doi：10. 12289/j. issn. 1008-0392. 21048

· 基础研究 ·

产黑普氏菌破坏上皮屏障紧密连接在口腔扁平苔藓发病机制中的作用

谭正午，徐　盼，郭艺婷，何　园
（同济大学口腔医学院·同济大学附属口腔医院口腔黏膜病教研室，上海牙组织修复与再生工程技术研究中心，上海　200072）

【**摘要**】**目的**　探索产黑普氏菌（*Prevotella melaninogenica*，*Pm*）侵入口腔扁平苔藓（oral lichen planus，OLP）病损组织的可能机制。**方法**　收集 OLP 患者病损组织和正常黏膜组织，应用免疫组织化学染色检测闭锁小带蛋白-1（zonula occludin-1，ZO-1）和连接黏附分子-1（junctional adhesion molecule-1，JAM-1）的表达。将 *Pm* 与人口腔角质形成细胞（human oral keratinocytes，HOK）共培养，通过 Transwell 小室实验检测荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖 4KD（FITC-dextran 4KD，FD4）的渗透量，观察 *Pm* 对 HOK 上皮屏障功能的影响，并采用 qPCR 检测 ZO-1 和 JAM-1 的表达改变。**结果**　OLP 患者病损组织中 ZO-1、JAM-1 的表达显著低于正常组织（$P<0.01$，$P<0.0001$）。FD4 的渗透量随 *Pm* 浓度增加而增加（$P<0.05$）。*Pm* 与 HOK 细胞共培养后，ZO-1、JAM-1 表达均显著减少（$P<0.005$；$P<0.05$），并随着 *Pm* 浓度增加或时间延长而降低。**结论**　*Pm* 可能通过抑制紧密连接蛋白 ZO-1、JAM-1 的表达而破坏 OLP 上皮组织屏障，从而侵入上皮组织导致慢性炎症，在口腔扁平苔藓发生发展中起到重要作用。

【**关键词**】口腔扁平苔藓；产黑普氏菌；紧密连接蛋白；上皮屏障功能
【**中图分类号**】R781.5+9　【**文献标志码**】A　【**文章编号**】1008-0392(2021)04-0459-08

Prevotella melaninogenica impairs oral epithelial barrier through inhibiting tight junction proteins as mechanism of pathogenesis of oral lichen planus

TAN Zheng-wu, *XU Pan*, *GUO Yi-ting*, *HE Yuan*
(Dept. of Oral Medicine, School & Hospital of Stomatology, Tongji University, Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China)

【**Abstract**】**Objective**　To explore the mechanism of *Prevotella melaninogenica* (*Pm*) in pathogenesis of oral lichen planus (OLP). **Methods**　The expression of tight junction proteins zonula occludin-1 (ZO-1) and junctional adhesion molecule-1 (JAM-1) in OLP and normal mucosal samples was detected by immunocytochemistry (IHC). *Pm* and human oral keratinocytes (HOK) cells were co-cultured, the permeability of HOC cells was detected with Transwell assay using FITC-dextran 4KD (FD4) as an indicator; the mRNA expression of ZO-1 and JAM-1 was detected by qRT-PCR. **Results**　The expression of ZO-1 and JAM-1 in OLP samples was significantly lower than that in the normal tissue ($P<0.01$, $P<0.0001$). After co-culture of HOC cells with *Pm*, the permeability of FD4 was significantly increased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$); and the expression of ZO-1 and JAM-1 mRNA was significantly decreased in a concentration-and time-dependent manner ($P<0.005$; $P<0.05$). **Conclusion**　*Pm* can disrupt OLP epithelial barrier by inhibiting the expression of

收稿日期：2021-02-15
基金项目：国家自然科学基金（81870764）
作者简介：谭正午（1996—），男，硕士. E-mail：534040825@qq.com
通信作者：何　园. E-mail：drheyuan@tongji.edu.cn

tight junction proteins ZO-1 and JAM-1, leading to chronic inflammation, which may be the mechanism of OLP pathogenesis.

【**Key words**】oral lichen planus; *Prevotella melaninogenica*; tight junction protein; epithelial barrier function

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)是一种由 T 淋巴细胞介导的慢性炎症性疾病,成年人发病率为 0.5%~2%[1-2],部分病损组织具有恶化癌变的倾向,至今 OLP 发病机制仍不明确。目前认为 OLP 是由多种因素引起,包括遗传因素,精神压力,创伤以及感染[3]。由于 T 细胞在 OLP 组织固有层的带状浸润,推测可能存在未知抗原被抗原呈递细胞识别,从而招募 T 细胞的聚集[4],对口腔黏膜上皮角质形成细胞产生慢性免疫性破坏。

近年来,越来越多的研究提示微生物可能在 OLP 发病中有重要作用。本课题组研究发现 OLP 患者颊黏膜表面微生物群落多样性增加,其菌落结构和健康对照组相比发生显著改变[5]。此外多个不同研究者的研究也发现 OLP 病损黏膜表面及唾液中存在菌群结构的改变[6-9],与本课题组研究结果一致。并且通过高通量测序分析发现,产黑普氏菌(*Prevotella melaninogenica*, *Pm*)在 OLP 颊黏膜表面构成比显著增加,且在目、科、属、种各层次上的差异均有统计学意义($P<0.05$)[10],并且在 OLP 组织的上皮层和固有层均检测到产黑普氏菌的存在,提示产黑普氏菌可能在 OLP 的发生发展中起到重要作用[11]。

口腔上皮组织是机体与外界环境之间的屏障,口腔角质形成细胞则形成了抵御细菌攻击的第一道防线[12]。细胞与细胞之间存在着多种连接方式,包括紧密连接、黏附连接以及间隙连接。其中紧密连接主要负责离子、溶质和水、细胞旁运输以及上皮屏障完整性。紧密连接蛋白主要包括咬合蛋白 Occludin、闭合蛋白 Claudins、闭锁小带蛋白 ZOs 以及连接黏附分子 JAMs[13]。紧密连接的破坏会引起紧密连接蛋白表达紊乱,导致细胞旁通透性的增加,促进细菌及其毒性物质进入组织内部,上皮屏障功能则进一步受到损害[14]。为了明确产黑普氏菌入侵 OLP 组织的可能机制,本研究主要探索 *Pm* 对口腔上皮细胞紧密连接的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2017 年 4 月—2020 年 6 月于同济大学附属口腔医院就诊的口腔扁平苔藓患者共 12 例,所有患者均经临床检查及病理学活检证实,见表 1。排除标准:(1) 患有全身系统性疾病及肿瘤;(2) 涎腺疾病;(3) 近 6 个月使用皮质激素、免疫调节剂等药物治疗;近 1 个月使用抗生素;(4) 女性处于月经期、妊娠期或哺乳期;(5) 药物或银汞合金充填物可能引起苔藓样反应者;(6) 患有除口腔扁平苔藓外其他黏膜病;正常对照组 12 例为拔牙或外科小手术患者,年龄、性别与实验组相匹配。所有 OLP 患者及对照组均签署知情同意书,本项目实验计划得到同济大学科学与伦理委员会审核与批准(伦理批准号:No. 2018-002)。

表 1 研究对象基本信息

Tab. 1 Basic information of the research subjects

项目	正常对照组(n=12)	OLP 组(n=12)	P
男/女	5/7	3/9	0.386 5*
年龄/岁	21~62 (37.6±14.6)	27~65 (46.5±12)	0.131 8#
非糜烂型/糜烂型	—	8/4	
OLP 患病部位			
颊	—	5	
舌	—	2	
颊、龈	—	2	
颊、龈、舌	—	1	
颊、龈、前庭沟	—	2	

* 检验方法为 Fisher 确切概率法,# 检验方法为 t 检验

1.2 细胞与细菌准备以及 *Pm* 菌种鉴定

人口腔角质形成细胞系 HOK 由浙江大学附属口腔医院陈谦明教授惠赠,该细胞培养于含 5%胎牛血清和 1%青链霉素的高糖 DMEM 培养基。放置在 5% CO_2、37 ℃孵箱内培养。

产黑普氏菌 *Pm* ATCC25845 和唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*, *Ss*)M18 均购自美国模式培养物集存库。*Pm* 在含 5 μg/mL 的氯化血红素、0.5 μg/mL 的维生素 K 的厌氧基础培养基和血平板中 37 ℃厌氧培育。唾液链球菌 *Ss* 在脑心浸液(brain heart infusion, BHI)液体培养基和 BHI 琼脂平板中 37 ℃培育。

Pm 或 *Ss* 在血平板中长成数个单菌落后,肉眼观察其形态。革兰染色:挑取 *Pm* 或 *Ss* 单菌落至载玻片上的无菌水滴,将单菌落涂成均匀的圆形菌膜,

使用革兰染色试剂盒分别进行染色，油镜下观察。PCR 鉴定：挑取 *Pm* 或 *Ss* 单菌落，根据 PCR 试剂盒进行 PCR 反应。*Pm* 上游引物：5'-TCTTGATAGCTCAGTTTCTTCAATC-3'；下游引物：5'-GCCTCAATCTCTGAGTGGCT-3'。PCR 产物大小为 114 bp。*Ss* 上游引物：5'-GTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG-3'；下游引物：5'-CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT-3'。PCR 产物大小为 542 bp。将 *Pm* 或 *Ss* 的 PCR 产物进行凝胶电泳，数字凝胶成像分析系统拍照。并将 PCR 产物进行测序。

1.3 主要试剂

革兰染色液试剂盒购自青岛海博生物技术有限公司；免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司；Anti-ZO-1 抗体、Anti-JAM-1 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。FITC-dextran 4KD（FD4）购自德国 Sigma-Aldrich 公司。PCR 试剂盒、TRIzol 试剂、PrimerScript-RT 试剂盒和 qPCR 试剂盒均购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.4 方法

1.4.1 免疫组织化学染色　将标本应用4%的多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片、脱蜡、水化、流水冲洗以及抗原修复。根据迈新免疫组化试剂盒说明进行内源性过氧化物酶阻断，加非特异性染色阻断剂，一抗 ZO-1 或 JAM-1 4 ℃过夜孵育。加生物素标记的 IgG 聚合物、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶。DAB 显色液显色，苏木精复染，封片，显微镜下观察，拍照，Image Pro Plus 软件半定量分析。

1.4.2 细菌与细胞共培养　将在液体培养基中生长到 OD_{600} 值为 1 的 *Pm* 或 *Ss*，吸取 2 mL 的菌液至离心管离心（离心半径 8.27 cm，3 000 r/min，5 min），离心后去上清液，用 PBS 清洗 2~3 次后，离心后去上清液，用 2 mL 不含血清和青-链霉素的高糖 DMEM 重悬，即 2 mL 含 *Pm* 或 *Ss* 的 DMEM，室温放置备用。将培养的 12 孔 HOK 细胞去除培养基，PBS 清洗，去除 PBS，加入 DMEM 培养基。从含 *Pm* 的 DMEM 中分别吸取 0、1、10、50 μL 感染细胞 24 h，或均吸取 50 μL 感染细胞 0、4、10、24 h。感染细胞放置在含 5%CO_2 的 37 ℃孵箱内培养。

1.4.3 上皮渗透性分析　HOK 细胞接种于 Transwell 上室。当细胞长满，从含 *Pm* 或 *Ss* 的 DMEM 中分别吸取 0、1、2、5、10 μL 加至 Transwell 上室中感染 HOK 细胞 4 h。去除上室培养基，加入新的培养基，并在每孔上室加入 10 μL 10 mg/mL 的 FD4。1 h 后应用多功能酶标仪检测下室中 FD4 的荧光信号强度。设置激发波长、发射波长分别为 485、528 nm。

1.4.4 总 RNA 提取与反转录　根据氯仿法提取细胞总 RNA，将感染后的细胞培养皿取出后去除培养基，PBS 清洗 3 次后并去除，每孔加入 TRIzol 250 μL，用细胞刮刮取贴壁细胞后收集至 RNase-free 的离心管内，每管 50 μL 氯仿，剧烈振荡 15 s，冰上放置 10 min，4 ℃离心（离心半径 8.27 cm，12 000 r/min，15 min），吸上层水相转移至另一离心管内，加入等体积异丙醇，彻底混匀，冰上放置 15 min 后，4 ℃离心（离心半径 8.27 cm，12 000 r/min，10 min），弃上清液，75%乙醇清洗沉淀，4 ℃离心（离心半径 8.27 cm，7 500 r/min，5 min），弃上清液，DEPC 水溶解沉淀。根据反转录试剂盒说明书反转 RNA 为 cDNA，调整终浓度为 25 ng/μL。

1.4.5 实时荧光定量 PCR　检测 *Pm* 与 HOK 细胞共培养后，紧密连接基因 ZO-1、JAM-1、Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 的表达变化。引物序列见表 2。引物设计由苏州金唯智生物科技有限公司定制。根据 qPCR 试剂盒说明书配制反应体系。qPCR 仪扩增反应程序：94 ℃ 30 s；94 ℃ 5 s，61 ℃ 30 s，40 个循环，分析相关基因的相对表达情况。

表 2　实时荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 2　The primers in RT-qPCR

引物	序列（5'→3'）
ZO-1-F	GTGCTGGCTTGGTCTGTTTG
ZO-1-R	TGACGCTGGGTGATAGGGAT
JAM-1-F	CCTAGTGCCCGAAGTGAAGG
JAM-1-R	CGGTAGCACCTGAGTAAGGC
Occludin-F	GGTCTAGGACGCAGCAGATT
Occludin-R	GCCTGGATGACATGGCTGAT
Claudin-2-F	TCCTTTATCACCTCAGCCCGT
Claudin-2-R	GAAGACAGGGCAGTTCTTTGC
Claudin-3-F	TCGGCCAACACCATTATCCG
Claudin-3-R	CCGTGTACTTCTTCTCGCGT
Claudin-4-F	TCTCCTCTGTTCCGGGTAGG
Claudin-4-R	TCCCCTCTAAACCCGTCCAT
GAPDH-F	GGACCTGACCTGCCGTCTAG
GAPDH-R	GTAGCCCAGGATGCCCTTGA

1.5 统计学处理

采用 Prism Graphpad 7.0 进行数据统计和图表制作，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，免疫组化蛋白量化、FD4 吸光度和 mRNA 表达组间比较均采用 t 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结　　果

2.1 产黑普氏菌 *Pm* 菌种鉴定结果

将 *Pm* 分别进行肉眼观察,革兰染色以及 PCR 鉴定。革兰染色可见 *Pm* 被染成红色,证明其为革兰阴性菌。PCR 电泳图显示 1 号和 2 号泳道可见约 114 bp 的单一特异性电泳条带,NTC 阴性对照未见电泳条带。将 PCR 产物测序并与 NCBI 核酸序列数据库进行比对,产物序列与 *Pm* 的一段基因序列覆盖率为 99%,一致度为 100%,见图 1。

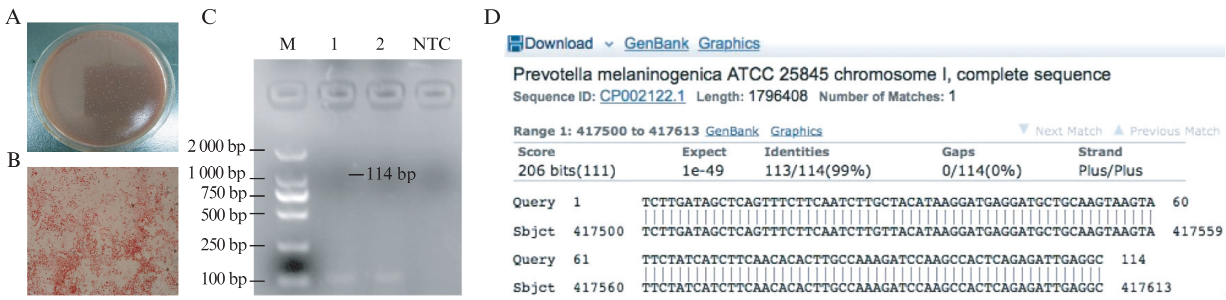

图 1　产黑普氏菌 *Pm* 菌种鉴定

Fig. 1　Identification of Prevotella melaninogenica strains

A: *Pm* 在血平板的菌落形态;B: 1 000 倍油镜下 *Pm* 的革兰染色;C: 菌落 PCR 电泳图,1、2: *Pm*,M: DL2 000 DNA 标记,NTC: 阴性对照;D: 序列碱基配对具体情况

2.2 唾液链球菌 *Ss* 菌种鉴定结果

将 *Ss* 分别进行肉眼观察,革兰染色以及 PCR 鉴定。革兰染色可见 *Ss* 被染成蓝色,证明其为革兰阳性菌。PCR 电泳图显示 1 号和 2 号泳道可见约 542 bp 的单一特异性电泳条带,NTC 阴性对照未见电泳条带。将 PCR 产物测序并与 NCBI 核酸序列数据库进行比对,产物序列与 *Ss* 的一段基因序列覆盖率和一致度均为 100%,碱基完全配对,见图 2。

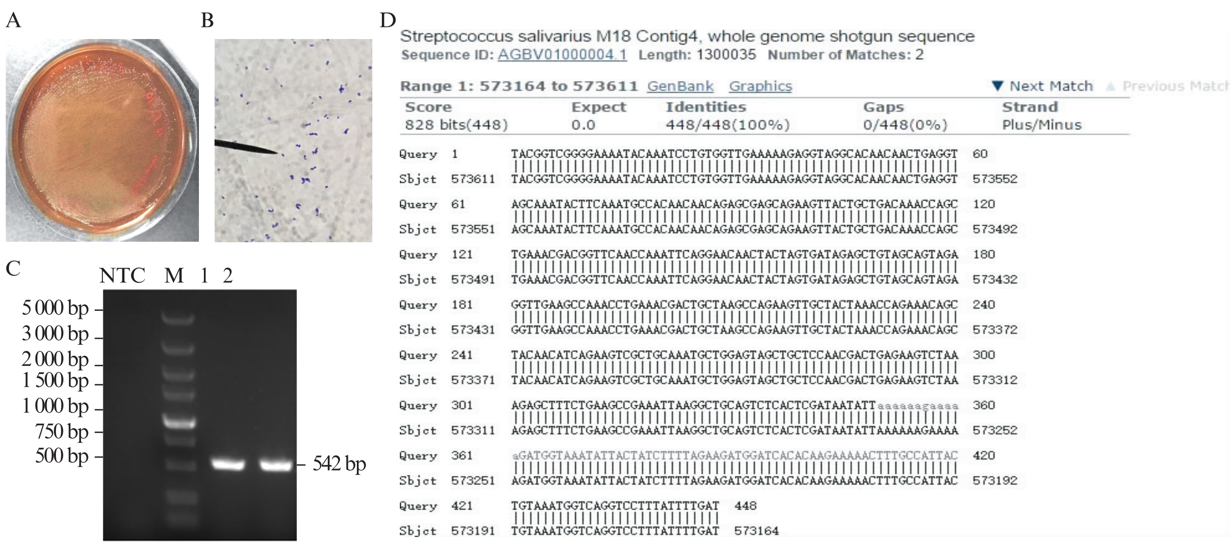

图 2　唾液链球菌 *Ss* 菌种鉴定

Fig. 2　Identification of *Streptococcus salivarius* strains

A: *Ss* 在 BHI 琼脂平板的菌落形态;B: 1 000 倍油镜下 *Ss* 的革兰染色;C: 菌落 PCR 电泳图,1、2: *Ss*,M: DL5 000 DNA 标记,NTC: 阴性对照;D: 序列碱基配对具体情况

2.3 上皮连接蛋白 ZO-1,JAM-1 在 OLP 组织和正常组织中的表达情况

为了检测 OLP 病损组织的上皮屏障功能是否存在变化,通过免疫组化染色观察上皮连接蛋白 ZO-1,JAM-1 在组织中的表达。ZO-1 在正常组织中主要在上皮角化层、颗粒层和基底层细胞的胞膜和胞质中表达,见图 3A。OLP 组织上皮层中 ZO-1 的表达明显低于正常组织($P<0.05$),见图 3B、图 4A。JAM-1 在正常组织中上皮颗粒层和棘层细胞的胞膜和胞质中呈强阳性表达,见图 3C。OLP 组织上皮层中 JAM-1 的表达显著低于正常组织($P<0.0001$),见图 3D、图 4B。

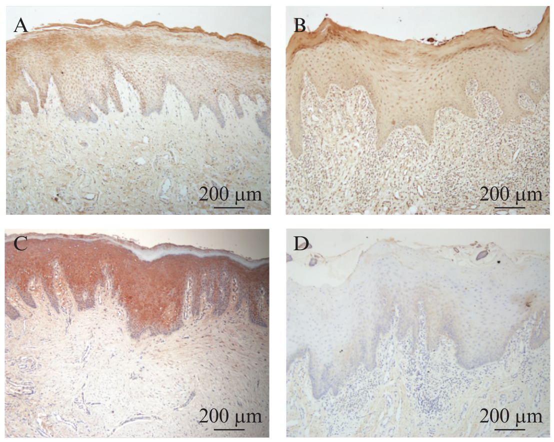

图 3　ZO-1 和 JAM-1 在正常组织和 OLP 组织中的表达情况

Fig. 3　Expression of ZO-1 and JAM-1 in normal and OLP tissue

A：正常组织 ZO-1 表达（×100）；B：OLP 组织 ZO-1 表达（×100）；C：正常组织 JAM-1 表达（×100）；D：OLP 组织 JAM-1 表达（×100）

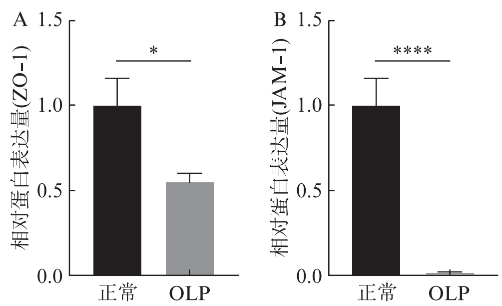

图 4　正常组织和 OLP 组织中 ZO-1 和 JAM-1 蛋白半定量表达比较

Fig. 4　Comparison of semi-quantitative expression of ZO-1 and JAM-1 in normal tissue and OLP tissue

A：ZO-1 在正常组织和 OLP 组织中的相对表达量；B：JAM-1 在正常组织和 OLP 组织中的相对表达量，$^{*}P<0.05$；$^{****}P<0.0001$

2.4　*Pm* 对 HOK 细胞屏障功能的影响

为了明确 *Pm* 对 HOK 上皮细胞屏障功能的影响，应用不同浓度的 *Pm* 与 HOK 在上室共培养后 4 h 后，在上室加入荧光素 FD4，1 h 后检测从上室中渗透至下室的 FD4 的吸光度。吸光度值越高，提示上皮细胞屏障受损越严重。*Pm*（1、2、5、10 μL）各组与对照组 *Pm*（0 μL）相比，下室中 FD4 的吸光度均明显增强，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 5A。以 *Ss* 为对照菌与 HOK 细胞共培养。*Ss*（1、2、5、10 μL）各组与对照组 *Ss*（0 μL）相比，下室中 FD4 的吸光度差异均无统计学意义（$P>0.05$），见图 5B。

2.5　不同浓度 *Pm* 刺激 HOK 细胞后紧密连接蛋白 mRNA 的表达变化

将不同浓度的 *Pm* 与 HOK 细胞共培养，应用 RT-qPCR 检测 HOK 细胞 ZO-1、JAM-1、Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 的含量变化情况。*Pm*（1、10、50 μL）刺激 HOK 细胞 24 h 后 ZO-1 的表达均显著减少（$P<0.001$）；JAM-1 在 *Pm*（50 μL）的刺激下表达显著减少（$P<0.05$）。而 Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 在不同浓度 *Pm* 刺激下无明显变化（$P>0.05$）。见图 6。

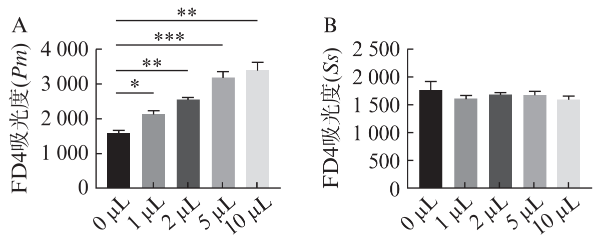

图 5　*Pm* 和 *Ss* 对 HOK 细胞屏障功能的影响

Fig. 5　Effects of *Pm* and *Ss* on barrier function of HOK cells

A：从含 *Pm* 的 DMEM 中分别吸取 0、1、2、5、10 μL 刺激 HOK 细胞后，下室 FD4 吸光度的强度变化；B：从含 *Ss* 的 DMEM 中分别吸取 0、1、2、5、10 μL 刺激 HOK 细胞后，下室 FD4 吸光度的强度变化；$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$

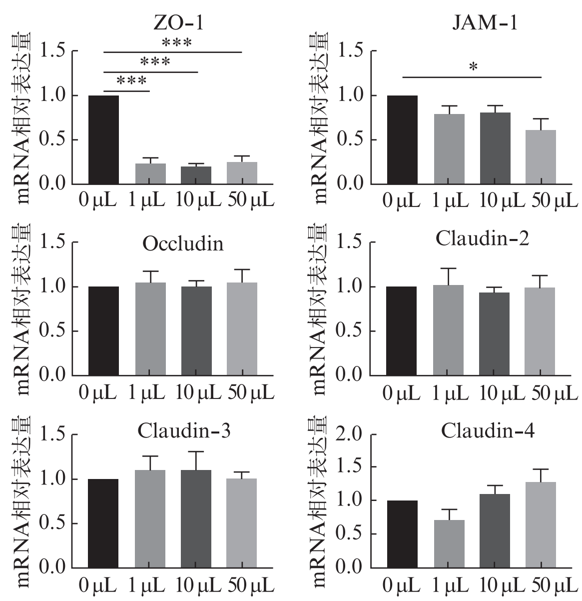

图 6　不同浓度 *Pm* 对 HOK 细胞紧密连接蛋白 mRNA 表达的影响

Fig. 6　Effects of different concentrations of *Pm* on the expression of tight junction proteins mRNA in HOK cells

从含 *Pm* 的 DMEM 中分别吸取 0、1、5、50 μL 与 HOK 细胞共培养 24 h 后 ZO-1、JAM-1、Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 的表达情况；$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$；$^{***}P<0.001$

2.6　相同浓度 *Pm* 刺激 HOK 细胞不同时间下紧密连接蛋白 mRNA 的表达变化

将相同浓度的 *Pm* 与 HOK 细胞共培养不同时间，应用 RT-qPCR 检测 HOK 细胞 ZO-1、JAM-1、Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 的 mRNA 表达变化情况。在 50 μL *Pm* 刺激 HOK 细胞 0、4、

10、24 h 的情况下,ZO-1 的表达在 4、10、24 h 均显著减少($P<0.01$);JAM-1 的表达在 4、10、24 h 同样明显减少($P<0.05$)。而 Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 在 *Pm* 刺激不同时间的情况下无明显变化($P>0.05$)。见图 7。

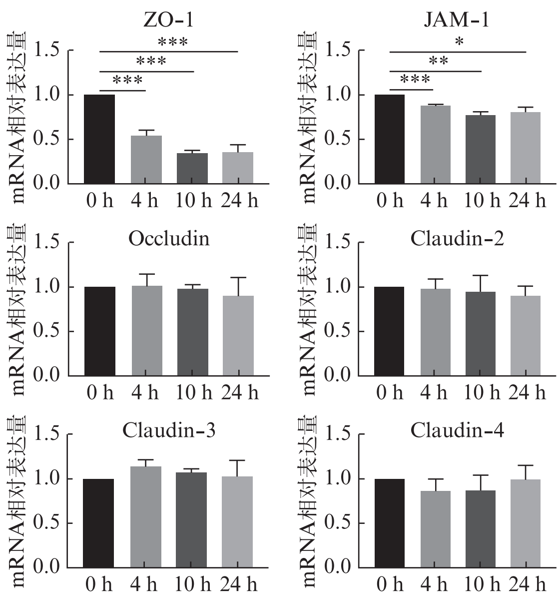

图 7　相同浓度 *Pm* 在不同时间对 HOK 细胞紧密连接蛋白 mRNA 表达的影响

Fig. 7　Effects of the same concentration of *Pm* on the expression of tight junction proteins mRNA in HOK cells for different duration

从含 *Pm* 的 DMEM 中均吸取 50 μL 与 HOK 细胞共培养 0、4、10、24 h 后 ZO-1、JAM-1、Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 的表达情况;$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$;$^{***}P<0.001$

3　讨　　论

口腔中存在 700 多种细菌,这些细菌定植于龈沟、口腔黏膜以及牙齿表面。口腔黏膜上皮主要组成细胞为口腔上皮角质形成细胞。口腔上皮细胞时刻抵御微生物的入侵,维持黏膜组织的完整和健康。OLP 组织的病理表现包括上皮萎缩、角化过度以及基底细胞液化变性,这些均提示 OLP 上皮屏障遭到破坏[15]。有研究证实 OLP 组织上皮层和固有层均存在细菌的入侵,并且固有层的细菌与浸润的 $CD3^{+}$、$CD4^{+}$、$CD8^{+}$ 细胞呈正相关[16]。细菌及其产物可能作为一种外界抗原被基底角化细胞和抗原提呈细胞识别并激活自身,招募和诱导 T 淋巴细胞在固有层的浸润[17]。

本课题组前期通过高通量测序检测 OLP 颊黏膜病损表面菌群,发现 *Pm* 在 OLP 颊黏膜表面构成比显著增加,且在目、科、属、种各层次上的差异均有统计学意义[5]。OLP 病损组织中 *Pm* 含量也显著高于正常组织,且 *Pm* 与 IL-6 的表达呈正相关[10]。并通过荧光原位杂交实验(fluorescence in situ hybridization, FISH)发现在 61.54%的 OLP 病损组织中可以检测到 *Pm* 信号,该菌可入侵至上皮层及固有层,且在上皮与固有层连接的上皮乳突处大量存在,但在正常口腔黏膜组织中并未发现 *Pm* 的侵入[11]。然而 *Pm* 侵入 OLP 组织内部的机制目前尚不清楚。

上皮屏障主要由细胞连接调控,其中细胞连接之一的紧密连接负责调控离子、溶质和水的细胞旁运输,维持着上皮屏障的稳定。ZO-1 和 JAM-1 则是构成上皮紧密连接的主要蛋白。ZO-1 是第一个被确定的紧密连接相关蛋白,是连接跨膜蛋白 Occludin 和细胞骨架肌动蛋白的桥梁,在稳定细胞间连接复合体,维持上皮屏障稳定方面起到重要作用[18]。JAM-1 是一种免疫球蛋白超家族蛋白,能够控制营养物质和溶质穿过上皮表面[19],此外还具有调节细胞迁移、细胞极性、细胞旁通透性和增殖的作用[20]。

本研究通过对 OLP 病损组织和正常组织中紧密连接蛋白 ZO-1,JAM-1 进行免疫组化染色,结果发现 ZO-1 和 JAM-1 在 OLP 组织中的蛋白表达明显减少,提示 OLP 组织的上皮屏障的完整性遭到破坏。唾液链球菌 *Ss* 在正常口腔中大量存在,是口腔微生物群中的优势菌之一[21]。因此本研究选择 *Ss* 作为对照菌来检测其对上皮细胞屏障功能的影响。Transwell 上皮屏障渗透性实验中,下室 FD4 吸光度随着 *Pm* 浓度的增加而增加,*Ss* 浓度增加则未导致 FD4 吸光度的变化,说明 *Pm* 能够损伤细胞形成的屏障,促进 FD4 穿过上室进入下室。人口腔角质形成细胞 HOK 是研究 OLP 疾病最常用的正常口腔上皮细胞。因此将 *Pm* 与 HOK 共培养,发现 ZO-1、JAM-1 的 mRNA 相对表达量随着 *Pm* 浓度的增加和刺激时间的延长均显著减少,而其他紧密连接蛋白 Occludin、Claudin-2、Claudin-3 和 Claudin-4 的 mRNA 表达在 *Pm* 的作用下无明显改变。以上提示 *Pm* 能够抑制紧密连接蛋白 ZO-1 和 JAM-1 表达,导致上皮屏障功能损害。

Pm 是一种革兰阴性厌氧球杆菌,与根管内、根尖周感染[22]以及牙周炎[23]密切相关。*Pm* 含有与牙周主要致病菌牙龈卟啉单胞菌同源的 IX 型分泌系统(type IX secretion system, T9SS)[24]。牙龈卟

啉单胞菌可通过 T9SS 分泌其牙龈蛋白酶降解牙龈上皮细胞之间的紧密连接蛋白 Claudin1 和 JAM-1，导致上皮屏障功能受损[25-26]。紧密连接紊乱将导致细胞极性丧失，而细胞极性的丧失是上皮组织损伤的早期标志之一[27]。因此，推测 *Pm* 亦可通过 T9SS 分泌蛋白酶降解紧密连接蛋白 ZO-1，JAM-1，导致 OLP 组织上皮渗透性增加，完整性受损。促使 *Pm* 及其毒性因子进入上皮深层组织，作为靶抗原被抗原呈递细胞识别，促使炎症通路激活，诱导炎症因子和趋化因子表达，募集 T 淋巴细胞在上皮固有层浸润，使基底细胞液化变性，上皮屏障进一步破坏，从而导致 OLP 慢性炎症的发生。

综上所述，*Pm* 可能通过抑制紧密连接蛋白 ZO-1、JAM-1 的表达破坏 OLP 上皮组织屏障，从而侵入上皮组织导致慢性炎症。*Pm* 可能在 OLP 疾病的发生发展中起到重要作用。

【参考文献】

[1] CHENG Y S, GOULD A, KURAGO Z, et al. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2016,122(3): 332-354.

[2] KRUPAA R J, SANKARI S L, MASTHAN K M, et al. Oral lichen planus: an overview[J]. J Pharm Bioallied Sci, 2015,7(Suppl 1): S158-S161.

[3] ALRASHDAN M S, CIRILLO N, MCCULLOUGH M. Oral lichen planus: a literature review and update[J]. Arch Dermatol Res, 2016,308(8): 539-551.

[4] OLSON M A, ROGERS R S, BRUCE A J. Oral lichen planus[J]. Clin Dermatol, 2016,34(4): 495-504.

[5] HE Y, GONG D, SHI C, et al. Dysbiosis of oral buccal mucosa microbiota in patients with oral lichen planus[J]. Oral Dis, 2017,23(5): 674-682.

[6] WANG X W, ZHAO Z B, TANG N, et al. Microbial community analysis of saliva and biopsies in patients with oral lichen planus[J]. Front Microbiol, 2020,11: 629.

[7] WANG K, LU W X, TU Q C, et al. Preliminary analysis of salivary microbiome and their potential roles in oral lichen planus[J]. Sci Rep, 2016,6: 22943.

[8] LI Y, WANG K, ZHANG B, et al. Salivary mycobiome dysbiosis and its potential impact on bacteriome shifts and host immunity in oral lichen planus[J]. Int J Oral Sci, 2019,11(2): 13.

[9] WANG K, MIAO T, LU W X, 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.

[10] 郑赛巍，周杨一帆，蔡丽婷，等. 共生菌与口腔扁平苔藓的相关性研究[J]. 同济大学学报(医学版)，2019，40(4)：425-430.

[11] ZHENG S W, XU P, CAI L T, et al. The presence of Prevotella melaninogenica within tissue and preliminary study on its role in the pathogenesis of oral lichen planus[J]. Oral Dis,2021.

[12] PRESLAND R B, JUREVIC R J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues[J]. J Dent Educ, 2002,66(4): 564-574.

[13] KIRSCHNER N, HOUDEK P, FROMM M, et al. Tight junctions form a barrier in human epidermis[J]. Eur J Cell Biol, 2010,89(11): 839-842.

[14] LU R Y, YANG W X, HU Y J. The role of epithelial tight junctions involved in pathogen infections[J]. Mol Biol Rep, 2014,41(10): 6591-6610.

[15] PAUL M, SHETTY D C. Analysis of the changes in the basal cell region of oral lichen planus: an ultrastructural study[J]. J Oral Maxillofac Pathol, 2013, 17(1): 10-16.

[16] CHOI Y S, KIM Y, YOON H J, et al. The presence of bacteria within tissue provides insights into the pathogenesis of oral lichen planus[J]. Sci Rep, 2016,6: 29186.

[17] 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.

[18] MCNEIL E, CAPALDO C T, MACARA I G. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(4): 1922-1932.

[19] MONTEIRO A C, PARKOS C A. Intracellular mediators of JAM-A-dependent epithelial barrier function[J]. Ann N Y Acad Sci, 2012,1257: 115-124.

[20] SEVERSON E A, PARKOS C A. Structural determinants of Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) function and mechanisms of intracellular signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009,21(5): 701-707.

[21] FAVIER C F, VAUGHAN E E, DE VOS W M, et al. Molecular monitoring of succession of bacterial

communities in human neonates[J]. Appl Environ Microbiol, 2002,68(1): 219-226.
[22] HSIAO W W, LI K L, LIU Z Q, et al. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections[J]. BMC Genomics, 2012,13: 345.
[23] IBRAHIM M, SUBRAMANIAN A, ANISHETTY S. Comparative pan genome analysis of oral *Prevotella* species implicated in periodontitis[J]. Funct Integr Genomics, 2017,17(5): 513-536.
[24] KONDO Y, SATO K, NAGANO K, et al. Involvement of PorK, a component of the type IX secretion system, in *Prevotella melaninogenica* pathogenicity [J]. Microbiol Immunol, 2018,62(9): 554-566.
[25] TADA H, NISHIOKA T, TAKASE A, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier[J]. Cell Microbiol, 2019,21(3): e12972.
[26] TAKEUCHI H, SASAKI N, YAMAGA S, et al. *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(11): e1008124.
[27] NAGAOKA K, UDAGAWA T, RICHTER J D. CPEB-mediated ZO-1 mRNA localization is required for epithelial tight-junction assembly and cell polarity [J]. Nat Commun, 2012,3: 675.

(上接第 458 页)

[30] ANDREWS C N, WOO M, BURESI M, et al. Prucalopride in diabetic and connective tissue disease-related gastroparesis: randomized placebo-controlled crossover pilot trial[J]. Neurogastroenterol Motil, 2021,33(1): e13958.
[31] FUKUDO S, NAKAMURA M, HAMATANI T, et al. Efficacy and safety of 5-HT4 receptor agonist minesapride for irritable bowel syndrome with constipation in a randomized controlled trial[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021,19(3): 538-546. e8.
[32] TACK J, MASUY I, VAN DEN HOUTE K, et al. Drugs under development for the treatment of functional dyspepsia and related disorders[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2019,28(10): 871-889.
[33] HABIL N, AL-MURRANI W, BEAL J, et al. Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner[J]. Benef Microbes, 2011,2(4): 283-293.
[34] HOFFMAN J M, TYLER K, MACEACHERN S J, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT(4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity[J]. Gastroenterology, 2012, 142(4): 844-854. e4.