

口腔扁平苔藓实验模型建立的研究进展

沈晨露 叶伟佳 吕柯佳 高碧聪 姚华

浙江大学医学院附属第一医院口腔科 杭州 310003

[摘要] 口腔扁平苔藓是一种最常见的口腔黏膜慢性炎症性疾病，临床上缺乏有效的治疗措施。寻找和建立合适的实验模型对开展口腔扁平苔藓诊治研究有着重要的意义，但因口腔扁平苔藓的发病原因和机制未明，给实验模型的建立带来困难，是目前口腔学者面临的难题之一。迄今为止，国内外尚未建立完善的口腔扁平苔藓动物模型，而相关细胞模型已较为成熟，本文就目前口腔扁平苔藓实验模型的研究进展进行综述。

[关键词] 口腔扁平苔藓；动物模型；细胞模型

[中图分类号] R 781.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2020028



开放科学（资源服务）
标识码（OSID）

Research progress on experimental model establishment of oral lichen planus Shen Chenlu, Ye Weijia, Lü Kejia, Gao Bicong, Yao Hua. (Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81101660).

[Abstract] Oral lichen planus is one of the most common chronic inflammatory diseases of oral mucosa, which lacks effective treatment in clinic. Finding and establishing an appropriate experimental model is of great significance for the diagnosis and treatment of oral lichen planus. However, due to the unclear pathogenesis and mechanism, it is difficult to establish an experimental model, which is one of the difficulties faced by stomatologists at present. Up to now, there is no perfect animal model of oral lichen planus at home and abroad, while the related cell model has been mature. This article reviews the current research progress of experimental models of oral lichen planus.

[Key words] oral lichen planus; animal models; cell models

口腔扁平苔藓（oral lichen planus, OLP）是一种口腔黏膜慢性炎症性疾病，临床表现多样^[1]，常累及颊部、舌背、牙龈等部位^[2]，多为双侧、具有对称性，病理特征表现为上皮淋巴细胞呈带状浸润和基底细胞液化变性^[3]。OLP在普通人群中的患病率在0.5%到2.2%之间，好发于30~70岁人群，且女性更易患病^[4-6]，因其慢性的疾病进展、潜在的恶变可能^[7-8]及难以自愈等特征，给患者身心健康带来严重影响。目前临床上尚没有OLP有效的根治措施，常使用糖皮质激素和免疫调节药物来缓解疾病发展，停留在将疾病控制稳定防止

癌变阶段。为探寻治疗OLP的方法，建立理想的OLP实验模型进行研究非常必要。但临床上OLP特征常与其他口腔黏膜疾病特征重叠在一起，且OLP不具有无限增殖的特点，在实验模型中疾病特征往往随时间延长而消失，为OLP的研究带来较大的困难。目前为止，国内外学者尚未建立完善的OLP动物模型，但仍有不少学者进行了初步的探索，细胞模型则相对成熟。因此，本文将对目前已开展的OLP实验模型进行综述。

1 与OLP相关的实验模型研究现状

1.1 OLP细胞模型研究现状

1.1.1 人OLP角质形成细胞的体外培养 有学者^[9]从组织病理学确诊的OLP患者黏膜组织分离上皮层，酶解消化并于无血清角质形成细胞培养基中进行

[收稿日期] 2019-04-14; **[修回日期]** 2019-10-06

[基金项目] 国家自然科学基金（81101660）

[作者简介] 沈晨露，硕士，Email: 21818728@zju.edu.cn

[通信作者] 姚华，主任医师，博士，Email: yaohua@zju.edu.cn

体外原代及传代培养,成功建立了体外培养人OLP角质形成细胞的方法。后有学者^[5,10]重复了该实验,也成功培养出了体外OLP角质形成细胞,且可成功传代5~6代而不丧失活力。该建模方法采用直接提取病变组织进行培养,保证了培养细胞的代表性,但细胞传代次数较少,不能模拟OLP的慢性疾病过程,尤其是无法建成为具备黏膜特征的模式。

1.1.2 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激人口腔角质形成细胞(human oral keratinocyte, HOK)/人永生角质形成细胞(human immortalized keratinocyte, HaCaT) 目前大量OLP细胞因子相关研究都使用革兰氏阴性菌LPS刺激HOK的炎症模型来进行研究。使用LPS作为诱导炎症因子的介质,来研究OLP炎症细胞因子的变化^[11-12]。此外,HaCaT是人类皮肤角质形成细胞的永生细胞^[13],因其容易生长和无限传代的特点,是口腔角质形成细胞的合适替代品。有学者选取HaCaT作为研究对象,将HaCaT在无血清的培养基中饥饿24 h,再在无血清环境下用不同浓度从大肠埃希菌055:B5中净化出的LPS处理,来介导模拟局部OLP免疫环境。该细胞模型建立方法被应用到后期多个实验^[14-16]中。但LPS处理HOK/HaCaT结果不定向,模拟环境可能与OLP免疫环境存在差异。

1.1.3 角质形成细胞/T细胞共培养模型 OLP免疫学机制相关的关键细胞主要为角质形成细胞和T细胞,因此有学者选用这两者共培养进行OLP细胞模型的建立。基于OLP发生的首要原因是激活诱导自身反应性T细胞产生的抗原、超抗原,该学者^[17]采用干扰素(interferon, IFN)- γ 刺激纯化培养的角质形成细胞作为非专职的抗原递呈细胞,将原代培养的T细胞作为免疫细胞,来模拟OLP病损的免疫应答环境,并将亚适剂量的植物血凝素类多克隆刺激剂(phytohaemagglutinin, PHA)作为抗原刺激物,来推测OLP患者体内特异性免疫应答的状况^[18-19]。结果发现该共培养模型能在一定程度上模拟OLP局部损害的免疫应答环境,虽然可能与机体OLP局部免疫环境存在一定的差异,但具有一定代表性。

1.2 OLP动物模型研究现状

1.2.1 移植法 参考口腔癌动物模型中的移植瘤模型^[20],有学者^[21]提出通过移植OLP组织块来进行OLP动物模型的建立。早期研究^[21]选取裸鼠作为

实验对象,将OLP病变组织移植至裸鼠皮下,但随后发现其病理学特征迅速消失。这可能是因为裸鼠虽然缺失细胞免疫系统,但仍保留了比较完整的体液免疫系统,从而导致裸鼠对病变组织的排斥。基于该研究,随后有学者^[22]选取了先天缺乏功能性T、B细胞的严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)小鼠作为实验对象,采用将患者非糜烂型OLP病损移植到SCID小鼠的舌腹和背部,并于移植术后第1、2周取出移植物进行病理学检查,但是移植物的病理学特征仍逐渐消失。这一方面可能是因为SCID小鼠体内仍存有大量自然杀伤细胞,另一方面可能是因为移植物大小被小鼠体型限制,导致淋巴细胞和细胞因子数量偏少,从而丧失病理学特征。

1.2.2 局部注射法及针刺划痕法 董鑫^[23]采用不同浓度的OLP组织匀浆进行口腔黏膜下及背部皮肤皮下局部注射,4周后病理结果发现黏膜下层有慢性炎细胞浸润,但上皮层与固有层均未见明显变化。这说明仅皮下注射无法引起上皮及固有层的炎症。基于局部注射法的缺陷,胡维力^[24]采用针刺法建立OLP模型,同样取OLP患者病变组织制成匀浆,再用装有匀浆的注射器垂直小鼠口腔黏膜反复刺入、拔出直至针刺部位黏膜表面充血,再在黏膜下注入少许组织匀浆,4周后处死小鼠取病变组织制成病理切片。但病理结果仍未出现典型的OLP固有层淋巴细胞浸润带,这一方面可能是因为OLP不具有无限增殖能力,不能在动物体内广泛增殖,另一方面可能因为实验动物体内仍存在免疫反应。

1.2.3 免疫缺陷小鼠注射人外周血淋巴细胞构建模型法 由于OLP是T细胞介导的黏膜疾病,胡维力^[24]尝试通过给非肥胖糖尿病严重联合免疫缺陷(non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID)小鼠腹腔注入人外周血淋巴细胞(human peripheral blood lymphocyte, Hu-PBL)来建立具有人免疫学特性的非肥胖糖尿病严重联合免疫缺陷(human peripheral blood lymphocyte non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency, Hu-PBL-NOD/SCID)小鼠模型,以确保T细胞的聚集,从而快速建立起OLP动物模型。但以失败告终,该学者发现如果PBL注射数量不足,就难以建立起有效的免疫系统;但PBL注射数量过大,又容易发生移植物抗宿主反应(graft versus host reaction, GVHR)。

2 靶向OLP发病原因和机制的动物模型构建

经过学者们大量的研究, OLP实验模型取得了一些可喜的进展, 然而, 迄今为止, 国内外尚无理想的模型开展OLP诊治的体内外模型研究。深入探讨建立OLP模型将有助于OLP病因学、诊治学的研究。

2.1 以病因为基础构建OLP模型研究趋势

迄今为止, OLP的病因尚未明确, 遗传易感性、免疫机制、心理疾病、药物过敏反应和感染等都是与OLP相关的病因因素^[25-27]。目前将OLP可能病因主要分为4种: 局部或系统因素引起的细胞介导超敏反应、压力、病毒感染、上皮抗原自身免疫反应与外部抗原失调反应^[27]。其中尚无确切证据证明OLP与过敏反应、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染有直接关系。

压力被认为在OLP发病过程中起着重要作用, 据报道, 与正常对照组相比, OLP患者更容易出现焦虑和抑郁。急性和慢性心理压力可以诱导先天性和适应性免疫反应的显著变化, 这些免疫反应变化主要通过下丘脑-垂体-肾上腺轴和交感神经-肾上腺轴的神经内分泌介质介导^[28]。但心理压力在实验室中较难定义和模拟, 因此不推荐单独使用该病因作为未来OLP动物模型构建方向, 可以作为辅助因素作为模型研究对象。

因此, 目前来看, 自身免疫反应支持患者自身T细胞杀死自体角质细胞的理论应是未来OLP模型构建的主要趋势, 可以尝试通过诱导实验体自身免疫反应来进行实验模型的设计, 以此探索OLP的致病因素, 起到早期预防OLP发生的作用。

2.2 以机制为基础构建OLP模型

免疫介导细胞凋亡有多重机制, 但目前OLP角化细胞凋亡的机制仍不明确。在角质形成细胞/T细胞共培养模型成功的基础上, 未来研究可以重点探索T细胞活化上游反应机制。导致T细胞活化或耐受的专职抗原呈递T细胞主要依赖于树突状细胞(dendritic cell, DC), 有研究^[29]发现OLP病损中存在DC、T细胞交互反应引起T细胞活化。OLP的DC亚群主要包括上皮层中的朗格汉斯细胞、固有层/间充质中的髓样DC以及浆细胞样DC。成熟DC表达T细胞活化所需要的全部分子, 主要存在于固有层, 并与T细胞成簇分布^[30]; 浆细胞样DC

主要产生IFN- α , 有研究显示IFN- α 是另一种通过诱导黏病毒抗性蛋白A(myxovirus resistance protein A, MxA)和其他基因表达刺激I型免疫反应的细胞因子^[31-32], 可以启动自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)/T细胞的杀伤作用或者Fas L介导的细胞凋亡^[33]。

一方面, 虽然引起CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞反应的抗原是未知的, 但可以尝试使用IFN- α 来诱导OLP角化细胞凋亡, 探索OLP致病过程的其他通路, 有助于OLP的病理机制研究及靶向药物开发。另一方面, DC作为抗原提呈细胞, 诱导了特异性的适应性免疫发生^[34], 对DC的研究将有利于探索OLP炎症发生的始动因素, 为OLP预防治疗提供理论依据和参考。

3 小结

综上所述, 目前OLP细胞模型已较为成熟, 并且多数已经过反复验证, 这为OLP病理机制尤其是特异性免疫应答有关的研究提供了基础。但国内外尚未建立完善的OLP动物模型, 目前的OLP动物模型可以形成固有层散在淋巴细胞浸润等慢性炎症的病理表现, 但还未出现典型的淋巴浸润带, 相对来说更接近于口腔苔藓样变的病理表现^[20,35], 其主要难点在于: 一是OLP特异性发病机制的复杂性; 二是OLP不具有无限增殖的能力, 无法在动物实验模型中长期存在。未来的研究可以着眼于实验动物的选择、有效抗原的提取及IFN- α 与IFN- γ 诱导等方面入手, 进一步探索OLP动物模型的建立。

4 参考文献

- [1] Giannetti L, Dello Diago AM, Spinass E. Oral lichen planus[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32(2): 391-395.
- [2] Rivera C, Jones-Herrera C, Vargas P, et al. Oral diseases: a 14-year experience of a Chilean institution with a systematic review from eight countries[J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2017, 22(3): e297-e306.
- [3] Nosratzahi T. Oral lichen planus: an overview of potential risk factors, biomarkers and treatments[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(5): 1161-1167.

- [4] Diebold S, Overbeck M. Soft tissue disorders of the mouth[J]. *Emerg Med Clin N Am*, 2019, 37(1): 55-68.
- [5] Cao T, Zhang H, Zhou L, et al. *In vitro* cell culture system optimization of keratinocytes from oral lichen planus (OLP) patients[J]. *Oral Dis*, 2017, 23(2): 225-232.
- [6] Olson MA, Rogers RS 3rd, Bruce AJ. Oral lichen planus[J]. *Clin Dermatol*, 2016, 34(4): 495-504.
- [7] Lauritano D, Arrica M, Lucchese A, et al. Oral lichen planus clinical characteristics in Italian patients: a retrospective analysis[J]. *Head Face Med*, 2016, 12: 18.
- [8] Giuliani M, Troiano G, Cordaro M, et al. Rate of malignant transformation of oral lichen planus: a systematic review[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(3): 693-709.
- [9] 汪群, 诸焕颖, 孙红英. 人口腔扁平苔藓角质形成细胞的体外培养及生物学鉴定[J]. *复旦学报(医学版)*, 2007, 34(5): 776-779, 784.
- Wang Q, Zhu HY, Sun HY. Culture and biological identification of human oral lichen planus keratinocytes *in vitro*[J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2007, 34(5): 776-779, 784.
- [10] Sun HY, Zhou GM, Wang Q, et al. *In vitro* culture system for keratinocytes obtained from oral lichen planus lesions[J]. *Clin Oral Investig*, 2014, 18(4): 1195-1203.
- [11] Xu N, Li BY, Liu ZZ, et al. Role of mammary serine protease inhibitor on the inflammatory response in oral lichen planus[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(4): 1091-1099.
- [12] Ge XJ, Wang LX, Li MD, et al. Vitamin D/VDR signaling inhibits LPS-induced IFN γ and IL-1 β in oral epithelia by regulating hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 18.
- [13] Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1195: 33-41.
- [14] Zhao B, Li R, Yang F, et al. LPS-induced vitamin D receptor decrease in oral keratinocytes is associated with oral lichen planus[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 763.
- [15] Wang YN, Zhang H, Du GH, et al. Total glucosides of paeony (TGP) inhibits the production of inflammatory cytokines in oral lichen planus by suppressing the NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 67-72.
- [16] Du J, Li R, Yu F, et al. Experimental study on 1,25(OH) $_2$ D $_3$ amelioration of oral lichen planus through regulating NF- κ B signaling pathway[J]. *Oral Dis*, 2017, 23(6): 770-778.
- [17] Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, et al. Skew in T cell receptor usage with polyclonal expansion in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection[J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(2): 192-201.
- [18] 李琴, 杜观环, 唐国瑶. 口腔扁平苔藓相关细胞模型的建立[J]. *上海口腔医学*, 2011, 20(1): 16-20.
- Li Q, Du GH, Tang GY. Establishment of a correlated cell model of oral lichen planus *in vitro*[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2011, 20(1): 16-20.
- [19] Du GH, Qin XP, Li Q, et al. The high expression level of programmed death-1 ligand 2 in oral lichen planus and the possible costimulatory effect on human T cells[J]. *J Oral Pathol Med*, 2011, 40(7): 525-532.
- [20] 孙晓爽, 何虹, 刘巍, 等. 常见口腔黏膜病动物模型研究进展[J]. *口腔医学*, 2018, 38(4): 380-384.
- Sun XS, He H, Liu W, et al. Research progress of animal models of common oral mucosal diseases[J]. *Stomatology*, 2018, 38(4): 380-384.
- [21] Tammi R, Hyyryläinen A, Fräki JE. Histologic characteristics of lichen planus transplanted onto nude mice and cultured *in vitro*[J]. *Arch Dermatol Res*, 1988, 280(1): 23-28.
- [22] 杨灵澜, 叶萍, 马莉, 等. 口腔扁平苔藓移植严重联合免疫缺陷小鼠的实验研究[J]. *实用口腔医学杂志*, 2005, 21(2): 210-213.
- Yang LL, Ye P, Ma L, et al. Preliminary study on xenografts of oral lichen planus tissue into SCID mice[J]. *J Pract Stomatol*, 2005, 21(2): 210-213.
- [23] 董鑫. 口腔扁平苔藓动物模型的建立及口腔扁平苔藓患者唾液酶、IL-18的检测及临床意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- Dong X. Establishment of animal model of oral lichen planus and the detection and clinical significance of salivary enzymes, IL-18 in patients with oral lichen planus[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical

- University, 2014.
- [24] 胡维力. 口腔扁平苔藓动物模型的初步建立及化湿行瘀清热方治疗口腔扁平苔藓患者前后血清中差异蛋白的定量研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- Hu WL. Establishment of animal model of oral lichen planus and quantitative analysis of serum proteins in patients with OLP before and after treatment with prescription Huashi xingyu qingre decoction[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2017.
- [25] Di Stasio D, Guida A, Salerno C, et al. Oral lichen planus: a narrative review[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2014, 6: 370-376.
- [26] Kurago ZB. Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: an overview[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2016, 122(1): 72-80.
- [27] Alrashdan MS, Cirillo N, McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update[J]. *Arch Dermatol Res*, 2016, 308(8): 539-551.
- [28] Kemeny ME, Schedlowski M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression[J]. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(8): 1009-1018.
- [29] Wang YF, Shang S, Sun QQ, et al. Increased infiltration of CD11c⁺/CD123⁺ dendritic cell subsets and upregulation of TLR/IFN- α signaling participate in pathogenesis of oral lichen planus[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2018, 125(5): 459-467. e2.
- [30] Santoro A, Majorana A, Roversi L, et al. Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus[J]. *J Pathol*, 2005, 205(4): 426-434.
- [31] Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues[J]. *Blood*, 2007, 109(9): 3625-3632.
- [32] Hervás-Stubbs S, Pérez-Gracia JL, Rouzaut A, et al. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(9): 2619-2627.
- [33] 王宇峰, 齐渊元, 聂红, 等. 口腔扁平苔藓损害组织中树突状细胞亚群数量和比例[J]. *临床口腔医学杂志*, 2015, 31(3): 140-144.
- Wang YF, Qi YY, Nie H, et al. A pilot study on dendritic cells' subsets in oral lichen planus lesions [J]. *J Clin Stomatol*, 2015, 31(3): 140-144.
- [34] 王宇峰, 唐国瑶. 口腔扁平苔藓中树突状细胞的研究现状[J]. *临床口腔医学杂志*, 2014, 30(11): 696-699.
- Wang YF, Tang GY. Research status of dendritic cells in oral lichen planus[J]. *J Clin Stomatol*, 2014, 30(11): 696-699.
- [35] Souto GR, Nunes LF, Tanure BB, et al. CD1a⁺ dendritic cells in oral lichen planus and amalgam lichenoid reaction[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2016, 121(6): 651-656.

(本文编辑 张玉楠)