

CKLF1-C19 多肽影响口腔黏膜下纤维性变中 MFB 活化及对 SFRP 表达的影响^{*}

李艳莉¹ 徐仰龙² 邓金勇³ 何升腾¹ 董方¹

(1. 三亚中心医院口腔科, 海南 三亚 572000; 2. 遵义医科大学附属医院口腔科牙体牙髓科, 贵州 遵义 563003;

3. 三亚市人民医院口腔科, 海南 三亚 572000)

【摘要】 目的 探讨人趋化素样因子(CKLF1)C19 多肽对口腔黏膜下纤维性变(OSF)中肌成纤维细胞(MFB)活化的作用以及对分泌型卷曲相关蛋白(sFRP)表达的影响。**方法** 选取 2020 年 1 月~2021 年 1 月在三亚中心医院口腔科门诊就诊并确诊为 OSF 的患者 8 例, 并选择同期体检的健康志愿者 8 例, 通过组织块培养法分别从健康志愿者和 OSF 患者颊黏膜组织分离成纤维细胞(FB)和 MFB, 免疫荧光染色检测平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和纤维状肌动蛋白(F-actin)表达, 以鉴定 MFB; 将 MFB 随机分为对照组、0.001 mg/L C19 组、0.01 mg/L C19 组、0.1 mg/L C19 组, 各浓度 C19 处理组分别使用含 0.001、0.01、0.1 mg/L CKLF1-C19 多肽培养液培养细胞 48 h, 对照组细胞正常培养, CCK-8 法测定各时间点细胞增殖活性, 收集上清后测定羟脯氨酸的含量, 胶原凝胶收缩实验检测细胞收缩活性, Transwell 小室实验检测细胞迁移与侵袭能力, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)实验测定细胞中 sFRP1、sFRP2、sFRP5 的 mRNA 与蛋白表达水平。**结果** 分离的 FB 与 MFB 大多呈长梭形, MFB 胞体较大、数目较多, 且 α -SMA 呈阳性表达。与对照组比较, 经过 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 CKLF1-C19 多肽处理的 MFB, 在培养 48 h 和 72 h 后细胞增殖活性显著降低($P<0.05$), 上清中羟脯氨酸的含量减少($P<0.05$), 胶原凝胶收缩面积比率显著增加($P<0.05$), 迁移细胞数目与侵袭细胞数目均显著减少($P<0.05$), 细胞内 sFRP1 和 sFRP2 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$), 而 sFRP5 mRNA 和蛋白表达水平变化均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** CKLF1-C19 多肽能够抑制口腔黏膜下纤维性变组织中肌成纤维细胞的增殖、迁移与侵袭, 降低细胞的活化水平, 并调控 sFRP1 和 sFRP2 的表达。

【关键词】 口腔黏膜下纤维性变; 肌成纤维细胞; 人趋化素样因子 C19 多肽; 分泌型卷曲相关蛋白

【中图分类号】 R781.5 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.02.008

CKLF1-C19 polypeptide affects the activation of oral submucosal fibrotic myofibroblasts and the expression of secreted frizzled-related protein

LI Yanli¹, XU Yanglong², DENG Jinyong³, HE Shengteng¹, DONG Fang¹

(1. Department of Stomatology, Sanya Central Hospital, Sanya 572000, Hainan, China;

2. Department of Endodontics, The Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China;

3. Department of Stomatology, Sanya People's Hospital, Sanya 572000, Hainan, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of human chemokine-like factor (CKLF1) C19 polypeptide on the activation of myofibroblasts in oral submucosal fibrosis (OSF) and the effect on the expression of secreted frizzled-related protein (sFRP). **Methods** Separate fibroblasts (FB) and myofibroblasts (MFB) from buccal mucosal tissues of healthy volunteers and OSF patients by tissue block culture method. Immunofluorescence staining to detect the expression of α -SMA and F-actin to identify MFB. MFB were randomly divided into control group, 0.001 mg/L C19 group, 0.01 mg/L C19 group, 0.1 mg/L C19 group, the C19 treatment group at each concentration was treated with a culture medium containing 0.001, 0.01, 0.1 mg/L of CKLF1-C19 polypeptide, and the cells were cultured for 48 h, control cells were

基金项目: 海南省卫生健康行业科研项目(20A200142)

通讯作者: 何升腾, 主任医师, E-mail: zl5509260

引用本文: 李艳莉, 徐仰龙, 邓金勇, 等. CKLF1-C19 多肽影响口腔黏膜下纤维性变中 MFB 活化及对 SFRP 表达的影响[J]. 西部医学, 2023, 35

(2): 195-202. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2023.02.008

cultured normally. The CCK-8 method measures the cell proliferation activity at each time point, after collecting the supernatant, determine the content of hydroxyproline, collagen gel contraction test detects cell contraction activity, Transwell chamber experiment to detect cell migration and invasion ability, real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot (Western blot) experiments were performed to determine the mRNA and protein expression levels of sFRP1, sFRP2 and sFRP5 in cells. **Results** The separated FB and MFB were mostly long fusiform. The MFB cell body was larger and more numerous, and α -SMA was positively expressed. Compared with the control group, MFB treated with CKLF1-C19 polypeptide at 0.001, 0.01, and 0.1 mg/L showed a significant decrease in cell proliferation activity after 48 h and 72 h culture ($P < 0.05$), the content of hydroxyproline in the supernatant decreased ($P < 0.05$), the shrinkage area ratio of collagen gel increased significantly ($P < 0.05$), the number of migrating cells and the number of invading cells were significantly reduced ($P < 0.05$), the mRNA and protein expression levels of sFRP1 and sFRP2 in cells were significantly up-regulated ($P < 0.05$), while the changes in sFRP5 mRNA and protein expression levels were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** CKLF1-C19 polypeptide can inhibit the proliferation, migration and invasion of myofibroblasts in oral submucosal fibrotic tissues, reduced the activation level of cells, and regulate the expression of sFRP1 and sFRP2.

[Key words] Oral submucosal fibrosis; Myofibroblasts; Human chemokine-like factor C19 polypeptide; Secretory frizzled-related protein

口腔黏膜下纤维性变(Oral submucous fibrosis, OSF)是亚洲国家常见的口腔癌前病变,由口腔黏膜结缔组织中异常的胶原蛋白沉积所引起,往往伴随组织纤维化,患者会出现口干、溃疡、烧灼刺痛感、口腔活动受损以及进行性张口受限等症状^[1-3]。研究表明,7%~30%的 OSF 患者可能会转化为口腔癌,且随着 OSF 患者数量的增多,恶变风险也在逐渐升高^[4]。OSF 的病变组织内存在纤维化颊粘膜肌成纤维细胞(Myofibroblast, MFB),能够表达平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA),具有较好的收缩性及胶原分泌能力,活化的 MFB 是导致纤维化过程中细胞外基质积累的关键致病细胞^[5]。因此在 OSF 中以 MFB 为作用靶点抑制增殖、迁移及侵袭等生物学行为,逆转成纤维细胞向其分化,是 OSF 潜在的治疗策略。

人趋化素样因子(Chemokine-like factor 1, CKLF1)是趋化因子样因子蛋白家族的一员,作为 CCR4 的功能配体,其在炎症和自身免疫性疾病中具有广谱的生物学功能。CKLF1 包含至少两个位于其 C 末端的分泌亚型,其中一种为 CKLF1-C19 多肽,简称 C19,从果蝇 S2 细胞中稳定表达时所分泌,可作为 CKLF1 的拮抗剂在多种疾病中发挥抑制作用^[6-7]。目前已有研究表明,C19 对 TGF- β 诱导的肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化具有抑制作用,并能够抑制气道重塑和纤维化的发生^[8]。本研究通过使用 C19 处理 OSF 患者 MFB 观察细胞活化的变化,并探讨 C19 影响 OSF 的分子机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月~2021 年 1 月在

三亚中心医院口腔科门诊就诊并确诊为 OSF 的患者 8 例,其中男 6 例,女 2 例,年龄 38~51 岁,平均(40.95 $\pm$ 3.98)岁,均有咀嚼槟榔习惯。选择同期体检的健康志愿者 8 例,其中男 5 例,女 3 例,年龄 37~48 岁,平均(39.75 $\pm$ 3.66)岁,均无咀嚼槟榔、饮酒及吸烟等行为,且无口腔黏膜病变和其他急性或慢性炎症性疾病。本研究获得患者知情同意以及三亚中心医院伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂 CKLF1-C19 多肽(中国疾病基因研究中心);胎牛血清(浙江天杭生物科技公司);DMEM 培养基和胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);免疫荧光染色试剂盒和 CCK-8 试剂盒(上海翊圣生物科技公司);羟脯氨酸检测试剂盒(英国 Abcam 公司);Trizol(日本 Takara 公司);ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(南京诺唯赞生物公司);DAPI 染液、Phalloidin 染液和 I 型鼠尾胶原(北京索莱宝生物公司);Transwell 小室、BCA 蛋白测定试剂盒和结晶紫染液(上海碧云天生物研究所);Pierce ECL 化学发光试剂液(上海索莱宝生物科技公司);鼠抗人 α -SMA、sFRP1、sFRP2、sFRP5 单克隆抗体以及兔抗人 GAPDH 单克隆抗体(英国 Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠(北京中杉金桥公司)。

1.3 方法

1.3.1 FB 和 MFB 分离、培养与鉴定 取两组颊部对应位置黏膜组织,采用组织块法分离培养原代细胞。用含抗菌素的 PBS 清洗黏膜组织 3 次,每次 3 min,分离上皮组织并剪成约 1 mm³ 的小块,将小块放入培养瓶内,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温箱中贴壁培养,当组

织块周围有细胞生长,且融合达到 80% 左右时,0.25%胰蛋白酶消化传代,倒置显微镜观察细胞形态,选择第三代至第六代细胞用于实验。

1.3.2 免疫荧光染色 原代培养的细胞传至第 5 代时,进行细胞爬片,进行 α -SMA 和 F-actin 的免疫细胞荧光染色。细胞爬片后,4℃ 下以 4% 多聚甲醛固定 30 min,蒸馏水冲洗干净,pH7.4 的 PBS 处理 5 min,0.1% Triton X-100 继续作用 5 min,再以 5% BSA 封闭 20 min,PBS 清洗干净后,在玻片上滴加鼠抗人 α -SMA 单克隆抗体和 Phalloidin 试剂液,室温避光染色 20 min,PBS 清洗干净,采用 DAPI 复染 10 min,清洗后封片,通过扫描共焦显微镜观察染色情况。

1.3.3 细胞分组与处理 选择生长状态良好的第 5 代 MFB,以 1×10^4 个细胞接种入 96 孔板,置于 37℃、5%CO₂ 的恒温箱过夜培养。实验分组设置为对照组、0.001 mg/L C19 组、0.01mg/L C19 组、0.1 mg/L C19 组,对照组细胞正常培养,各浓度 C19 处理组分别加浓度为 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 CKLF1-C19 多肽培养,48 h 后收集细胞进行后续研究。

1.3.4 CCK-8 法 将 MFB 按照 1.3.3 处理,结束后置于 37℃、5%CO₂ 的恒温箱内孵育,分别于 24、48、72 h 时,加入 10 μ L CCK-8 试剂液至待测细胞孔中,轻轻混匀,继续孵育 4 h,通过全自动酶标仪测定 450 nm 处各孔细胞的光密度(OD)值。

1.3.5 羟脯氨酸含量 测定收集处理后的各组 MFB,4℃ 下以 4000 rpm/min 离心 10 min,获取各组样本的上清,测定羟脯氨酸的含量,具体步骤严格根据试剂盒说明书进行。

1.3.6 胶原凝胶收缩实验 将 I 型鼠尾胶原溶液配制成 2 mg/mL 的新鲜胶原混合液,收集处理后的各组 MFB,胰蛋白酶消化后,使用无血清 DMEM 培养液重悬,并以 2×10^5 个/mL 接种于胶原液中,混合后,取 500 μ L 接种于 24 孔板中,置于 37℃ 下孵育 2 h,使细胞贴附于凝胶表面,进一步置于恒温箱内孵育 48 h,观察胶原凝胶收缩情况,数码相机摄像,使用 ImageJ 软件分析胶原凝胶面积,测定培养后凝胶面积与凝胶初始面积的百分比。

1.3.7 细胞迁移与侵袭检测 使用带 8 μ m 孔径的聚碳酸酯滤膜的 24 孔 Transwell 小室测定各组 MFB 的迁移和侵袭能力。在细胞侵袭测定中,滤膜涂基质胶以覆盖膜孔。在上室中加入 100 μ L 含 1×10^3 个细胞的悬液,下室加入 600 μ L 含 10% 胎牛血清的新鲜培养液。置于 37℃、5%CO₂ 恒温箱中孵育 24 h,将其下表面在 4% 多聚甲醛中固定后,结晶紫染色,PBS 清

洗后封片,光学显微镜观察膜下细胞数目,计数 5 个不同视野取平均值。

1.3.8 实时荧光定量聚合酶链反应 各组 MFB 中加入适量 Trizol,提取总 RNA,分光光度计检测纯度与浓度。根据第一链 cDNA 合成试剂盒,将总 RNA 逆转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板,通过荧光定量 PCR 系统进行扩增,检测各基因 mRNA 的表达水平,按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行。扩增条件如下:95℃ 30 s;95℃ 5 s、60℃ 10 s,40 个循环;溶解曲线:95℃ 15 s;60℃ 60 s;95℃ 15 s。以 GAPDH 作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来计算目的基因表达量,引物序列,见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequence

基因	引物序列
sFRP1	上游:5'-ACGTGGGCTACAAGAAGATGG-3'
	下游:5'-CAGCGACACGGGTAGATGG-3'
sFRP2	上游:5'-GAAGCTCCCAAGGTGTGTGA-3'
	下游:5'-CACTTTGATTTTCAGTGCGAAGT-3'
sFRP5	上游:5'-TGCCCTTGCCCACAGTTAGA-3'
	下游:5'-GAGGGAACAGGGATAGGAGAACA-3'
GAPDH	上游:5'-ACAACCTTGTGATCGTGAAGG-3'
	下游:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'

1.3.9 Western blot 检测 在各组 MFB 中加入 RIPA 溶液,置于冰上裂解 30 min,4℃ 下以 12000 r/min 离心 30 min,收集上清,BCA 法测定蛋白质量。取等量蛋白样品,在制备的 10% SDS-PAGE 凝胶孔内上样,电泳分离,将分离的蛋白电转至 PVDF 膜,将膜放在 5% 脱脂奶粉中,室温封闭 1 h,TBST 洗膜,加入一抗工作液(1:1000),4℃ 孵育过夜。次日,弃去原液,TBST 充分洗膜后,加入对应二抗工作液(1:5000),室温孵育 1 h,利用 Pierce ECL 化学发光底物显影,凝胶系统成像,ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.4 统计学分析 本研究各项数据用 SPSS 23.0 软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FB 与 MFB 的鉴定结果 在倒置显微镜下可见培养的 FB 与 MFB 大多呈长梭形,胞体较大,胞核为卵圆形,MFB 较 FB 更加饱满,体积增大,且形态较不规则,细胞增殖加快(见图 1)。 α -SMA 和 F-actin 免疫荧光染色结果显示,从健康志愿者的颊黏膜组织中分离的 FB, α -SMA 染色为阴性,F-actin 染色呈红色

荧光,主要分布在细胞膜;从 OSF 患者的颊黏膜组织中分离的 MFB, α -SMA 染色呈绿色荧光,F-actin 染色呈红色荧光,两者均在形成束状纤维结构分布于细胞质内。见图 2。

2.2 CKLF1-C19 多肽对 MFB 增殖活性的影响 CCK-8 检测结果显示,与对照组比较,经过 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 C19 多肽处理的 MFB,在培养 48 h 和 72 h 后,细胞增殖活性均显著降低($P<0.05$),各剂量对细胞增殖活性的抑制作用呈剂量依赖性($P<0.05$),见图 3。

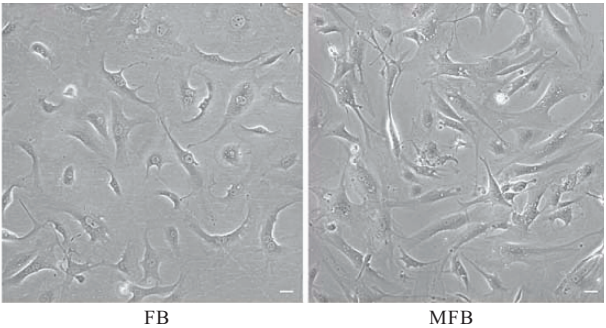


图 1 FB 与 MFB 的形态观察(比例尺=20 μ m)

Figure 1 Observation of the morphology of FB and MFB

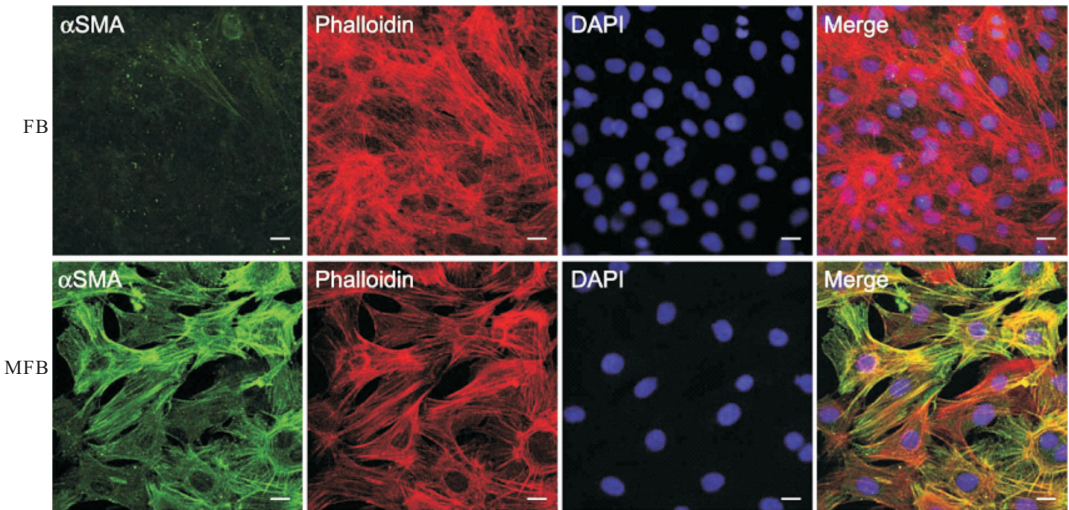


图 2 FB 与 MFB 内 α -SMA 和 F-actin 表达检测(免疫荧光染色,比例尺=20 μ m)

Figure 2 Detection of α -SMA and F-actin expression in FB and MFB

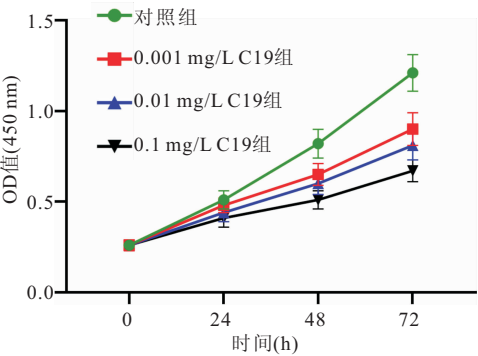


图 3 各组 MFB 增殖活性比较

Figure 3 Comparison of MFB proliferation activity in each group

2.3 CKLF1-C19 多肽对 MFB 上清中羟脯氨酸含量的影响 各组 MFB 培养液上清中羟脯氨酸含量测定结果显示,经过 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 C19 多肽处理的 MFB 上清中羟脯氨酸的含量均显著低于对照组 MFB 上清中羟脯氨酸的含量($P<0.05$);与 0.001 mg/L C19 组比较,0.01 mg/L C19 组与 0.1 mg/L C19 组细胞上清中羟脯氨酸的含量显著降低($P<0.05$);与 0.01 mg/L C19 组比较,0.1 mg/L C19 组

细胞上清中羟脯氨酸的含量也显著降低($P<0.05$),见图 4。

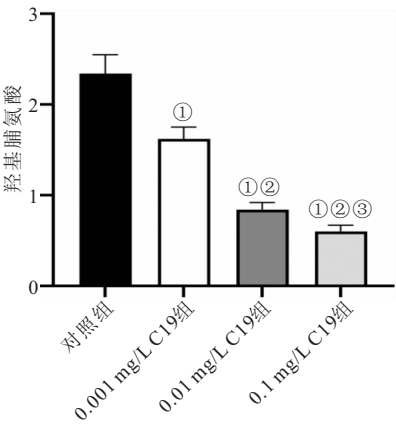


图 4 各组 MFB 上清中羟脯氨酸含量比较

Figure 4 Comparison of hydroxyproline content in MFB supernatant of each group

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 0.001 mg/L C19 组比较,② $P<0.05$;与 0.01 mg/L C19 组比较,③ $P<0.05$

2.4 CKLF1-C19 多肽对 MFB 收缩活性的影响 胶原凝胶收缩实验结果显示,与对照组比较,经过 0.001、

0.01、0.1 mg/L 的 C19 多肽处理的 MFB 与胶原混合培养后,胶原凝胶收缩面积比率均显著增加($P<0.05$);与 0.001 mg/L C19 组比较,0.01 mg/L C19 组与 0.1 mg/L

L C19 组胶原凝胶收缩面积比率显著增加($P<0.05$);与 0.01 mg/L C19 组比较,0.1 mg/L C19 组胶原凝胶收缩面积比率也显著增加($P<0.05$)。见图 5。

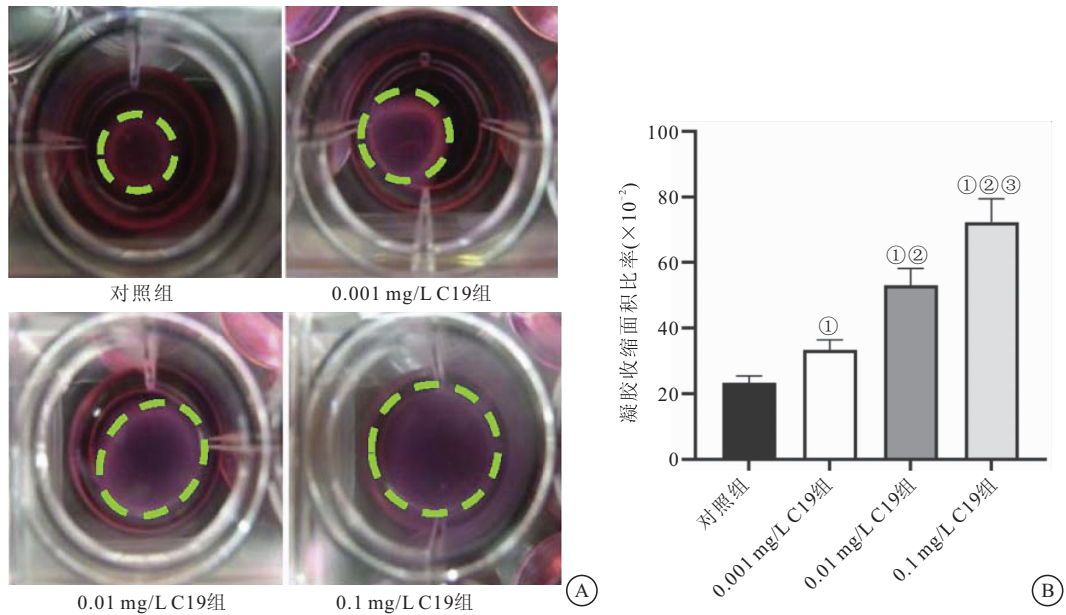


图 5 各组 MFB 收缩活性比较

Figure 5 Comparison of MFB contractile activity in each group

注:A. 胶原凝胶收缩实验检测各组 MFB 胶原情况;B. 各组 MFB 胶原凝胶收缩面积比率。与对照组比较,① $P<0.05$;与 0.001 mg/L C19 组比较,② $P<0.05$;与 0.01 mg/L C19 组比较,③ $P<0.05$

2.5 CKLF1-C19 多肽对 MFB 内分泌型卷曲相关蛋白表达的影响 qRT-PCR 实验测定结果显示,经过 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 C19 多肽处理的 MFB 内 sFRP1 和 sFRP2 的 mRNA 表达水平均较对照组显著上调($P<0.05$);0.01 mg/L C19 组与 0.1 mg/L C19 组中 sFRP1 和 sFRP2 的 mRNA 表达水平较 0.001 mg/L C19 组显著上调($P<0.05$);与 0.01 mg/L C19 组比较,0.1 mg/L C19 组 sFRP1 和 sFRP2 的 mRNA 表达水平进一步显著上调($P<0.05$)。而不同浓度 C19 多肽处理下的 sFRP5 mRNA 表达水平与对照组 sFRP5 mRNA 表达水平之间差异均无统计学意义

($P>0.05$)(见图 6)。Western blot 检测结果也显示,与对照组比较,经过 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 C19 多肽处理的 MFB 内 sFRP1 和 sFRP2 的蛋白表达水平均显著上调($P<0.05$);与 0.001 mg/L C19 组比较,0.01 mg/L C19 组与 0.1 mg/L C19 组中 sFRP1 和 sFRP2 的蛋白表达水平显著上调($P<0.05$);与 0.01 mg/L C19 组比较,0.1 mg/L C19 组 sFRP1 和 sFRP2 的蛋白表达水平进一步显著上调($P<0.05$),而各组之间的 sFRP5 蛋白表达水平的变化差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图 7。

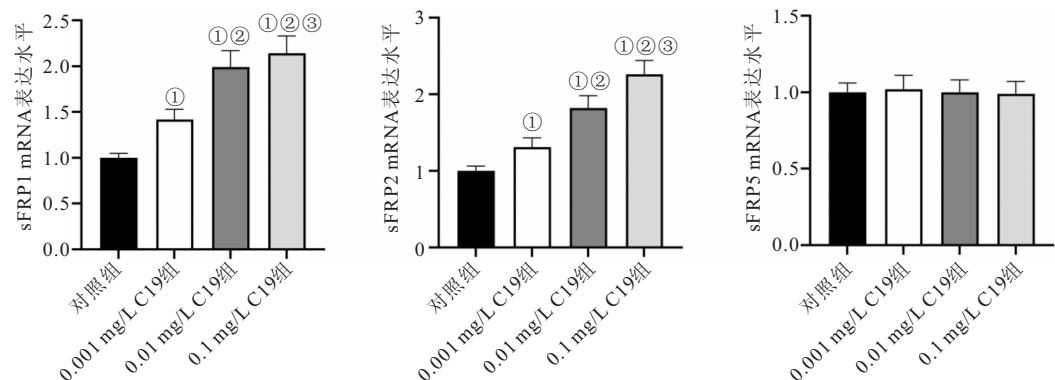


图 6 各组 MFB 内 sFRP1、sFRP2 及 sFRP5 的 mRNA 表达水平比较

Figure 6 Comparison of mRNA expression levels of sFRP1, sFRP2 and sFRP5 in each group of MFB

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与 0.001 mg/L C19 组比较,② $P<0.05$;与 0.01 mg/L C19 组比较,③ $P<0.05$

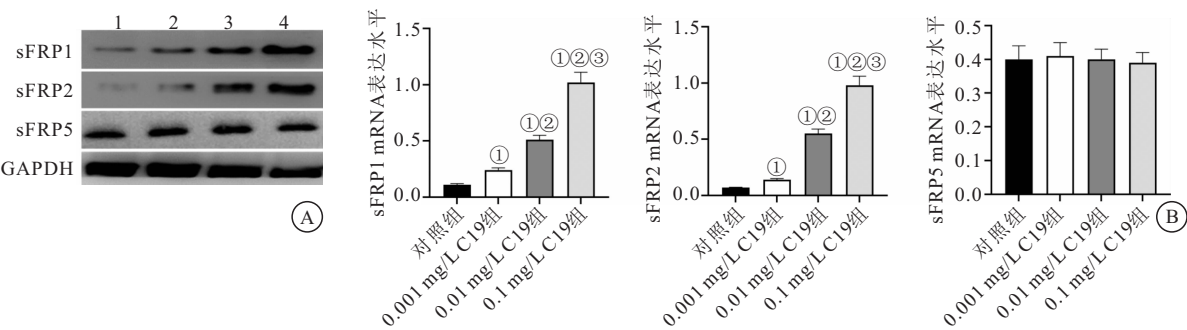


图 7 各组 MFB 内 sFRP1、sFRP2 及 sFRP5 的蛋白表达水平比较

Figure 7 Comparison of the protein expression levels of sFRP1, sFRP2 and sFRP5 in the MFB of each group

注：A. Western blot 检测各组 MFB 内 sFRP1、sFRP2、sFRP5 蛋白条带；B. 各组 MFB 内 sFRP1、sFRP2、sFRP5 蛋白的表达水平。与对照组比较，① $P < 0.05$ ；与 0.001 mg/L C19 组比较，② $P < 0.05$ ；与 0.01 mg/L C19 组比较，③ $P < 0.05$

2.6 CKLF1-C19 多肽对 MFB 迁移与侵袭的影响

Transwell 实验测定结果显示，与对照组比较，经过 0.001、0.01、0.1 mg/L 的 C19 多肽处理的 MFB，迁移细胞数目与侵袭细胞数目均显著减少 ($P < 0.05$)；相较于 0.001 mg/L C19 组比较，0.01 mg/L C19 组与

0.1 mg/L C19 组迁移细胞数目与侵袭细胞数目均显著减少 ($P < 0.05$)；0.1 mg/L C19 组迁移细胞数目与侵袭细胞数目均显著少于 0.01 mg/L C19 组 ($P < 0.05$)。见图 8。

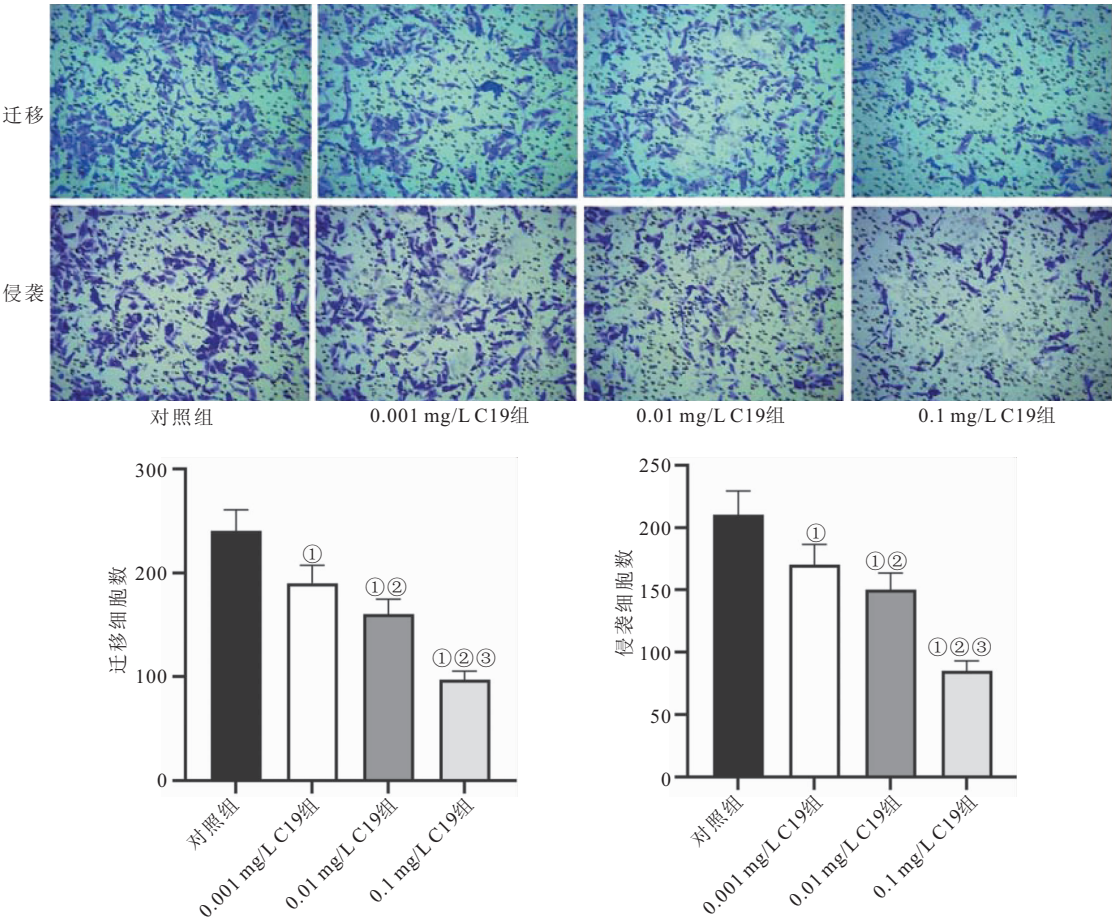


图 8 各组 MFB 迁移与侵袭的数目比较

Figure 8 Comparison of the number of MFB migration and invasion in each group

注：与对照组比较，① $P < 0.05$ ；与 0.001 mg/L C19 组比较，② $P < 0.05$ ；与 0.01 mg/L C19 组比较，③ $P < 0.05$

3 讨论

OSF 是一种慢性口腔疾病，会导致疤痕产生以及

组织纤维化，并具有恶性转化潜力，最终可能引发口腔癌。由于其恶性转化率逐渐增高，该疾病对死亡率

也有显著影响,据统计,OSF 的发生因种族和地区而异,并与饮食、习惯和文化密切相关,南亚和东南亚的 OSF 患病率最高^[9-10]。根据流行病学与相关研究表明,咀嚼槟榔是 OSF 重要的危险因素之一。为了减少 OSF 的发生,早期发现癌前病变、了解病理机制和探究治疗方案均意义重大。本研究通过从 OSF 患者颊部病变黏膜组织分离 MFB,观察到在不同浓度 CKLF1-C19 多肽作用下对细胞增殖活性、收缩、迁移以及侵袭等能力活化相关指标产生了积极影响。

根据口腔黏膜的功能和组织学特征,可分为咀嚼型黏膜、特殊型黏膜和衬里型黏膜。OSF 在这三种类型的黏膜上均发生,并最常发生在颊黏膜、磨牙后区域和软腭部位。在 OSF 病例中,最初口腔黏膜从柔软的粉红色逐渐变为没有弹性并略微发白,随后黏膜明显无弹性、不透明,触诊时呈纸质白色且坚韧,在后期阶段唇部和上腭也会发生一个甚至多个部位病变^[11]。OSF 患者在摄入辛辣食物后,口腔会出现严重烧灼感,此外,患者还会出现张口能力受限和口腔伤口愈合不佳等现象。MFB 广泛存在于瘢痕和纤维化的组织中,除了具备成纤维细胞的分泌功能外,还能够发挥部分肌细胞的收缩功能,然而,在组织修复过程中持续激活 MFB 可导致修复机制异常,分泌富含胶原的纤维性基质,从而促使瘢痕挛缩及纤维化发生。MFB 产生的 α -SMA 能够结合到细胞内应力纤维中,在收缩时产生强大的力,MFB 通过这些纤维控制细胞的形状和运动、ECM 重塑以及组织收缩^[12-14]。本研究通过免疫荧光染色也发现了从 OSF 患者中分离培养的 MFB 中 α -SMA 高表达。此外,还有研究表明 MFB 表现出高水平的细胞因子、趋化因子、生长因子和细胞表面受体的诱导性,这使得细胞具有炎症细胞的某些特性,能够对各种炎症、免疫和机械信号做出反应,并且纤维化组织中的 MFB 还显示出对凋亡的高度抵抗性。结合以上观点,MFB 在 OSF 进展中可能发挥着重要作用。

以往研究^[15]结果显示 C19 在多项疾病中发挥积极作用,例如,C19 通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-8 等介质的产生来减少中性粒细胞对缺血区域的浸润,防止大鼠局灶性脑缺血;C19 在体内和体外抑制血管平滑肌细胞迁移和内膜增生,表明其在动脉粥样硬化和血管成形术后狭窄中的保护作用^[16];C19 通过抑制炎症细胞的浸润和微血管细胞的增殖来预防银屑病^[17]。本研究结果显示,经过 C19 处理后 MFB 的增殖活性下降,细胞迁移与侵袭数目均减少,胶原凝胶收缩面积比率增加,同时,上清中羟脯氨酸的含量减少,由此说明 C19 能够有效抑制 MFB 的活化。此外,

羟脯氨酸是胶原组织代谢的指标,其含量变化反映了细胞上清中可溶性胶原含量的变化,间接说明纤维化的程度。

Wnt 分泌蛋白是糖基化脂质修饰蛋白家族成员,在组织发育、组织稳态、细胞分化和细胞增殖中发挥重要作用,Wnt 信号通路的异常激活与多种疾病的发病机制有关,而 sFRP 家族是 Wnt 信号通路的细胞外调节因子,具有与卷曲受体同源的富含半胱氨酸结构域,可以通过该结构域隔离 Wnt 或与卷曲受体形成无活性的复合物来抑制 Wnt 信号传导^[18-20]。sFRP 含有 sFRP 1~5 五个成员,且均已在哺乳动物中得到鉴定。目前,已证实 sFRP1、sFRP2 与 sFRP5 能够影响肌成纤维细胞的增殖、胶原合成以及成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化过程,与不同组织的纤维化发生相关^[21-23]。鉴于此,本研究在 C19 处理后的 MFB 中检测了这三种 sFRP 的表达变化,结果显示 C19 能够下调 sFRP1 和 sFRP2 的表达,对 sFRP5 的表达未产生显著影响。由此推测,C19 调控 sFRP1 和 sFRP2 表达可能是影响 OSF 发生发展的一个分子机制。

4 结论

肌成纤维细胞在口腔黏膜下纤维性变的发病机制中发挥作用,CKLF1-C19 多肽能够抑制口腔黏膜下纤维性变颊黏膜组织中肌成纤维细胞的增殖活性、迁移及侵袭,降低胶原分泌能力,阻止了肌成纤维细胞的活化,这一作用可能与调控 sFRP1 和 sFRP2 的表达相关,可能为 CKLF1-C19 多肽治疗 OSF 提供了实验依据。

【参考文献】

- [1] SHEN Y W, SHIH Y H, FUH L J, *et al.* Oral submucous fibrosis: a review on biomarkers, pathogenic mechanisms, and treatments[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19):7231.
- [2] 李臻明,周响辉. 口腔黏膜下纤维性变治疗进展[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2021, 29(2):156-160.
- [3] SHETTY S S, SHARMA M, FONSECA F P, *et al.* Signaling pathways promoting epithelial mesenchymal transition in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma[J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2020, 56(1):97-108.
- [4] 朱家奕,卢锐. 口腔黏膜下纤维性变恶变机制的研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2021, 37(10): 875-878.
- [5] XU H, LYU F Y, SONG J Y, *et al.* Research achievements of oral submucous fibrosis: progress and prospect[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:6631856.
- [6] SHAO L, LI T, MO X, *et al.* Expressional and functional studies of CKLF1 during dendritic cell maturation[J]. *Cell Immunol*, 2010, 263(2):188-195.
- [7] 宣成睿,沈晨阳. C19、C27 多肽对主动脉平滑肌细胞的趋化活性[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(8):2002-2003.

- [8] 龙航, 谭亚夏, 邱源, 等. CKLF1-C19 多肽对 TGF- β 诱导原代人肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的干预作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(11):2047-2052.
- [9] CHENG R H, WANG Y P, CHANG J Y, *et al.* Genetic susceptibility and protein expression of extracellular matrix turnover-related genes in oral submucous fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21):8104.
- [10] 郝盛德, 王璐. 浅谈地区口腔肿瘤的预防[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(97):193-194.
- [11] MORE C B, JATTI PATIL D, RAO N R. Medicinal management of oral submucous fibrosis in the past decade-A systematic review[J]. J Oral Biol Craniofac Res, 2020, 10(4):552-568.
- [12] 赵强, 白海, 苏毅, 等. 间充质干细胞与成纤维细胞生物学特性的比较及研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(5):1068-1074.
- [13] 林炜栋, 刘伟伟, 江万里, 等. 增生性瘢痕胶原结节中成纤维细胞生物学行为的研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2017, 38(4):13-16, 30.
- [14] MONTEIRO R, HALLIKERI K, SUDHAKARAN A. PTEN and α -SMA expression and diagnostic role in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma with concomitant oral submucous fibrosis[J]. J Oral Maxillofac Res, 2021, 12(1):3.
- [15] KONG L L, WANG Z Y, HAN N, *et al.* Neutralization of chemokine-like factor 1, a novel C-C chemokine, protects against focal cerebral ischemia by inhibiting neutrophil infiltration via MAPK pathways in rats[J]. J Neuroinflammation, 2014, 20(11):112.
- [16] ZHANG T, QIAO Z, CHEN F, *et al.* Antagonistic effect of C19 on migration of vascular smooth muscle cells and intimal hyperplasia induced by chemokine-like factor 1[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(4):2939-2946.
- [17] ZHENG Y, WANG Y, ZHANG X, *et al.* C19, a C-terminal peptide of CKLF1, decreases inflammation and proliferation of dermal capillaries in psoriasis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):13890.
- [18] CADIGAN KM, NUSSE R. Wnt signaling: a common theme in animal development[J]. Genes Dev, 1997, 11(24):3286-3305.
- [19] 高月, 唐芳, 马武开, 等. Wnt 信号通路中调节因子分泌型卷曲相关蛋白在风湿病中的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2021, 10(10):59-63.
- [20] 张亚龙, 孙佳瑶, 宗斌, 等. 经典 Wnt 信号通路及牙周膜干细胞成骨分化[J]. 口腔医学, 2021, 41(10):936-941.
- [21] 吴彬, 宋启斌, 姚颐, 等. 调控肌成纤维细胞活化的信号通路[J]. 武汉大学学报(医学版), 2021, 42(1):162-166.
- [22] WU Y, LIU X, ZHENG H, *et al.* Multiple roles of sFRP2 in cardiac development and cardiovascular disease[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(5):730-738.
- [23] CHEN M H, LIU J C, LIU Y, *et al.* MicroRNA-199a regulates myocardial fibrosis in rats by targeting SFRP5[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(9):3976-3983.

(收稿日期:2021-09-09;修回日期:2021-12-20;编辑:王小菊)

(上接第 194 页)

- [13] SHIMIZU T, LIAO J K. Rho kinases and cardiac remodeling[J]. Circ J, 2016, 80(7):1491-1498.
- [14] KNIPE R S, PROBST C K, LAGARES D, *et al.* The Rho kinase isoforms ROCK1 and ROCK2 each contribute to the development of experimental pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 58(4):471-481.
- [15] YANG J, RUAN F, ZHENG Z. Ripasudil attenuates lipopolysaccharide (LPS)-mediated apoptosis and inflammation in pulmonary microvascular endothelial cells via ROCK2/eNOS signaling[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3212-3219.
- [16] GAO Z, LI Q, ZHANG Y, *et al.* Ripasudil alleviated the inflammation of RPE cells by targeting the miR-136-5p/ROCK/NLRP3 pathway[J]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1):134.
- [17] HIDA Y, NAKAMURA S, NISHINAKA A, *et al.* Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model[J]. J Pharmacol Sci, 2018, 137(2):129-136.
- [18] FRANCISCO S G, SMITH K M, ARAGONÈS G, *et al.* Dietary patterns, carbohydrates, and age-related eye diseases[J]. Nutrients, 2020, 12(9):2862.
- [19] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, *et al.* ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 3565127.
- [20] FANG C, GU L, SMERIN D, *et al.* The interrelation between reactive oxygen species and autophagy in neurological disorders[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017:8495160.
- [21] CHAN C M, HUANG D Y, SEKAR P, *et al.* Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death[J]. J Biomed Sci, 2019, 26(1):40.
- [22] YANG X, PAN X, ZHAO X, *et al.* Autophagy and age-related eye diseases[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 5763658.
- [23] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. Cell, 2019, 177(7):1682-1699.
- [24] PORTER K, HIRT J, STAMER WD, *et al.* Autophagic dysregulation in glaucomatous trabecular meshwork cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(3):379-385.
- [25] ZHOU J, YAO K, ZHANG Y, *et al.* Thioredoxin binding protein-2 regulates autophagy of human lens epithelial cells under oxidative stress via inhibition of Akt phosphorylation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4856431.
- [26] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, *et al.* Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:5080843.
- [27] 赵瑞苓, 赵梅生. 后发性白内障的生物靶向治疗[J]. 中华实验眼科杂志, 2012(1):91-93.

(收稿日期:2022-04-06;修回日期:2022-05-11;编辑:王小菊)