

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170723.008

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170723.2122.016.html>

# IRAK1、TRAF6 表达量与口腔扁平苔藓病灶内炎症反应、免疫应答的相关性研究

徐建英

(四川省资阳市第一人民医院口腔科, 四川 资阳 641300)

**[摘要]** **目的:** 研究 IRAK1、TRAF6 表达量与口腔扁平苔藓病灶内炎症反应、免疫应答的相关性。**方法:** 选择在本院诊断为口腔扁平苔藓的患者作为研究的 OLP 组, 收集口腔扁平苔藓病灶组织; 另取同期因口腔外伤或颌面部整形接受手术的 42 例患者作为研究的对照组, 收集正常口腔黏膜组织。检测组织样本中 IRAK1、TRAF6、TLR4 信号通路分子、Th1/Th2 /Treg/Th17 转录因子及细胞因子的表达量。**结果:** OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 IRAK1、TRAF6、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达量和蛋白表达量均显著低于对照组, T-bet、IFN- $\gamma$  的含量均显著低于对照组, GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t、IL-4、IL-10、IL-17 的含量均显著高于对照组; 口腔黏膜组织中 IRAK1、TRAF6 的表达量与 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的表达量以及 T-bet、IFN- $\gamma$  的含量呈正相关, 与 GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t、IL-4、IL-10、IL-17 的含量呈负相关。**结论:** 口腔扁平苔藓病灶内 IRAK1、TRAF6 的表达量能够抑制 TLR4 炎症反应通路并造成 Th1/Th2 /Treg/Th17 免疫应答紊乱。

**[关键词]** 口腔扁平苔藓; IL-1 受体相关激酶 1; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6; 炎症反应; 免疫应答

**[中图分类号]** [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2017)15-2165-04

## Correlation of IRAK1 and TRAF6 expression with inflammatory response and immune response in oral lichen planus lesions

XU Jian-ying

(Department of Stomatology, Ziyang First People's Hospital in Sichuan Province, Ziyang City, Sichuan Province, 641300)

[Foundation Project]: This study was supported by the Sci&Tech Research Project Foundation of Public Health Department of Sichuan Province (11110379).

[Author]: XU Jian-ying (1983-), Female, Ziyang Sichuan, Bachelor, Attending physician, Tel: 13684115416, E-mail: xu1421837654@foxmail.com.

Received: 2017-07-02 Revised: 2017-07-13

JHMC, 2017; 23(15); 2165-2168

**View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.**

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the correlation of IRAK1 and TRAF6 expression with inflammatory response and immune response in oral lichen planus lesions. **Methods:** Patients who were diagnosed with oral lichen planus in Ziyang First People's Hospital were selected as the OLP group of the study, and the oral lichen planus lesions were collected; Forty-two patients who accepted surgery for oral trauma or maxillofacial plastic surgery were selected as the control group of the study, and the normal oral mucosa tissue was collected. The expression of IRAK1, TRAF6 and TLR4 signaling pathway molecules, Th1/Th2 /Treg/Th17 transcription factors and cytokines in tissue samples were detected. **Results:** IRAK1, TRAF6, TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B mRNA expression and protein expression in oral lichen planus lesions of OLP patients were significantly lower than those of control group, T-bet and IFN- $\gamma$  levels of OLP patients were significantly lower than those of control group, and GATA3, FOXP3, ROR $\gamma$ t, IL-4, IL-10 and IL-17 levels of OLP patients were significantly higher than those of control group; IRAK1 and TRAF6 expression in oral mucosa tissue were positively correlated with TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B expres-

[基金项目] 四川省卫生计生科研基金资助项目(编号 11110379)

[作者简介] 徐建英(1983-),女,四川资阳人,本科,主治医师,电话: 13684115416, E-mail: xu1421837654@foxmail.com.

[收稿日期] 2017-07-02 [修回日期] 2017-07-13 网络出版时间: 2017-07-23 21:22:59

sion as well as T-bet and IFN- $\gamma$  levels, while were negatively correlated with GATA3, FOXP3, ROR $\gamma$ t, IL-4, IL-10 and IL-17 levels. **Conclusion:** IRAK1 and TRAF6 expression in oral lichen planus lesions can inhibit the TLR4 inflammatory response pathway and lead to Th1/Th2 /Treg/Th17 immune response disorder.

[KEY WORDS] Oral lichen planus; IL-1 receptor-associated kinase 1; Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; Inflammatory response; Immune response

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是口腔黏膜常见的慢性疾病,黏膜固有层 T 淋巴细胞浸润、上皮基底细胞层受累及并出现角质细胞增生是 OLP 的病理特征<sup>[1,2]</sup>。T 淋巴细胞所介导的免疫应答紊乱、炎症反应异常被认为与 OLP 的发生密切相关,但具体的机制仍未明确。Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)家族中的 TLR4 是在免疫应答和炎症反应中发挥重要调节作用的模式识别受体,通过接头分子 MyD88 的作用能够激活 IL-1 受体相关激酶 1(IL-1 receptor associated kinase 1, IRAK1)和肿瘤坏死因子受体相关因子 6(tumor necrosis factor receptor associated factor 6, TRAF6),进而影响下游多种 T 淋巴细胞亚群的分化、细胞因子的分泌<sup>[3]</sup>。在下列研究中,我们具体分析了 IRAK1、TRAF6 表达量与口腔扁平苔藓病灶内炎症反应、免疫应答的相关性。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选择 2014 年 6 月~2017 年 2 月期间在资阳市第一人民医院诊断为口腔扁平苔藓的 68 例患者作为研究的 OLP 组,所有患者均经病理学活检诊断为口腔扁平苔藓,排除近 3 月使用过免疫制剂、抗生素、非甾体类药物的患者以及合并自身免疫性疾病的患者。选择同期在资阳市第一人民医院因口腔外伤或颌面部整形接受手术的 42 例患者作为研究的对照组。OLP 组中男性 23 例,女性 45 例,年龄 32~58 岁;对照组中男性 14 例,女性 28 例,年龄 29~54 岁。两组患者一般资料的比较无显著性差异。

### 1.2 研究的实验方法

1.2.1 mRNA 表达量检测方法 取口腔扁平苔藓病灶组织和正常口腔黏膜组织,采用 RNA 抽提试剂盒和 cDNA 合成试剂盒分离组织中的 RNA 并合成 cDNA,采用荧光定量

PCR 试剂盒对 cDNA 进行扩增,所用引物分别为 IRAK1、TRAF6、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B,根据 PCR 扩增曲线计算 mRNA 表达量。

1.2.2 蛋白表达量检测方法 取口腔扁平苔藓病灶组织和正常口腔黏膜组织,加入 RIPA 蛋白裂解液并充分研磨组织,分离组织中的蛋白样本后采用酶联免疫吸附试剂盒测定 IRAK1、TRAF6、TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B、T-bet、GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17 的蛋白表达量。

### 1.3 统计学处理

所有数据采用 SPSS21.0 统计软件进行分析处理,对两组间数据进行 t 检验,两计量资料间的相关性进行 Pearson 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 口腔扁平苔藓病灶内的 IRAK1、TRAF6 表达量

OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 IRAK1、TRAF6 的 mRNA 表达量以及蛋白表达量均显著低于对照组。两组患者口腔黏膜组织中 IRAK1、TRAF6 表达量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 口腔扁平苔藓病灶内的 IRAK1、TRAF6 的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	mRNA 表达量(/GAPDH)		蛋白表达量(ng/mL)	
		IRAK1	TRAF6	IRAK1	TRAF6
OLP 组	68	0.37 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.07	2.59 $\pm$ 0.42	1.77 $\pm$ 0.23
对照组	42	1.04 $\pm$ 0.17	1.02 $\pm$ 0.15	6.58 $\pm$ 0.89	5.03 $\pm$ 0.75
t		15.689	11.385	13.289	18.941
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.2 口腔扁平苔藓病灶内 TLR4 信号通路分子的表达量

OLP 组口腔扁平苔藓病灶组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达量和蛋白表达量均显著低于对照组。两组口腔黏膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 表达量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析显示:口腔黏膜组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈正相关。见表 2。

表 2 口腔扁平苔藓病灶内 TLR4 信号通路分子的表达量( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	mRNA 表达量(/GAPDH)			蛋白表达量(ng/mL)		
		TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B	TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B
OLP 组	68	0.33 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.05	3.59 $\pm$ 0.56	1.37 $\pm$ 0.18	1.04 $\pm$ 0.16
对照组	42	1.05 $\pm$ 0.17	0.98 $\pm$ 0.11	1.01 $\pm$ 0.13	8.57 $\pm$ 0.93	4.28 $\pm$ 0.61	3.31 $\pm$ 0.49
t		20.938	9.293	28.755	13.845	21.284	20.327
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.3 口腔扁平苔藓病灶内的 Th1/Th2 /Treg/Th17

OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 T-bet 的含量均显著低于对照组,GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t 的含量均显著

高于对照组。两组患者口腔黏膜组织中 T-bet、GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t 含量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析显示:口腔黏膜组织中 T-bet 的表达量

与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈正相关, GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t 的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈负相关。见表 3。

OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 IFN- $\gamma$  的含量均显著低于对照组, IL-4、IL-10、IL-17 的含量均显著高于对照组。两组患者口腔黏膜组织中 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10、IL-17 含量的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Pearson 相关性分析显示: 口腔黏膜组织中 IFN- $\gamma$  的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈正相关, IL-4、IL-10、IL-17 的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈负相关。见表 4。

表 3 口腔扁平苔藓病灶内 Th1/Th2 /Treg/Th17 转录因子的含量 (ng/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	T-bet	GATA 3	FOXP3	ROR $\gamma$ t
OLP 组	68	1.32 $\pm$ 0.18	1.94 $\pm$ 0.25	1.44 $\pm$ 0.17	0.93 $\pm$ 0.10
对照组	42	3.48 $\pm$ 0.52	0.74 $\pm$ 0.09	0.58 $\pm$ 0.08	0.39 $\pm$ 0.05
<i>t</i>		17.482	13.219	15.485	14.567
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 口腔扁平苔藓病灶内 Th1/Th2 /Treg/Th17 细胞因子的含量 (ng/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10	IL-17
OLP 组	68	10.25 $\pm$ 1.27	7.58 $\pm$ 0.93	5.68 $\pm$ 0.83	9.38 $\pm$ 1.25
对照组	42	18.68 $\pm$ 2.34	3.04 $\pm$ 0.51	2.31 $\pm$ 0.34	3.89 $\pm$ 0.52
<i>t</i>		9.187	12.586	14.029	16.475
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 3 讨论

口腔扁平苔藓 (OLP) 是口腔黏膜常见的慢性疾病, 以口腔黏膜白色网状花纹、斑块并伴有部分糜烂为主要临床表现<sup>[4]</sup>。在 OLP 的病理进程中, 免疫应答失衡和炎症反应异常被认为起到了至关重要的作用。在 OLP 病变的固有层内大量 T 淋巴细胞浸润, 同时会累及上皮基底细胞层及并引起角质细胞增生<sup>[5,6]</sup>。TLRs 家族中的 TLR4 是调节免疫应答和炎症反应的重要成员, IRAK1、TRAF6 是 TLR4 通路中重要的信号转导分子, 当 TLR4 激活状态异常以及 IRAK1、TRAF6 表达量改变时, 会出现免疫应答失衡和炎症反应异常, 进而引起 OLP 的发生<sup>[7]</sup>。在上述研究中, 我们通过分析扁平苔藓病灶内 TLR4 下游分子 IRAK1、TRAF6 的表达量可知: OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 IRAK1、TRAF6 的 mRNA 表达量以及蛋白表达量均显著低于对照组。这就说明 IRAK1、TRAF6 的低表达与口腔扁平苔藓的发生密切相关, 进一步也推测 TLR4 信号通路的抑制及下游炎症反应、免疫应答的紊乱与口腔扁平苔藓的发生有关。

TLR4 在影响免疫应答和炎症反应的过程中, 识别多种病原模式分子后胞内的 TIR 结构域能够

与接头分子 MyD88 相互结合, MyD88 的氨基末端识别 IRAK 后使其激活, 活化的 IRAK 能够激活 TRAF-6、进而使 NF- $\kappa$ B 抑制物的激酶复合物 IKKs 发生活化。当 IKKs 发生活化后, NF- $\kappa$ B 复合物发生降解、NF- $\kappa$ B 与复合物分离并进入细胞核, 影响下游多种细胞因子的表达并调节免疫应答和炎症反应。为了明确口腔扁平苔藓病变过程中 IRAK1、TRAF6 表达的改变是否与 TLR4 通路激活状态有关, 我们对扁平苔藓病灶内 TLR4 及相关信号转导分子的表达量进行了分析, 结果显示: OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的 mRNA 表达量和蛋白表达量均显著低于对照组且与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈正相关关系。这就说明口腔扁平苔藓病变过程中 IRAK1、TRAF6 的低表达与 TLR4 通路活化程度减弱有关, TLR4 通路活化程度减弱所致 IRAK1、TRAF6 低表达会影响下游多种细胞因子的分泌, 进而造成免疫应答失衡、炎症反应异常并引起口腔扁平苔藓的发生。

TLR4 下游调节的细胞因子与 T 淋巴细胞亚群 Th1 的分化成熟密切相关, Th1 细胞在转录因子 T-bet 的诱导下分化成熟并介导局部组织中的细胞免疫应答和迟发性超敏反应<sup>[8,9]</sup>。Th2 是与 Th1 存在相互影响、相互抑制作用的 T 淋巴细胞亚群, 在转录因子 GATA3 的诱导下分化成熟并介导体液免疫应答<sup>[10]</sup>。Th17 和 Treg 是近年来新发现的 T 细胞亚群, 前者能够通过分泌 IL-17 来造成黏膜组织损害<sup>[11]</sup>, 后者则具有免疫抑制作用、能够影响 Th1 细胞的分化成熟<sup>[12]</sup>。我们通过分析口腔扁平苔藓病灶组织中上述 T 细胞亚群转录因子的表达量可知: OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 T-bet 的含量均显著低于对照组, GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t 的含量均显著高于对照组。这就说明 Th1/Th2 /Treg/Th17 细胞亚群分化异常与口腔扁平苔藓的发生密切相关。进一步分析 TLR4 下游分子 IRAK1、TRAF6 与 Th1/Th2 /Treg/Th17 分化的相关性可知: 口腔黏膜组织中 T-bet 的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈正相关, GATA3、FOXP3、ROR $\gamma$ t 的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈负相关。这就说明口腔扁平苔藓病变过程中 IRAK1、TRAF6 的低表达会影响 Th1/Th2 /Treg/Th17 细胞亚群的分化, 进而参与疾病的发生和发展。

Th1/Th2 /Treg/Th17 细胞亚群生物学功能的发挥依赖于相应细胞因子的分泌<sup>[13]</sup>。Th1 和

Th2 细胞因子间存在相互作用、相互影响, Th1 细胞主要分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子, 主要介导细胞免疫应答的过程<sup>[14]</sup>; Th2 主要分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子, 主要介导体液免疫应答并使局部组织中抗体分泌增多<sup>[15]</sup>。我们通过分析病灶中 Th1/Th2 细胞因子的含量可知: OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 IFN- $\gamma$  的含量均显著低于对照组, IL-4 的含量均显著高于对照组。这就说明 Th1/Th2 的平衡向 Th2 偏移与口腔扁平苔藓的发生密切相关。Th17 和 Treg 分别分泌 IL-17 和 IL-10, 前者能够作用于黏膜组织并引起损伤破坏、损伤<sup>[16,17]</sup>, 后者能够抑制 Th1 的分化成熟并使局部组织处于免疫耐受的状态<sup>[18,19]</sup>。我们通过分析病灶中 Th17/Treg 细胞因子含量可知: OLP 组患者口腔扁平苔藓病灶组织中 IL-10、IL-17 的含量均显著高于对照组。这就说明 Th17/Treg 免疫应答增强与口腔扁平苔藓的发生密切相关。进一步分析 TLR4 下游分子 IRAK1、TRAF6 与 Th1/Th2 / Treg/Th17 细胞因子的相关性可知: 口腔黏膜组织中 IFN- $\gamma$  的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈正相关, IL-4、IL-10、IL-17 的表达量与 IRAK1、TRAF6 的表达量呈负相关。这就进一步证实口腔扁平苔藓病变过程中 IRAK1、TRAF6 的低表达会影响 Th1/Th2 / Treg/Th17 细胞亚群的分化及相应细胞因子的生成, 进而参与疾病的发生和发展。

口腔扁平苔藓病灶内 TLR4 下游分子 IRAK1、TRAF6 呈低表达趋势; 低表达的 IRAK1、TRAF6 与 TLR4 信号通路活化减弱有关, 在此基础上能够影响 Th1/Th2 / Treg/Th17 细胞的分化并造成免疫应答紊乱。

## 参考文献

- Larsen KR, Johansen JD, Reibel J, et al. Oral symptoms and salivary findings in oral lichen planus, oral lichenoid lesions and stomatitis[J]. BMC Oral Health, 2017, 17(1):103.
- Rimkevičius A, Aleksejūnienė J, Pūrienė A, et al. Oral lichen planus: a 4-year clinical follow-up study [J]. Turk J Med Sci, 2017, 47(2): 514-522.
- Sagari S, Sanadhya S, Doddamani M, et al. Molecular markers in oral lichen planus: A systematic review [J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2016, 20(1): 115-121.
- Anderson JG, Peralta S, Kol A, et al. Clinical and Histopathologic Characterization of Canine Chronic Ulcerative Stomatitis [J]. Vet Pathol, 2017, 54(3): 511-519.
- Gambino A, Carbone M, Arduino PG, et al. Clinical features and histological description of tongue lesions in a large Northern Italian population [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2015, 20(5): 560-565.
- Sinon SH, Rich AM, Parachuru VP, et al. Downregulation of toll-like receptor-mediated signalling pathways in oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2016, 45(1): 28-34.
- Stanimirovic D, Zeljic K, Jankovic L, et al. TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 gene polymorphisms associated with oral lichen planus risk [J]. Eur J Oral Sci, 2013, 121(5):421-426.
- Firth FA, Friedlander LT, Parachuru VP, et al. Regulation of immune cells in oral lichen planus [J]. Arch Dermatol Res, 2015, 307(4): 333-339.
- Wang H, Zhang D, Han Q, et al. Role of distinct CD4(+) T helper subset in pathogenesis of oral lichen planus[J]. J Oral Pathol Med, 2016, 45(6): 385-393.
- Wang Y, Zhou J, Fu S, et al. A Study of Association Between Oral Lichen Planus and Immune Balance of Th1/Th2 Cells[J]. Inflammation, 2015, 38(5): 1874-1879.
- Javvadi LR, Parachuru VP, Milne TJ, et al. Regulatory T-cells and IL17A(+) cells infiltrate oral lichen planus lesions[J]. Pathology, 2016, 48(6): 564-573.
- Zhou L, Cao T, Wang Y, et al. Frequently Increased but Functionally Impaired CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Oral Lichen Planus [J]. Inflammation, 2016, 39(3): 1205-1215.
- Maehara T, Moriyama M, Kawano S, et al. Cytokine profiles contribute to understanding the pathogenic difference between Good syndrome and oral lichen planus: two case reports and literature review [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(14): e704.
- Malekzadeh H, Robati M, Yousefimanesh H, et al. Salivary Interferon Gamma and Interleukin-4 Levels in Patients Suffering from Oral Lichen Planus[J]. Cell J, 2015, 17(3):554-558.
- Liu WZ, He MJ, Long L, et al. Interferon- $\gamma$  and interleukin-4 detected in serum and saliva from patients with oral lichen planus[J]. Int J Oral Sci, 2014, 6(1): 22-26.
- Wang K, Miao T, Lu W, et al. Analysis of oral microbial community and Th17-associated cytokines in saliva of patients with oral lichen planus[J]. Microbiol Immunol, 2015, 59(3):105-113.
- Monteiro BV, Pereira Jdos S, Nonaka CF, et al. Immunoexpression of Th17-related cytokines in oral lichen planus[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015, 23(6):409-415.
- Zhou L, Cao T, Wang Y, et al. Frequently Increased but Functionally Impaired CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Oral Lichen Planus [J]. Inflammation, 2016, 39(3): 1205-1215.
- Al-Mohaya MA, Al-Harathi F, Arfin M, et al. TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  and IL-10 gene polymorphism and association with oral lichen planus risk in Saudi patients [J]. J Appl Oral Sci, 2015, 23(3):295-301.