

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

貝他-連結蛋白在人類正常口腔頰黏膜與口腔黏膜下纖維化
症的表現

研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2321-B-040-006-
執行期間：96年08月01日至97年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：蔡崇弘
共同主持人：張育超
計畫參與人員：此計畫無其他參與人員：

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 97年09月12日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

貝他-連結蛋白在人類正常口腔頰黏膜與口腔黏膜下纖維化症的表現

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC -96- 2321-B-040-006

執行期間： 96年 8月 1日至 97年 7月 31日

計畫主持人：蔡崇弘

共同主持人：張育超

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：

中 華 民 國 97 年 9 月 11 日

英文摘要

Keywords : oral submucous fibrosis 、 areca nut 、 β -catenin 、 buccal mucosal fibroblasts

In Taiwan, there are two million people who have the betel quid chewing habit, which has been suspected to elevate the incidence of oral submucous fibrosis (OSF). OSF, which is regarded as a precancerous condition, is characterized by juxta-epithelial inflammatory reaction followed by fibro-elastic change in the lamina propria and epithelial atrophy. The connective tissue changes are characterized by deposition of dense collagen fibers in the oral mucosa. Most of these studies were focused on the changes in the collagen accumulation in connective tissue layer. To date there has been little research into the roles of β -catenin in normal buccal mucosa as well as OSF. β -catenin expression was significantly higher in OSF specimens and expressed mainly by fibroblasts, endothelial cells, and inflammatory cells. The results demonstrated highly elevated β -catenin expression in normal human BMFs stimulated by arecoline. Taken together, these results suggest that β -catenin expression is significantly upregulated in OSF tissues from areca quid chewers and arecoline may be responsible for the enhanced β -catenin expression in vivo.

中文摘要

關鍵詞：口腔黏膜下纖維化、檳榔、貝他-連結蛋白、頰黏膜造纖維母細胞

嚼食檳榔是導致口腔黏膜下纖維化症(Oral submucous fibrosis, 簡稱 OSF)的主要原因, 臨床上最常發生於頰黏膜, 其症狀為黏膜僵硬, 主要是由於上皮下結締組織中含有過量的膠原蛋白沉積所造成, 而目前研究絕大多數都朝此方面做探討, Wnt/ β -catenin pathway 在 fibrosis 中扮演著非常重要的角色, 鮮少有研究探討 β -catenin 與 OSF 間的關聯性, 吾人認為 β -catenin 在 OSF 病程中所扮演的角色值得進一步探討, 本研究以免疫組織化學染色法發現 β -catenin 在正常口腔黏膜與 OSF 間的差異性, β -catenin 在在正常口腔黏膜與 OSF 有較強烈的表達。以組織培養法, 培養人類在正常口腔黏膜造纖維母細胞加入 arecoline 發現 β -catenin 蛋白表達會增加, 所以 CsA 透過 β -catenin 蛋白表達誘發 OSF。

背景及目的

口腔黏膜下纖維化症(Oral submucous fibrosis, 簡稱 OSF)被視為是一種口腔癌前期病變(Pindborg *et al.* 1984), 臨床上最常發生於頰黏膜, 而黏膜僵硬主要是由於上皮下結締組織中含有過量的膠原蛋白沉積, 並伴隨著固有層或深部結締組織的局部發炎反應與肌肉組織的退行性變化(Canniff *et al.* 1986; Van Wyk *et al.* 1990), 其致病機轉複雜至今尚無定論, 遺傳因子、免疫反應、病毒感染、營養缺乏與致癌因子都被認為與 OSF 形成有關 (Mutri *et al.* 1995; Chiang *et al.* 2002), 從流行病學調查研究顯示, 嚼食檳榔是導致 OSF 的主要原因(Sinor *et al.* 1990; Maher *et al.* 1994)。

β -catenin 是屬於分子量約為 92-97 kDa 的醣蛋白, 其全長為 781 個胺基酸組成, N 端區域由 134 個胺基酸組成, 具有幾個 serine/threonine 殘基 (Ser33/Ser37/Thr41/Ser45), GSK3 β 、CKI 可藉由磷酸化作用, 對 β -catenin 有調控作用。 β -catenin 的中間核心區塊由 550 個胺基酸組成, 包含 12 個 armadillo repeats (ARM repeats), ARM repeats 為 42 個胺基酸組成, repeat 單位之間的胺基酸組成不一定完全相同。C 端區域由 100 個胺基酸組成, 具有 transactivation 活性, 但以 N 端 transactivation 活性較 C 端區域重要(Hsu *et al.*, 1998)。

β -catenin 除了參與細胞粘著與上皮細胞的癌化和癌細胞的轉移有關之外, β -catenin 與纖維化的相關性也慢慢被注意了。在 Chilosi 等人(2003)的研究中, 他們發現 Wnt/ β -catenin

pathway 在 idiopathic pulmonary fibrosis 中會被高度的活化。而 Iwano 及 Neilson(2004)也發現 β -catenin 參與 tubulointerstitial fibrosis。而最近也有學者發現 Wnt-dependent β -catenin 在 renal fibrosis 及 acute lung injury 中扮演著非常重要的角色 (Surendran *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2006)，而最近 Sato(2006)更發現在 hypertrophic scars 與 keloids 細胞中，由 TGF- β 所誘導的纖維化過程，Wnt/ β -catenin pathway 會大量的活化。由上述的文獻得知， β -catenin 在組織纖維化的過程扮演一個很重要的角色。

OSF 的分子致病機轉迄今仍有待厘清，至今亦無任何文獻探討 β -catenin 在 OSF 組織上的表達，及其調控的機轉。本研究探討 β -catenin 在正常口腔黏膜與 OSF 組織間的差異性。

方法

病理切片收集與製備

本研究收集中山醫學大學牙科部診斷為 OSF 患者的組織，組織切片檢查經病理科確認為 OSF 福馬林固定之石臘包埋標本 20 例，另收集正常口腔頰黏膜組織標本 10 例作為對照組，以進行研究分析。

免疫組織化學染色

福馬林固定之石臘包埋標本，用切片機切成 5 μ m 厚，將標本貼附在膠質覆蓋之玻片上，依 streptavidin-biotin system for immunohistological staining 法，先將切片脫蠟及復水，加入 methanolic-H₂O₂ solution 阻斷組織本身之內生性過氧化氫酵素，再加入 serum blocking solution 阻斷組織內非特異性抗原，滴加抗 β -catenin 相關因子之一級抗體作用，滴加 biotinylated goat antimouse secondary antibody 與一級抗體結合，加入 streptavidin-peroxidase conjugate 與次級抗體結合，以 DAB 呈色，最後以去離子水洗淨、封片，置於光學顯微鏡下觀察，紀錄分析比較 β -catenin 在人類正常頰黏膜及口腔黏膜下纖維化組織病理的分佈情形。

細胞培養

篩選無嚼食檳榔習慣之病人，在病人同意下從拔牙過程中，切取外觀健康頰黏膜組織；另外從 OSF 病人做病理組織檢查時，取一部分組織做細胞培養。將取下之組織切成碎片後，置入含有 10% 胎牛血清及 1% PSN (penicillin, streptomycin, neomycin, GIBCO; Grand Island, NY, USA) 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO; Grand Island, NY, USA) 培養液中，置入 37°C 自動恆溫培養箱中培養。約在 5-7 天後可見到造纖維母細胞從組織塊中長出來，待細胞長滿後再做繼代培養。而實驗所用之細胞代數介於第 3 代到第 10 代間。

檳榔素對 β -catenin 的調控

取 2×10^4 個人類正常頰黏膜纖維母細胞懸浮液，植入直徑 60 mm 之塑膠培養皿中，置入 37°C 之恆溫培養箱中培養 24 小時，將舊培養液吸去，以 PBS 洗滌兩次後，重新加入培養液培養及加入 arecoline；另外製備 protein 以 western blot 方法比較在 arecoline 作用下正常頰黏膜造纖維母細胞是否會增加 β -catenin 分泌量。

結果

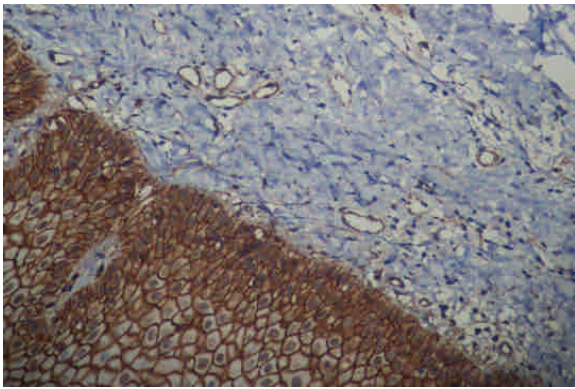


Fig. 1 Very faint immunoreactivity of β -catenin was observed in normal human buccal mucosa and almost totally limited to the epithelium and endothelial cells. (200x).

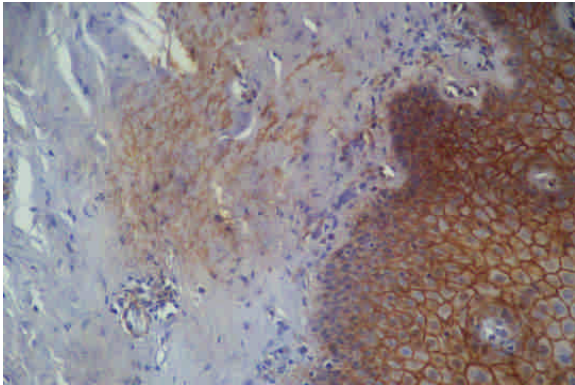
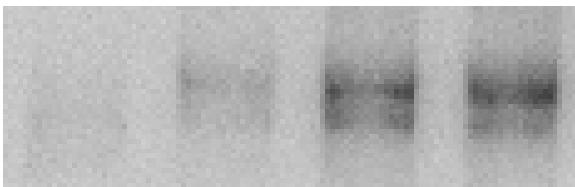


Fig. 2 β -catenin was expressed in the cytoplasm of epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells and inflammatory cells. (200x)



0 10 40 80 Arecoline ($\mu\text{g/ml}$)

Fig. 3 β -catenin was found to be increased by arecoline in a dose-dependent manner ($p < 0.05$).

参考文献

- Chilosi M, Poletti V, Zamo A, Lestani M, Montagna L, Piccoli P, Pedron S, Bertaso M, Scarpa A, Murer B, Cancellieri A, Maestro R, Semenzato G, Doglioni C (2003) Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 162: 1495-1502.
- Douglas IS, Diaz del Valle F, Winn RA, Voelkel NF (2006) Beta-catenin in the fibroproliferative response to acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 274-285.
- Harvey W, Scutt A, Meghji S, Canniff JP (1986). Stimulation of human buccal mucosa fibroblasts *in vitro* by betel-nut alkaloids. *Arch Oral Biol* 31: 45-49.
- Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R (1998) Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 18: 4807-4818.
- Iwano M, Neilson EG (2004) Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol*

Hypertens 13: 279-284.

- Maher R, Lee AJ, Warnakulasuriya KKAS, Lewis JA, Johnson NW (1994). Role of areca nut in the causation of oral submucous fibrosis: a case-control study in Pakistan. *J Oral Pathol Med* 23: 65-69.
- Mutri PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS (1995). Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. *J Oral Pathol Med* 24: 145-152.
- Otero K, Martínez F, Beltrán A, González D, Herrera B, Quintero G, Delgado R, Rojas A (2001) Albumin-derived advanced glycation end-products trigger the disruption of the vascular endothelial cadherin complex in cultured human and murine endothelial cells. *Biochem J* 359; 567-574.
- Pindborg JJ, Poulsen HE, Zachariah J (1967). Oral epithelial changes in thirty Indians with oral cancer and submucous fibrosis. *Cancer* 20: 1141-1146.
- Pindborg JJ, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Mehta FS (1984). Oral submucous fibrosis as a precancerous condition. *Scand J Dent Res* 92: 224-229.
- Sirsat SM, Khanolkar VR (1957). A histochemical and electron microscope study of submucous fibrosis of the plate. *J Pathol Bact* 73: 439-442.
- Surendran K, Schiavi S, Hruska KA (2005) Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 16: 2373-2384.