

## 口腔扁平苔藓组织中 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与不典型增生的关系

朱丽芳<sup>1,2</sup>, 潘璐<sup>2</sup>, 郑阳玉<sup>2,3</sup>, 徐双波<sup>2,3</sup>, 刘来奎<sup>2,3\*</sup>, 徐艳<sup>2,4\*</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学附属第一医院口腔科, 江苏 苏州 215006; <sup>2</sup>江苏省口腔疾病研究重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>南京医科大学附属口腔医院基础教研室, <sup>4</sup>牙周科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨口腔扁平苔藓(OLP)中 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与 OLP 伴上皮不典型增生的相关性,为 OLP 的临床诊断和免疫治疗提供新的方向。方法:采用免疫组化半定量法检测 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞在 79 例 OLP 患者组织中的表达,取 10 例口腔正常黏膜组织作为对照,分析口腔扁平苔藓组织中 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与不典型增生的关系。结果:CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞在正常口腔黏膜组织中呈阴性表达,在 79 例 OLP 中均呈阳性表达。CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与患者性别、年龄、发生部位无明显统计学意义,但是与 OLP 伴上皮不典型增生密切相关,具有统计学意义( $P<0.001$ ,  $P=0.002$ ),CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润和 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润之间具有显著相关性( $r=0.498$ ,  $P<0.001$ )。结论:口腔扁平苔藓患者组织中 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与上皮不典型增生密切相关,影响 OLP 的发生发展。

**[关键词]** 口腔扁平苔藓;不典型增生;CD3<sup>+</sup>T 细胞;CD8<sup>+</sup>T 细胞

**[中图分类号]** R780.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)12-1663-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20171235

## Relationship between CD3<sup>+</sup> T cell and CD8<sup>+</sup> T cell infiltration and atypical hyperplasia in oral lichen planus

Zhu Lifang<sup>1,2</sup>, Pan Lu<sup>2</sup>, Zheng Yanyu<sup>2,3</sup>, Xu Shuangbo<sup>2,3</sup>, Liu Laikui<sup>2,3</sup>, Xu Yan<sup>2,4</sup>

(<sup>1</sup> Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006; <sup>2</sup> Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Nanjing 210029; <sup>3</sup> Department of Basic Science of Stomatology, <sup>4</sup> Department of Periodontology, Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the relationship between CD3<sup>+</sup>T cells and CD8<sup>+</sup> T cells infiltration and atypical hyperplasia in oral lichen planus (OLP), which will provide a new direction for the clinical diagnosis and immunotherapy of OLP. **Methods:** Immunohistochemical semi-quantitative method was used to detect the CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells infiltration in 79 cases of OLP patients, meanwhile 10 cases of normal oral mucosa as a control. The relationship between these T cell infiltration and atypical hyperplasia in OLP was analyzed by statistical methods. **Results:** CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells were negatively expressed in normal oral mucosa, but were positively expressed in 79 cases of OLP. The infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells had no relationship with gender, age or the location of OLP, but they were closely correlated with the atypical hyperplasia of OLP ( $P<0.001$  and  $P=0.002$ , respectively), the infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells were positively associated with the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells ( $r=0.498$ ,  $P<0.001$ ). **Conclusions:** The infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells is closely related to epithelial dysplasia, which affects the occurrence and development of OLP.

**[Key words]** oral lichen planus; atypical hyperplasia; CD3<sup>+</sup>T cells; CD8<sup>+</sup>T cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(12):1663-1667]

**[基金项目]** 江苏高校优势学科(2014-37);国家自然科学基金面上项目(81771074);江苏省自然科学基金面上项目(BK20171483);江苏省口腔疾病研究重点实验室开放课题基金(JSKLOD-KF-1702)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: my\_yunkong@njmu.edu.cn; yanxu@njmu.edu.cn

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是常见的口腔黏膜疾病,因其长期糜烂有恶变的现象,WHO 将其列为癌变状态<sup>[1]</sup>。研究认为,OLP 的发生发展与免疫因素密切相关,由 T 淋巴细胞介导的免疫反应是其发病的主要原因<sup>[2-3]</sup>,因此,进一步明确 T 淋巴细胞在 OLP 中的作用,以及研究其与 OLP 发生恶变的相关性,显得尤为重要。本研究将通过免疫组化半定量方法检测 CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 细胞在 OLP 中的表达,分析其与 OLP 临床病理特征及上皮不典型增生的关系,进一步探讨 T 淋巴细胞介导的免疫反应在 OLP 发生发展中的作用。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

回顾性选取 2012—2017 年南京医科大学附属口腔医院病理确诊的口腔扁平苔藓组织标本 79 例,其中男 34 例,女 45 例,年龄 17~84 岁,平均 52 岁。患者纳入标准:①符合 OLP 临床表现及经病理确诊的患者(诊断标准参考人民卫生出版社第四版教材《口腔黏膜病学》)<sup>[4]</sup>;②就诊前至少 1 个月未进行过针对 OLP 的局部或全身治疗。排除标准:①1 个月内局部或全身使用过激素、免疫抑制剂、抗生素等相关药物;②伴有高血压、糖尿病等全身系统性疾病;③ OLP 病损邻近处有不良修复体。本研究还收集了 10 例正常口腔黏膜组织,经 HE 染色,病理科医生确诊后入选作为对照。本研究经南京医科大学附属口腔医院伦理委员会审议批准,并获得所有研究对象的同意。

10%中性福尔马林,石蜡,兔抗 CD3,鼠抗 CD8 (1:200, Abcam, Cambridge, MA, 美国),柠檬酸盐抗原修复液,3%过氧化氢溶液,即用型山羊封闭血清,快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物(博士德,武汉),DAB 显色试剂盒(迈新,福州),二甲苯,0.5%伊红溶液,苏木素,中性树胶,PBS, PBST, 100%乙醇、75%乙醇各种分析纯试剂等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HE 染色

将石蜡组织切片(5 μm)放入烤箱烤 3 h,二甲苯 I、II (30 min)、梯度酒精脱蜡水化各 5 min,自来水轻冲洗 10s,苏木素染色 10 min,自来水中止冲洗 10 s,1%盐酸乙醇分化 1-3 s,自来水冲洗中止,碳酸锂返蓝 30 s,自来水冲洗 20 s。0.5%伊红溶液染色 3 min,梯度酒精各 3 min,二甲苯(I、II)透明 3~5 min,中性树胶封片,镜下观察结果。

#### 1.2.2 CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫组织化学染色

石蜡组织切片(5 μm)常规二甲苯、梯度酒精脱蜡水化,组织抗原修复,PBS 冲洗(3 min×3 次),用新鲜配制的 3%过氧化氢 50 μL 阻断内源性过氧化物酶活性,室温孵育 15 min, PBST 冲洗(3 min×3 次),山羊血清 37℃ 孵育 15 min,封闭非特异性抗原抗体反应,滴加一抗 CD3 和 CD8,每张切片约 50 μL,置 4℃ 冰箱过夜。次日复温 1 h, PBST 冲洗(3 min×3 次),滴加快捷型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物约 50 μL,37℃ 孵育 15 min, PBST 冲洗(3 min×3 次),加入新鲜配制的 DAB 显色剂,室温孵育 2~3 min,在显微镜下观察,用自来水冲洗中止染色,苏木素复染细胞核 5 min,自来水冲洗,1%盐酸酒精分化,碳酸锂返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察染色结果<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.3 免疫结果判定和评分

CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>T 细胞阳性表达均为黄褐色或棕褐色颗粒,在 OLP 病变典型区,随机选取 5 个高倍视野(400 倍)计数阳性细胞数,取平均值作为该样本表达阳性的最终结果。通过统计学方法计算高密度组和低密度组密度分界值,CD3<sup>+</sup>T 细胞分界值为 570/HP, CD8<sup>+</sup>T 细胞分界值为 327/HP。

### 1.3 统计学方法

免疫组化结果与临床病理特征的统计采用了卡方检验、Fisher's 确切概率法。相关性比较采用的是 Pearson 相关分析。以上资料均采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色

79 例 OLP 经 HE 染色,病理科医生确诊选入本研究,63 例为单纯的 OLP,上皮不全角化或过角化,固有层大量淋巴细胞浸润,16 例为 OLP 伴上皮不典型增生,轻度占 7 例,中度 4 例,重度 5 例(图 1)。上皮不典型增生诊断标准参考卫生部规划教材 7 版《口腔组织病理学》<sup>[6]</sup>。

### 2.2 CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润与 OLP 临床病理特征的关系

与正常口腔黏膜组织相比(图 2),CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞在 OLP 中明显呈阳性表达,主要聚集在固有层,围绕上皮基底膜呈带状分布(图 3)。阴性对照以 PBS 液代替一抗作为对照(图 4)。对 79 例 OLP 患者进行统计发现,CD3<sup>+</sup>T 细胞低密度浸润为 74 例(94%),高密度浸润为 5 例(6%),CD3<sup>+</sup>T 细胞

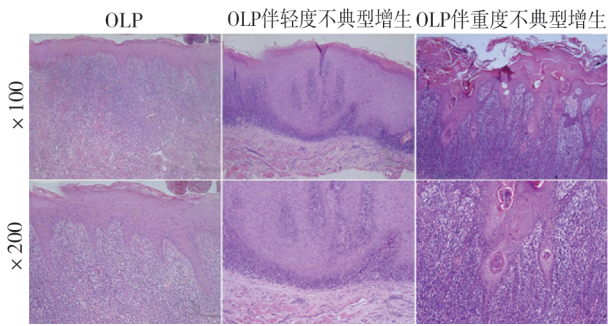


图 1 OLP 及 OLP 伴上皮不典型增生

Figure 1 OLP and OLP with epithelial dysplasia

浸润与患者性别,年龄,部位无明显统计学意义,但是与患者发生 OLP 及 OLP 伴上皮不典型增生密切相关,具有显著的统计学意义( $P < 0.001$ ,表 1)。CD8<sup>+</sup>T 细胞低密度浸润为 65 例(82%),高密度浸润为 14 例(18%),同 CD3<sup>+</sup>T 细胞一样,CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与

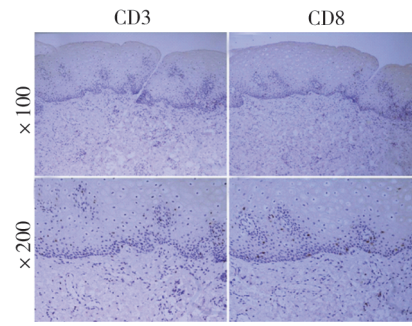


图 2 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞在口腔正常黏膜组织中的表达

Figure 2 The expression of CD3<sup>+</sup>T cells and CD8<sup>+</sup>T cells in normal oral mucosa

患者性别,年龄,部位无明显统计学意义,但是与患者发生 OLP 及 OLP 伴上皮不典型增生显著相关,具有统计学意义( $P = 0.002$ ,表 1)。

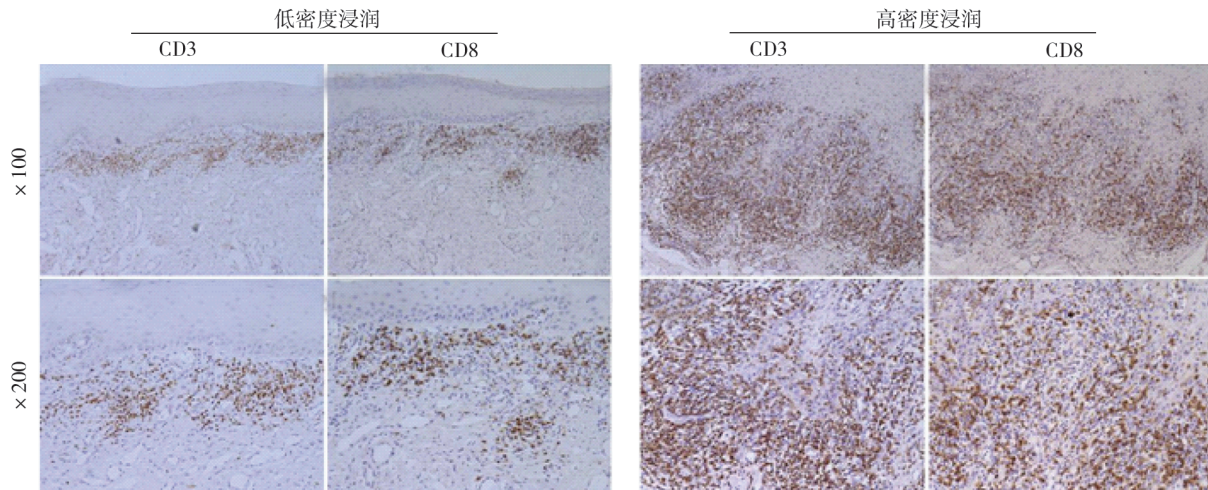


图 3 CD3<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞在 OLP 中的浸润

Figure 3 The expression of CD3<sup>+</sup>T cells and CD8<sup>+</sup>T cells in OLP

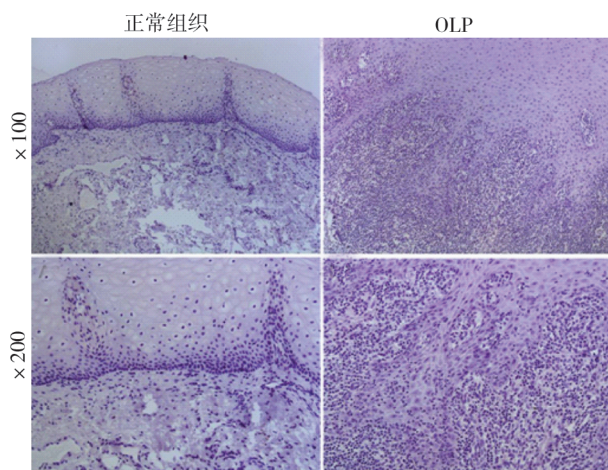


图 4 正常口腔黏膜组织和口腔扁平苔藓组织的阴性对照

Figure 4 The negative control of normal oral mucosa and OLP

### 2.3 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与 OLP 伴上皮不典型增生的关系

根据以上研究结果,进一步探讨了 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润在 OLP 发生上皮不典型增生中的作用(图 5),经统计学分析发现,CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与 OLP 发生上皮不典型增生密切相关,具有统计学意义( $P = 0.000$ , $P = 0.021$ ,表 2)。并且,CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润和 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润之间具有显著相关性( $r = 0.498$ , $P = 0.000$ )。表明 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润明显影响 OLP 患者发生上皮不典型增生。

### 3 讨论

口腔扁平苔藓典型的病理特征是上皮下可见淋巴细胞浸润带,浸润的细胞以 T 淋巴细胞为主,T 淋

表 1 CD3<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润与 OLP 临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between the infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells and OLP clinical variables

临床参数	患者数	CD3 <sup>+</sup> T 细胞 (570/HPF)		CD8 <sup>+</sup> T 细胞 (327/HPF)	
		高密度	低密度	高密度	低密度
性别					
男	34	1	33	5	29
女	45	4	41	9	36
年龄(岁)					
≤65	66	3	63	10	56
>65	13	2	11	4	9
部位					
颊部	47	2	45	8	39
舌背	12	2	10	1	11
舌缘	12	1	11	4	8
其他	8	0	8	1	7
病理诊断*					
OLP	63	0	63	7	56
OLP 伴不典型增生	16	5	11	7	9

\*:CD3<sup>+</sup>T 细胞,  $P < 0.001$ ; CD8<sup>+</sup>T 细胞,  $P = 0.002$ 。

巴细胞通过分泌多种细胞因子,介导上皮基底细胞的破坏及慢性炎症的长期存在,免疫反应的失衡及长期炎症的刺激又是造成 OLP 癌变的重要原因<sup>[7]</sup>。因此,进一步研究 T 细胞浸润与 OLP 临床病理特征及上皮不典型增生的关系显得尤为重要。

以往研究认为,OLP 中浸润的炎症细胞主要以 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞为主,对 CD3<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞在

表 2 CD3<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润与 OLP 伴上皮不典型增生的关系

Table 2 Relationship between the infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells and OLP with epithelial atypical hyperplasia

不典型增生	患者数	CD3 <sup>+</sup> 细胞(570/HPF)*		CD8 <sup>+</sup> 细胞(327/HPF)*	
		高密度	低密度	低密度	高密度
正常	63	0	63	7	56
轻度	7	1	6	4	3
中度	4	1	3	2	2
重度	5	3	2	1	4

\*: $P < 0.001$ ; #:  $P = 0.021$ 。

OLP 中的浸润及其与 OLP 发生上皮不典型增生的关系研究较少。CD3<sup>+</sup> T 细胞通常代表总的 T 细胞,CD3 与 TCR 形成 TCR-CD3 复合体分子,将抗原递呈到细胞内<sup>[8]</sup>。在本研究中,CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润与 OLP 患者性别,年龄及发生部位无明显统计学意义,但是与患者发生 OLP 及 OLP 伴上皮不典型增生密切相关。为了进一步研究 CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润对 OLP 发生上皮不典型增生的影响,统计了 CD3<sup>+</sup>T 细胞浸润与 OLP 伴上皮不典型增生程度的关系,发现 5 例 CD3<sup>+</sup> T 细胞高密度浸润全部与 OLP 发生不典型增生相关,其中重度为 3 例(60%),表明 CD3<sup>+</sup> T 细胞高密度浸润严重影响 OLP 伴发上皮不典型增生,是 OLP 发生恶变的重要预测指标,这一结果与 Annelies 等<sup>[9]</sup>对 CD3 在结肠癌中的研究相一致,即 CD3<sup>+</sup> T 细胞的持续浸润将影响结肠癌的预后,CD3<sup>+</sup>T 细胞可作为肿瘤免疫治疗的重要标记物<sup>[10]</sup>。在本研究中,虽然并未探讨 CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润与 OLP 发生癌变的相关

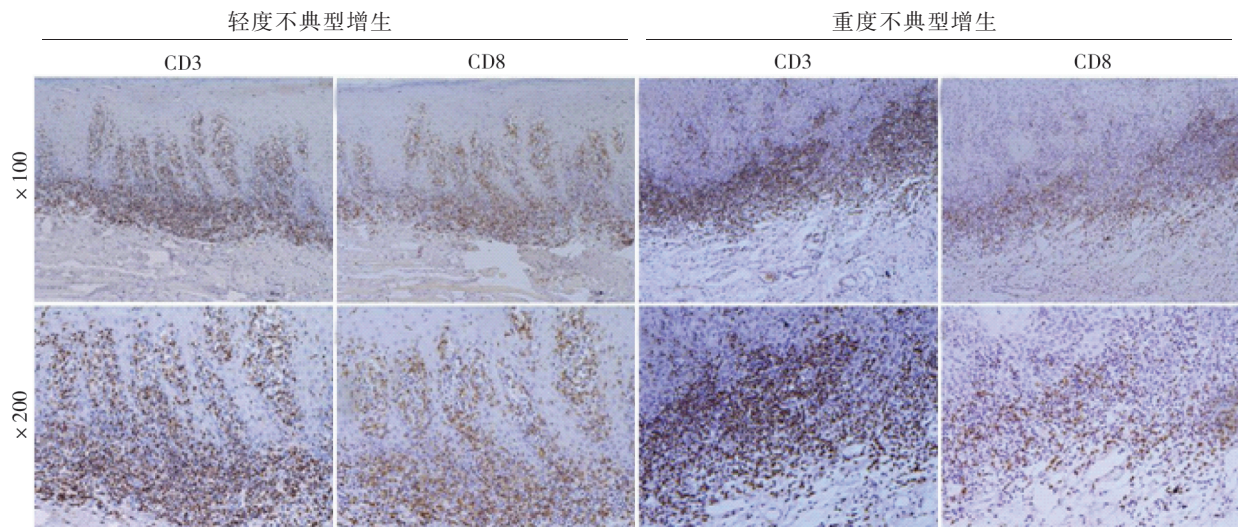


图 5 CD3<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润伴上皮不典型增生

Figure 5 The infiltration of CD3<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells in OLP with epithelial atypical hyperplasia

性,但是 CD3<sup>+</sup> T 细胞浸润与 OLP 发生上皮不典型增生密切相关,也为临床治疗 OLP 及 OLP 伴发不典型增生患者提供了重要的实验依据,具有重要的临床意义。

在本研究中,还分析了 CD8<sup>+</sup> T 细胞与 OLP 及 OLP 伴上皮不典型增生的关系,与 CD3<sup>+</sup> T 细胞一样,CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润不仅与 OLP 病理诊断显著相关,同时还与 OLP 伴发的上皮不典型增生程度密切相关,具有统计学意义。这一结果提示,CD8<sup>+</sup> T 细胞作为 OLP 发生发展过程中重要的 T 细胞毒性细胞<sup>[11]</sup>,在 OLP 的进展中同样发挥着重要作用,CD8<sup>+</sup> T 细胞联合 CD3<sup>+</sup>T 细胞有望成为 OLP 免疫治疗过程中的新方向<sup>[12]</sup>。

OLP 是以免疫介导为主的慢性炎症疾病,当患者长期处于糜烂时又有癌变的风险,OLP 是否发生上皮不典型增生直接影响临床治疗的选择,需要引起高度重视。在本研究中,探讨了口腔扁平苔藓患者组织中 CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与上皮不典型增生的关系,发现两者的浸润均严重影响 OLP 的发生发展,CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润不仅影响 OLP 的发生,同时还影响 OLP 患者伴发上皮不典型增生,是 OLP 发展为癌前状态的重要因素,这一发现将为 OLP 的临床诊断和免疫治疗提供新的思路和方向。

[参考文献]

[1] Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases[J]. *Med Oral*, 2003, 8(1): 2-9

[2] Marshall A, Celentano A, Cirillo N, et al. Immune receptors CD40 and CD86 in oral keratinocytes and implications for oral lichen planus[J]. *J Oral Sci*, 2017, 59(3): 373-382

[3] Rimkevicius A, Aleksejūniene J, Pūriene A, et al. Oral

lichen planus: a 4-year clinical follow-up study[J]. *Turk J Med Sci*, 2017, 47(2): 514-522

[4] 陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 105-106

[5] Hu Y, He MY, Zhu LF, et al. Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 12

[6] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 230-231

[7] 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

[8] Negera E, Walker SL, Bobosha K, et al. T-cell regulation in erythema nodosum leprosum[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017, 11(10): e0006001

[9] Turksma AW, Coupé VM, Shamier MC, et al. Extent and location of tumor-infiltrating lymphocytes in microsatellite-stable colon cancer predict outcome to adjuvant active specific immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(2): 346-356

[10] Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours[J]. *J Pathol*, 2014, 232(2): 199-209

[11] Ke Y, Dang E, Shen S, et al. Semaphorin4D drives CD8 (+) T-cell lesional Trafficking in oral lichen planus via CXCL9/CXCL10 upregulations in oral keratinocytes[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(11): 2396-2406

[12] Anitei MG, Zeitoun G, Mlecnik B, et al. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(7): 1891-1899

[收稿日期] 2017-07-19