

Evaluation of Immunohistochemical Expression of BCL-2 in Oral Lichen Planus

Seyed Hossein Tabatabaei¹,
Laleh Maleki²,
Najmeh Jafari³,
Naser Hosseinzadeh⁴

¹ Associate Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Social Determinants of Oral Health Research Center, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

² Assistant Professor, Dental Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁴ *Dentist*

(Received June 26, 2016, Accepted June 10, 2017)

Abstract

Background and purpose: BCL-2 marker has an important role in mechanisms of apoptosis and dysplastic changes, malignancies, and the pathogenicity mechanisms in oral lichen planus (OLP). Current study aimed at investigating the expression levels of BCL-2 in epithelial and connective tissue adjacent in oral lichen planus.

Materials and methods: In this case-control study, investigation of BCL-2 expression was performed in paraffin embedded tissue blocks of 20 cases of OLP (cases) and 20 cases of irritation fibroma (control) obtained from the Archives of Pathology Department in Dental School, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. Data was analyzed using SPSS V17 applying Chi-Square test and Fisher's exact test. The results were considered significant for a significance level of $\alpha=0.05$.

Results: There was no statistically significant difference in BCL-2 expression in the basal and parabasal layers of the epithelium between the two groups ($P>0.05$), but the difference was statistically significant for the connective tissue ($P=0.0001$).

Conclusion: This study showed that BCL-2 protein may not play an important role in the process of apoptosis in OLP, so, further investigations on other proteins in this process is recommended.

Keywords: oral lichen planus, BCL-2, apoptosis

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(153): 129 - 134 (Persian).

بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بیان مارکر BCL-2 در لیکن پلان دهانی

سیدحسین طباطبایی¹

لاله ملکی²

نجمه جعفری³

ناصرحسین زاده⁴

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به نقش نشان گر BCL-2 در مکانیسم آپوپتوز و ایجاد تغییرات دیسپلاستیک، بدخیمی ها و هم چنین مکانیسم ایجاد بیماری لیکن پلان مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان بیان آن در اپی تلیوم و بافت هم بند مجاور آن در لیکن پلان دهانی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مورد - شاهدی، بررسی ایمونوهیستوشیمی نشانگر BCL-2 بر روی بلوک های پارافینه 20 نمونه لیکن پلان دهانی (مورد) و 20 نمونه فیبروم تحریکی (شاهد) موجود در آرشیو پاتولوژی دانشکده دندانپزشکی شهید صدوقی یزد صورت گرفت. داده ها توسط نرم افزار SPSS 17 و آزمون های Chi-Square و Fisher's exact test تجزیه و تحلیل گردید و نتایج در سطح $\alpha=0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها: بیان BC-L2 در لایه بازال و پارابازال اپی تلیوم بین دو گروه بیمار و غیر بیمار اختلاف آماری معنی داری نشان نداد ($P>0/05$) ولی در بافت هم بند، اختلاف آماری معنی داریود ($P=0/0001$).

استنتاج: براساس نتایج این مطالعه، احتمالاً پروتئین BCL-2 نقش قابل توجهی در فرآیند آپوپتوزیس دخیل در ایجاد لیکن پلان دهانی ندارد و ارزیابی سایر پروتئین های حاضر در این فرآیند توصیه می شود.

واژه های کلیدی: لیکن پلان دهانی، BCL-2، آپوپتوز

مقدمه

ایجاد این ضایعات است. این بیماری در 1 تا 2 درصد افراد جامعه دیده می شود، هم چنین در 75 درصد کسانی که به OLP پوستی مبتلا می باشند، لیکن پلان دهانی نیز رخ می دهد (1). این بیماری به طور متوسط در دهه 5

لیکن پلان دهانی (OLP: Oral Lichen Planus) یک بیماری التهابی مزمن است که در آن مخاط دهان درگیر می باشد. اتیولوژی دقیق این بیماری مشخص نیست ولی معلوم شده است که سیستم ایمنی فرد مسئول

Email: malekilaleh@yahoo.com

مؤلف مسئول: لاله ملکی - اصفهان، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

1. دانشیار، گروه آسیب شناسی فک، دهان و صورت، مرکز تحقیقات عوامل موثر بر سلامت دهان و دندان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

2. استادیار، مرکز تحقیقات دندانپزشکی، گروه آسیب شناسی فک، دهان و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

3. استادیار، گروه آسیب شناسی فک، دهان و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

4. دندانپزشک

تاریخ دریافت: 1395/4/6 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/10/20 تاریخ تصویب: 1396/3/20

زندگی و اغلب در زنان دیده می‌شود (2). در این بیماری لنفوسیت‌ها به کراتینوسیت‌های لایه بازال حمله کرده و باعث القای آپوپتوز در آن‌ها می‌شوند (3).

B cell lymphoma-2 (BCL-2) یکی از اعضای آنتی آپوپتوتیک خانواده BCL-2 است که از طریق اتصال مستقیم با غشای خارجی میتوکندری و مهار اعضای پروآپوپتوتیک خانواده BCL-2 باعث حفظ تمامیت غشای خارجی میتوکندری و مهار آپوپتوز می‌شود (4). بیان این پروتئین در لایه بازال در مقایسه با لایه خاردار سبب می‌شود که نقش آن به عنوان عامل دخیل در روند آپوپتوز مورد بحث باشد (5).

لذا با توجه به نقش این نشانگر در مکانیسم آپوپتوز و ایجاد تغییرات دیسپلاستیک، بدخیمی و هم‌چنین مکانیسم ایجاد لیکن پلان به بررسی میزان بیان آن در لیکن پلان دهانی پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد-شاهدی، نمونه‌های مورد بررسی شامل 40 بلوک پارافینی با تشخیص قطعی هیستوپاتولوژیک OLP رتیکولاروفیبروم تحریکی موجود در آرشو بخش آسیب شناسی دانشکده دندانپزشکی شهید صدوقی یزد بود.

جهت انجام رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی از بلوک‌های پارافینی موجود، به وسیله دستگاه میکروتوم برش‌های 5 میکرونی تهیه گردید. پس از آن پارافین زدایی و آب دهی توسط قرار دادن نمونه‌ها در گزین (100 درصد) و الکل درجه‌بندی شده انجام گرفت. آنتی ژن‌ها توسط قرار دادن اسلایدها در بافر TBS درون دستگاه مایکروویو بازیابی گردید. با آنتی‌بادی‌های اولیه (DAKO, Denmark, diluted at 1:50) BCL-2 به مدت 1 ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. نمونه‌ها در ظرف حاوی TBS با $\text{pH} = 6/7$ به

مدت 5 دقیقه شسته شده، به مدت 1 ساعت درون (Envision tube شرکت DAKO) قرار گرفته، در بافر TBS شسته شده و پس از قرار دادن DAB روی آن‌ها با آب جاری شستشو داده شدند. پس از انجام رنگ‌آمیزی افتراقی مانت گردیدند و از بافت لوزه به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

درصد سلول‌های رنگ گرفته در لایه‌های بازال، سوپرا بازال (3) الی 4 طبقه از کراتینوسیت‌های بالاتر از لایه بازال و بافت هم‌بند مجاور اپی‌تلیوم به طور جداگانه محاسبه گردید. شدت رنگ‌آمیزی مد نظر نبود و منظور از سلول مثبت سلولی است که سیتوپلاسم قهوه‌ای دارد.

1000 عدد سلول شمارش شده در 10 فیلد تصادفی با بزرگ‌نمایی 400 تعیین و به صورت Labeling Index: LI بیان شد. شاخص مثبت و منفی نتایج در این مطالعه LI 5 = %بود (LI 5 >: %منفی، LI 5-25 = %ضعیف، LI 26-50 = %متوسط، LI 50 <: %شدید).

داده‌ها پس از جمع‌آوری در نرم‌افزار SPSS 17 وارد شده و با استفاده از آمار توصیفی (فراوانی و درصد) و آزمون‌های آماری Fisher exact test و Chi-Square مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی داری آماری 0/05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها و بحث

گروه مورد شامل 6 مرد و 14 زن با میانگین سنی $43/20 \pm 13/10$ و گروه شاهد شامل 6 مرد و 14 زن با میانگین سنی $37/95 \pm 13/12$ سال بودند.

نتایج آزمون آماری نشان داد که بروز BCL-2 در بافت هم‌بندی مجاور اپیتلیوم بین دو گروه تفاوت معنی‌داری دارد (جدول شماره 1). ولی در لایه بازال و

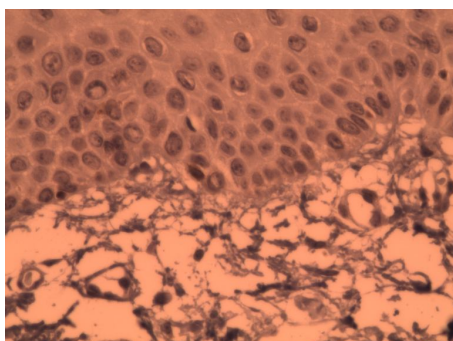
پارابازال بین دو گروه تفاوت معنی‌داری دیده نشد
(جدول شماره 2 و 3) (تصویر شماره 1).

جدول شماره 1: تعیین و مقایسه توزیع فراوانی بیان مارکر

BCL-2 در بافت هم‌بندی مجاور اپیتلیوم

رنگ پذیری	منفی	ضعیف	متوسط	شدید	جمع کل
گروه	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
شاهد	14(70)	5(25)	1(5)	0(0)	20(100)
مورد	0(0)	2(10)	7(35)	11(55)	20(100)

$$P=0/0001$$



تصویر شماره 2: رنگ‌پذیری منفی BCL-2 در لایه بازال، پارابازال و بافت هم‌بندی فیروم تحریکی (×400)

جدول شماره 2: تعیین و مقایسه توزیع فراوانی بیان مارکر

BCL-2 در لایه بازال

رنگ پذیری	منفی	ضعیف	متوسط	جمع کل
گروه	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
شاهد	15(75)	4(20)	1(5)	20(100)
مورد	11(55)	7(35)	2(10)	20(100)

$$P=0/413$$



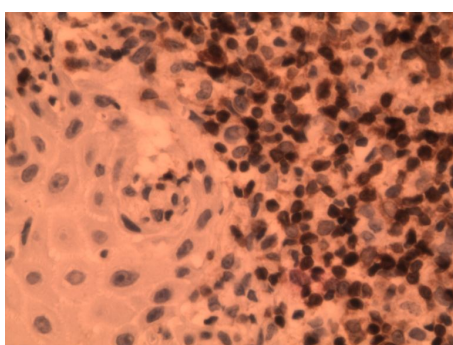
تصویر شماره 3: رنگ‌پذیری شدید BCL-2 در بافت هم‌بندی مجاور اپی تلیوم لیکن پلان (×100)

جدول شماره 3: تعیین و مقایسه توزیع فراوانی بیان مارکر

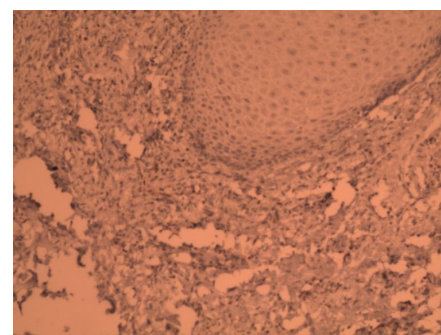
BCL-2 در لایه پارابازال

رنگ پذیری	منفی	ضعیف	جمع کل
گروه	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
شاهد	20(100)	0(0)	20(100)
مورد	19(95)	1(5)	20(100)

$$P=1/000$$



تصویر شماره 4: رنگ‌پذیری شدید BCL-2 در بافت هم‌بندی مجاور اپی تلیوم لیکن پلان (×400)



تصویر شماره 1: رنگ‌پذیری منفی BCL-2 در لایه بازال، پارابازال و بافت هم‌بندی فیروم تحریکی (×100)

در مطالعات مختلف، میزان آپوپتوز در OLP با روش‌هایی چون TUNEL assay، بیان caspase 3 و استفاده از میکروسکوپ نوری (7، 3) مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج بسیاری از این مطالعات نشان داده

هم‌بند زیرین متوسط یا شدید بود، وجود اختلاف معنی‌دار بین دو گروه مورد و شاهد در رنگ‌آمیزی لنفوسیت‌های ناحیه بافت هم‌بند زیر اپی‌تلیوم در مطالعه حاضر می‌تواند بیان‌گر نقش ضد آپوپتوزیس BCL-2 در جهت بقای سلول‌های التهابی و مزمن شدن ضایعه باشد. در مطالعه Sklavounou و همکاران (11)، کراتینوسیت‌ها هیچ واکنشی با BCL-2 Anti نشان ندادند. اما بیان این پروتئین در نوار لنفوسیتیک انفیلتیه مجاور ناحیه بازال مشهود بود.

در بررسی Tanda و همکاران (5) نیز که بیان BCL-2 در OLP با لوکوپلاکیا مقایسه شده بود، میزان بیان آن کم گزارش گردید. هم‌چنین به گزارش Abdel-Latif و همکاران ممکن است علی‌رغم اهمیت BCL-2 در فرایند آپوپتوزیس، این پروتئین در ایجاد OLP، اهمیت زیادی نداشته باشد و یا شاید فعالیت آن به وسیله سایر پروتئین‌های تنظیم‌کننده آپوپتوزیس محدود شود (4). بررسی سایر پروتئین‌های دخیل در این فرایند پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکترای دندانپزشکی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد که با حمایت آن مرکز و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

که علی‌رغم بالاتر بودن میزان آپوپتوز نسبت به مخاط نرمال، اصولاً میزان آپوپتوز در OLP پایین است (6، 8). برخی محققین گزارش نموده‌اند که نشانگر BCL-2 در کاهش آپوپتوز در ارتشاح التهابی بر خلاف اپیتلیوم در OLP نقش موثری دارد (9).

در مطالعه حاضر، مشابه اکثر مطالعات، سن بیش‌تر بیماران بالای 40 سال (دهه‌های 5 و 6) بوده است (10). در این مطالعه، 70 درصد مبتلایان را زنان تشکیل می‌دادند. در سایر مطالعات نیز شیوع این بیماری در زنان بیش‌تر گزارش شده است (۱۱، ۱۰).

در این مطالعه در 55 درصد موارد رنگ‌پذیری در لایه بازال گروه مورد مشاهده نشد، در 35 درصد موارد ضعیف و تنها در 10 درصد موارد متوسط بود. در حالی که در مطالعه تقوی و همکاران (9)، Gonzalez-Moles و همکاران (8) و Bascones و همکاران (6) شدت رنگ‌پذیری لایه بازال به ترتیب در 43/1 و 27/۸۲، ۵/2 درصد موارد متوسط یا شدید گزارش شده است، که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد.

طی تحقیقی که Dekker و همکاران (1) انجام دادند، مارکر BCL-2 تنها در یک نمونه از بین 11 نمونه OLP در لایه بازال به میزان کم، بیان شده بود. این وضعیت تقریباً مشابه نتایج مطالعه ما است که در آن اکثر نمونه‌ها (75 درصد) رنگ نگرفته بودند. هم‌چنین Dekker و همکاران (1) بیان BCL-2 در ملانوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها در نمونه‌های بافتی لیکن پلان دهانی را مثبت و در کراتینوسیت‌ها متوسط گزارش نموده‌اند. در تحقیق حاضر در 95 درصد موارد، شدت رنگ‌آمیزی در بافت

References

1. Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, MacPhail LA, Bloom CY, Regezi JA. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. J Oral Pathol Med 1997;26(4):170-175.
2. Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. J Oral Sci 2009;51(1):117-121.

3. Bascones-Ilundain C, Gonzalez-Moles MA, Campo-Trapero J, Gil-Montoya JA, Esparza-Gomez GC, Cano-Sanchez J, et al. No differences in caspase-3 and Bax expression in atrophic-erosive vs. reticular oral lichen planus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* .2008;22(2):204-212.
4. Abdel-Latif AM, Abuel-Ela HA, El-Shourbagy SH. Increased caspase-3 and altered expression of apoptosis-associated proteins, Bcl-2 and Bax in lichen planus. *Clin Exp Dermatol* 2009;34(3):390-395.
5. Tanda N, Mori S, Saito K, Ikawa K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical studies. *J Oral Pathol Med* .2000;29(8):385-393.
6. Bascones C, Gonzalez-Moles MA, Esparza G, Bravo M, Acevedo A, Gil-Montoya JA, et al. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Arch Oral Biol* 2005;50(10):873-881.
7. Bloor BK, Malik FK, Odell EW, Morgan PR. Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88(2):187-195.
8. Gonzalez-Moles MA, Bascones-Ilundain C, Gil Montoya JA, Ruiz-Avila I, Delgado-Rodriguez M, Bascones-Martinez A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol*. 2006;51(12):1093-1103.
9. Taghavi N, Mahdavi N, Shahla M. Correlation of Bcl-2 and COX-2 Expression in Oral Lichen Planus. *The Journal of Islamic Dental Association of IRAN (JIDA)* . 2014; 26 (1) :51-58.(persian)
10. Bagan-Sebastian JV, Milian-Masanet MA, Penarrocha-Diago M, Jimenez Y. A clinical study of 205 patients with oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Surg* .1992;50(2):116-118.
11. Sklavounou A, Chrysomali E, Scorilas A, Karameris A. TNF-alpha expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus: a comparative immunohistochemical evaluation. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(8):370-375.