th2 cytokines and the clinical characteristics of OLP

| 细胞因子          | 临床类型   |       | 临床体征   |       | 临床症状   |                    |
|---------------|--------|-------|--------|-------|--------|--------------------|
|               | $r$    | $P$   | $r$    | $P$   | $r$    | $P$                |
| TNF- $\alpha$ | -0.040 | 0.732 | -0.066 | 0.574 | -0.029 | 0.120              |
| IFN- $\gamma$ | 0.092  | 0.434 | 0.065  | 0.581 | -0.040 | 0.735              |
| IL-2          | 0.145  | 0.216 | 0.091  | 0.439 | 0.083  | 0.478              |
| IL-4          | 0.116  | 0.322 | 0.067  | 0.565 | 0.124  | 0.288              |
| IL-6          | 0.288  | 0.012 | 0.332  | 0.004 | 0.384  | 0.001 <sup>a</sup> |
| IL-10         | 0.285  | 0.013 | 0.296  | 0.010 | 0.171  | 0.142              |

### 3 讨论

OLP 是常见的口腔黏膜慢性炎症性疾病。目前研究表明, 免疫因素在 OLP 的发病中起重要作用。T 细胞介导的细胞免疫反应被认为与该病发病机制密切相关, 其中 Th1、Th2 的失衡及其分泌的细胞因子与 OLP 密切相关。

Th1/Th2 细胞间的平衡是体内体液免疫及细胞免疫间重要的调节枢纽<sup>[5]</sup>, Th1、Th2 细胞可以通过分泌各种细胞因子来完成各种免疫应答。Th1 细胞主要分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  等致炎因子, 介导与细胞毒和局部炎症有关的免疫应答。Th2 细胞则主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 等抗炎性因子, 其主要功能为刺激 B 细胞增殖并产生抗体, 与体液免疫相关。在本研究中, 不同 OLP 患者 Th1、Th2 型细胞因子的表达水平差异较大, 提示患者存在一定的个体异质性。结果显示无论是网纹型还是充血糜烂型 OLP 患者血清中 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的表达水平与正常对照组相比差异均无统计学意义, 提示在 OLP 患者外周血中 Th1 细胞因子变化不明显, 与很多文献报道的结果相符<sup>[6-7]</sup>; Th2 型细胞因子中的 IL-6、IL-10 与正常对照组相比均明显增高, 提示 OLP 是一种 Th2 占优势的免疫应答。这与本课题组前期研究 OLP 患者外周血 PBMC 中

Th1、Th2 极化的重要调控因子 T-bet 和 GATA 3 表达结果相一致<sup>[8]</sup>。分析 Th1、Th2 型细胞因子与临床特征的关系。结果显示: 随着病情的加重, IL-6 与 IL-10 的表达水平也明显增高, 导致这一结果的原因可能为: 在急性炎症早期, IL-6 可以减弱 IFN- $\gamma$  等炎性因子作用, 减少中性粒细胞聚集, 增强 IL-1 受体拮抗蛋白等抗炎因子的作用, 同时加速干细胞急性期蛋白的合成和分泌, 增强抗炎作用, 从而维护机体内环境平衡。在炎症后期及慢性炎症过程中, IL-6 可促进 B 细胞分化增殖, 促进抗体分泌从而调节体液免疫; 也可促进 T 细胞分化与激活, 一方面维持内环境平衡, 另一方面, 增多的 IL-6 可刺激多种细胞分泌 TNF、IL-1 等炎性因子, 促进炎性细胞浸润, 使局部组织破坏, 维持炎症的发展。IL-10 可通过抑制 T 细胞产生 IL-2 和 IFN- $\gamma$  直接影响 T 细胞的分化和增殖, 也可通过抑制 CD28 信号传导通路作用于幼稚 CD4<sup>+</sup>T 细胞<sup>[9]</sup>, 即能够抑制细胞因子的合成和抗原提呈, 也能抑制大多数参与炎症反应的趋化因子的表达。当局部的炎症加剧时, 机体会产生较多的抑制免疫反应的物质, 因而全身的 IL-10 有所升高; 另外, 机体通过提升 IL-10, 既可抑制巨噬细胞的活化, 也可抑制自身反应性淋巴细胞激活和扩增, 从而维持外周免疫耐受。由此推测 OLP 患者机体通过提高 IL-10 的水平来对抗 Th1 细胞在局部的优势表达, 以平衡 Th1、Th2 细胞。

本研究中 OLP 患者外周血清中 Th2 代表性细胞因子 IL-4 表达水平与正常对照组相比差异无统计学意义。有研究认为 OLP 患者血清中 IL-4 表达水平有明显升高,其水平升高可能是机体为抑制 OLP 过高的细胞免疫、防止组织过度损伤的自我防御机制的表现。但也有很多研究显示 OLP 患者血清中 IL-4 表达水平与正常对照组比较无明显改变<sup>[2]</sup>。张筱薇等<sup>[10]</sup>采用 ELISA 方法检测 60 例各型 OLP 患者血清 IL-2、IL-4、IL-6 的水平,结果显示 OLP 患者血清 IL-2、IL-4 水平较对照组无统计学差异,而各型 OLP 患者 IL-6 显著升高,虽然研究方法不同,但所得出的结果与本研究结果相似。不同研究小组中 OLP 患者 IL-4 表达水平的差异可能是因为纳入研究的患者地域不同或纳入临床类型比例的不同所造成。虽然严格来讲 IL-4 不是一个抗炎性细胞因子,但是在某些情况下它可通过对抗 Th1 类免疫应答来调节自身免疫。

现多数文献以 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值的变化判断 Th1/Th2 漂移状况,在本研究中从 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值来看,OLP 组较正常对照组无明显差异,但从 Th1、Th2 型细胞因子表达总体情况来看,Th1 型细胞因子在 OLP 患者中改变不明显,而绝大多数 Th2 型细胞因子明显增高,也提示 OLP 患者外周血中 Th1/Th2 失衡可能是向 Th2 漂移,与现有大多数文献相符<sup>[11]</sup>。Th1 细胞主要介导细胞免疫,Th2 细胞则与体液免疫相关。本研究结果表现为 Th2 占优势的免疫应答,即抑制细胞免疫而促进体液免疫,这与本课题组前期研究中 OLP 患者细胞免疫功能降低,体液免疫功能亢进的结果大致吻合<sup>[12]</sup>,推测 Th1/Th2 失衡可能是导致 OLP 患者免疫功能异常的原因之一。所以本研究结果还提示仅用 IFN- $\gamma$ /IL-4 比值来反映 Th1/Th2 漂移状况不够全面。因为 Th1、Th2 细胞中包含多种细胞因子,应将各种细胞因子综合起来分析才不会出现“以偏概全”的现象。

目前国内外学者对于 OLP 的研究多为仅检测 Th1、Th2 细胞的代表性因子或采用 ELISA 法检测多种因子的表达水平<sup>[13-14]</sup>。而本研究是采用流式细胞微球捕获技术对 OLP 患者外周血清中 Th1 及

Th2 类细胞因子同时进行检测,不仅检测的细胞因子较为全面,也避免不同批次检测结果之间的差异,使研究结果更加准确可靠。本研究结果提示 Th1/Th2 失衡在 OLP 免疫发病机制中可能起一定作用,研究结果可为进一步了解 OLP 免疫发病机制,探索 OLP 免疫治疗新途径提供依据。

## 参 考 文 献

- [1] Lodi G, Scully C, Carrozzo M, et al. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005, 100(1): 40-51.
- [2] 陶小安. 口腔扁平苔藓患者组织体液 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的检测及意义[D]. 广州: 中山大学, 2005.
- [3] 李秉琦. 口腔黏膜病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 103.
- [4] 张宏伟, 吴 昊. 外周血 CD4+CD8+T 细胞研究进展[J]. 北京医学, 2006, 28(2): 108-109.
- [5] Alves CR, Benévolo-De-Andrade, Alves JL, et al. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis[J]. Parasite Immunol, 2004, 26(3): 127-135.
- [6] Kalogerakou F, Albanidou-Farmaki E, Markopoulos AK, et al. Detection of T cells secreting type 1 and type 2 cytokines in the peripheral blood of patients with oral lichen planus[J]. Hippokratia, 2008, 12(4): 230-235.
- [7] 韩阳平. Th1/Th2 细胞及其相关细胞因子在口腔扁平苔藓发病中作用的探讨[D]. 福州: 福建医科大学, 2011.
- [8] 丰秋婧, 蔡 扬. 口腔扁平苔藓患者外周血 T-bet 和 GATA 3 mRNA 表达及意义[J]. 实用口腔医学杂志, 2012, 28(5): 623-626.
- [9] 冯祥汝, 陈义龙, 卢 强. 白细胞介素-10 的生物学功能及其在疾病中的作用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(3): 74-77.
- [10] 张筱薇, 张 强, 王 扬, 等. 口腔扁平苔藓患者血清 IL-2、IL-4、IL-6 水平与临床症状的相关性[J]. 广东牙病防治, 2004, 12(2): 106-108.
- [11] 石展鹰, 周春晓, 文 民, 等. 口腔扁平苔藓患者唾液 TNF- $\alpha$  检测意义[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 241-242.
- [12] 王冬平, 姜旺展, 蔡 扬, 等. 口腔扁平苔藓患者免疫功能状况与临床特征相关性分析[J]. 实用口腔医学杂志, 2014, 30(5): 54-57.
- [13] 曾 娟, 刘青兰, 范 媛. 口腔扁平苔藓患者 Th1/Th2 的表达及临床意义的研究[J]. 口腔医学, 2011, 31(5): 291-293.
- [14] 邓冠红, 韩阳平, 王海瑞, 等. IL-2、IL-10 在口腔扁平苔藓中的作用[J]. 临床口腔医学杂志, 2012, 28(12): 715-717.

(责任编辑: 关蕴良)