

大麻素受体2抑制对口腔黏膜天疱疮棘层松解影响的研究

刘慧娟¹ 宋鹏² 侯亚丽² 霍晓³ 秘利进⁴ 刘春艳⁵

1. 河北医科大学口腔医(学)院重点实验室, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔健康技术创新中心, 石家庄050017;
2. 河北医科大学口腔医(学)院病理科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔健康技术创新中心, 石家庄050017;
3. 河北医科大学口腔医(学)院黏膜科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔健康技术创新中心, 石家庄050017;
4. 河北医科大学口腔医(学)院检验科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔健康技术创新中心, 石家庄050017;
5. 河北医科大学口腔医(学)院正畸科, 河北省口腔医学重点实验室, 河北省口腔健康技术创新中心, 石家庄050017

[摘要] 目的 利用大麻素受体2 (CB2) 抑制剂和天疱疮血清共培养HaCaT细胞, 探讨CB2抑制对HaCaT细胞桥粒黏蛋白3 (DSG3) 的影响。方法 采用免疫组织化学染色观察天疱疮患者和正常受试者黏膜中CB2受体表达, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测天疱疮患者和正常受试者血清中CB2含量, 对天疱疮患者血清CB2浓度与DSG表达进行相关性分析。CCK-8检测不同浓度AM630对HaCaT细胞的抑制作用, 计算AM630对HaCaT细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 并作为抑制剂实验浓度。将正常受试者、天疱疮患者血清分别与完全培养液1:1比例共培养HaCaT细胞作为阴性对照组和天疱疮组, 完全培养液培养的HaCaT细胞作为对照组, 天疱疮组培养液稀释AM630至IC₅₀浓度后培养的HaCaT细胞作为AM630组。实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR)、蛋白印迹 (Western blot) 检测4组CB2、DSG3、 β -catenin基因和蛋白的表达。细胞解离实验观察AM630对HaCaT细胞黏附功能的影响。结果 免疫组织化学染色显示天疱疮黏膜与正常黏膜组织中CB2表达差异有统计学意义 ($P < 0.0001$), CB1表达差异无统计学意义。ELISA检测表明, 正常受试者与天疱疮患者血清CB2的表达差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。天疱疮患者血清CB2表达与DSG3表达呈正相关 ($r=0.831, P=0.003$)。CCK-8检测表明, AM630对HaCaT细胞的半数抑制浓度IC₅₀为0.55 $\mu\text{mol/L}$ 。实时荧光定量PCR、Western blot结果显示, 天疱疮组CB2、DSG3表达升高, β -catenin表达降低, 与AM630组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 口腔黏膜天疱疮中CB2高表达, AM630抑制天疱疮引起的CB2、DSG3高表达及 β -catenin低表达, 可为天疱疮治疗提供新的治疗靶点和思路。

[关键词] 大麻素受体; 自身免疫性疾病; 天疱疮; 桥粒黏蛋白; HaCaT细胞

[中图分类号] R781.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2025182



本文链接 开放科学标识码

Cannabinoid receptor 2 inhibition on acantholysis in oral mucosal pemphigus

Liu Huijuan¹, Song Peng², Hou Yali², Huo Xiao³, Mi Lijin⁴, Liu Chunyan⁵

1. Key Laboratory of Stomatology, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University & Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Technology Innovation Center of Oral Health, Shijiazhuang 050017, China; 2.

[收稿日期] 2025-04-24; **[修回日期]** 2025-07-14

[基金项目] 河北省医学科学研究课题 (20241093)

[第一作者] 刘慧娟, 副主任医师, 博士, E-mail: huijuan_liu_001@hebmu.edu.cn

[通信作者] 刘春艳, 教授, 博士, E-mail: chunyanliu@hebmu.edu.cn

Dept. of Pathology, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University & Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Technology Innovation Center of Oral Health, Shijiazhuang 050017, China; 3. Dept. of Oral Medicine, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University & Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Technology Innovation Center of Oral Health, Shijiazhuang 050017, China; 4. Dept. of Clinical Laboratory, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University & Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Technology Innovation Center of Oral Health, Shijiazhuang 050017, China; 5. Dept. of Orthodontics, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University & Hebei Key Laboratory of Stomatology, Hebei Technology Innovation Center of Oral Health, Shijiazhuang 050017, China

Supported by: Medical Science Research Project of Hebei (20241093)

Correspondence: Liu Chunyan, E-mail: chunyanliu@hebmh.edu.cn

[Abstract] Objective The aim of this study is to determine the effect of cannabinoid receptor (CB) 2 inhibitor on desmoglein 3 (DSG3) expression in HaCaT cells co-cultured with pemphigus serum. **Methods** Immunohistochemical staining was used to compare CB expression in pemphigus patients and normal individuals. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to quantify the concentration of CB2 in the serum of pemphigus patients and normal individuals. A correlation analysis was performed to examine the relationship between the serum CB2 and DSG of pemphigus patients. The CCK-8 assay was used to evaluate the inhibitory effect of AM630 on HaCaT cells, and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was utilized to determine the experimental concentration. Serum from normal individuals (negative control group) and pemphigus patients (pemphigus group) was co-cultured with HaCaT cells at a 1 : 1 ratio. HaCaT cells cultured in complete medium were used as the control group. HaCaT cells in the pemphigus group treated with AM630 were employed as the AM630 group. Real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot were conducted to assess the expression levels of CB2, DSG3, and β -catenin. Cell dissociation experiments were conducted to evaluate the effect of AM630 on the adhesion of HaCaT cells. **Results** Immunohistochemistry revealed significant differences in CB2 expression between pemphigus and normal mucosa ($P < 0.000 1$), but no difference was found in CB1 expression. ELISA analysis revealed a statistically significant difference in the expression levels of CB2 in the serum between normal individuals and pemphigus patients ($P < 0.001$). The expression of CB2 in the serum of pemphigus patients exhibited a significant positive correlation with that of DSG3 ($r = 0.831, P = 0.003$). The CCK-8 assay indicated that the IC_{50} of AM630 on HaCaT cells was $0.55 \mu\text{mol/L}$. Real-time PCR and Western blot showed that the expression levels of CB2 and DSG3 increased in the pemphigus group, while the expression level of β -catenin decreased compared with that in the AM630 groups ($P < 0.05$). **Conclusion** CB2 is highly expressed in oral mucosal pemphigus. AM630 inhibits overexpression of CB2 and DSG3 and underexpression of β -catenin levels, which can provide new therapeutic targets for pemphigus.

[Key words] cannabinoid receptor; autoimmune diseases; pemphigus; desmoglein; HaCaT cell

寻常型天疱疮作为累及皮肤黏膜的重症自身免疫性疾病，其核心发病机制在于桥粒黏蛋白（desmoglein, DSG）3自身抗体介导的棘层细胞黏附破坏，导致口腔黏膜为主的病理性水疱形成^[1]。尽管糖皮质激素联合免疫仍是临床主流治疗方案^[2]，但长期大剂量激素应用引发的代谢综合征及细胞毒性等副作用，仍是天疱疮治疗面临的严峻挑战^[3]。这一现状迫切要求研究者从免疫调控的分子机制中发掘更具靶向性的干预策略。

近年来，大麻素受体（cannabinoid receptor, CB）2因其独特的免疫调节特性备受关注。区别于广泛分布于中枢神经系统的CB1，CB2特异性

高表达于免疫细胞，可参与多种自身免疫性疾病的病理进程^[4]。Sarsembayeva等^[5]研究发现CB2是小细胞肺癌免疫治疗的潜在靶点。Garofano等^[6]研究发现高浓度的大麻二酚可有效抑制骨髓瘤和霍奇金淋巴瘤细胞的增殖。这些研究表明CB2可能调节免疫应答影响自身抗体的产生，这正是天疱疮的核心发病环节。然而，CB2在天疱疮中的表达模式及其对DSG3抗体介导的细胞解离作用的影响机制仍未知。

基于此，本研究拟通过检测口腔黏膜天疱疮患者组织和血清CB2的表达，揭示其与疾病活动的相关性；根据参考文献^[7]建立天疱疮疾病的细胞

模型,采用选择性CB2抑制剂AM630进行干预,评估其对DSG3抗体诱导的细胞间黏附破坏的逆转效应。本研究不仅为阐明CB2在天疱疮中的免疫调控机制提供直接证据,更重要的是为开发基于CB2靶点的精准治疗策略奠定理论基础,为天疱疮治疗开辟新路径。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

CB1、CB2抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司),DSG3抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司), β -catenin抗体(杭州华安生物技术有限公司),DAB显色试剂盒、PV-6000通用二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),引物[生工生物工程(上海)股份有限公司],反转录试剂盒(Thermo Fisher公司,美国),通用型高灵敏度染料法定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),RIPA裂解液(Invent Biotechnologies公司,美国),BCA蛋白定量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),ACE蛋白预制胶(南京艾思易生物科技有限公司),山羊抗鼠、山羊抗兔荧光二抗(ROCKLAND公司,美国),人永生表皮细胞(human immortalized keratinocyte cell, HaCaT)(上海中乔新舟生物科技有限公司),胎牛血清、DMEM培养基(上海逍鹏生物科技有限公司),AM630(Cayman Chemical公司,美国),ELISA检测试剂盒(上海爱萌优宁生物技术有限公司),酶标仪(PowerWave XS2, BioTek公司,美国),显微镜(BX63, Olympus公司,日本),ABI QuantStudio 5实时荧光定量PCR仪(Termo Fisher Scientific公司,美国),Odyssey双色红外荧光成像系统(LI-COR公司,美国)。

1.2 样本来源

收集10名天疱疮患者及10名正常受试者(智齿拔除患者)的部分黏膜组织、血清样本。本实验经河北医科大学口腔医院伦理委员会审查(伦理审查号[2024]012)。所有样本获取均取得受试者同意,并签署知情同意书。

天疱疮患者的纳入标准:1)因口腔黏膜疾病首次就诊且未使用任何药物治疗;2)经病理诊断为黏膜天疱疮;3)酶联免疫吸附实验检测血清DSG3抗体阳性;4)血常规、血糖、凝血功能、肝功能无明显异常。排除标准:1)合并其他自

身免疫性疾病;2)合并全身系统性疾病(如血液病、传染病等);3)颈部、胸部、腹部CT或B超检查有占位性病变。

正常受试者的纳入标准:1)需拔除智齿;2)身体健康,无全身系统性疾病;3)血常规、血糖、凝血功能、肝功能无明显异常;4)无口腔黏膜疾病。

1.3 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)和免疫组织化学染色

将天疱疮患者黏膜和正常受试者牙龈组织进行HE和免疫组织化学染色。

HE染色:切片、脱蜡水化后,苏木精染色3 min,伊红染色30 s,梯度乙醇脱水,透明,树脂封片,显微镜观察,拍照。

免疫组织化学染色:石蜡切片、脱蜡水化后,柠檬酸钠缓冲液90 °C热修复15 min。放置室温后,滴加3%内源性过氧化物酶阻断剂,10 min后磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗。滴加CB1和CB2抗体(浓度为1:100),4 °C孵育过夜,PBS冲洗,滴加酶标山羊抗小鼠/兔IgG聚合物,室温孵育20 min,PBS冲洗。加入新鲜配制的DAB显色液显色5~8 min,苏木素复染细胞核,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树脂封片。显微镜观察,2名医师对免疫组织化学染色强度和阳性细胞率进行评分,取均值。染色强度评分:阴性0分,弱阳性1分,中等阳性2分,强阳性3分。阳性细胞率评分:<5%,0分;5%~25%,1分;26%~50%,2分;51%~75%,3分;>75%,4分。染色强度及阳性细胞率分数之和为免疫组织化学染色得分。

1.4 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中CB2表达

将血清样本4 °C、4 000 r/min离心10 min,取上清液3 mL于1.5 mL EP管内,保存于-20 °C低温冰箱备用。按照ELISA检测试剂盒说明书将CB2标准品和血清样本各50 μ L进行加样,37 °C孵育50 min;加入生物素抗体稀释液100 μ L,37 °C孵育50 min;加入SABC复合工作液100 μ L,37 °C孵育30 min;加入TMB显色液100 μ L,37 °C避光孵育10~20 min,加入反应终止液,450 nm处检测吸光值。

1.5 天疱疮患者血清CB2浓度与其临床检测指标DSG相关性分析

检测天疱疮患者血清中的DSG3和DSG1表达,与ELISA测得的天疱疮患者血清CB2浓度进

行 Pearson 相关性分析。

1.6 HaCaT 培养

HaCaT 细胞置于完全培养液（含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗的高糖 DMEM）中，37 °C、5%CO₂ 饱和湿度培养箱常规培养。当细胞培养生长至对数期时，消化传代，用于后续实验。

1.7 CCK-8 检测不同浓度 AM630 对 HaCaT 细胞增殖的影响

将对数期生长的 HaCaT 细胞胰酶消化后，以 2×10⁴ 个/孔密度铺于 96 孔细胞培养板中，每组设 3 个副孔。细胞贴壁后，采用完全培养液将 AM630 按照 0、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5 μmol/L 的浓度进行稀释，培养 HaCaT 细胞。细胞贴壁后（0 h），AM630 不同浓度培养细胞 1、2、3 d，加入 CCK-8 溶液 10 μL，37 °C 孵育 1 h，酶标仪检测各孔 450 nm 的吸光光度值。采用 Graphpad Prism 9.0 软件计算 AM630 对 HaCaT 细胞的半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration, IC₅₀）。将 AM630 的 IC₅₀ 浓度作为后续的实验浓度。

1.8 实验分组

将完全培养液培养的 HaCaT 细胞作为对照组，正常受试者血清离心、无菌过滤与完全培养液按照体积 1 : 1 混合后培养的 HaCaT 细胞作为阴性对照组；天疱疮患者血清离心、无菌过滤与完全培养液按照体积 1 : 1 混合后培养的 HaCaT 细胞作为天疱疮组；天疱疮组培养液稀释 AM630 至 IC₅₀ 浓度后培养的 HaCaT 细胞作为 AM630 组。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测 CB2、DSG3、β-catenin 基因表达

4 组细胞培养 3 d，弃去培养液，PBS 冲洗 2 遍，采用 Trizol 法提取总 RNA，检测 RNA 纯度和浓度。利用反转录试剂盒将 3 μg 总 RNA 反转录为 cDNA，进行 CB2、DSG3、β-catenin 基因的相对定量检测，并采用 2^{-ΔΔCT} 结果进行统计学分析。引物序列见表 1。

1.10 蛋白质印迹（Western blot）检测 CB2、DSG3、β-catenin 蛋白表达

4 组细胞培养 3 d，弃去培养液，PBS 冲洗 2 遍，加入 400 μL RIPA 裂解液（含蛋白酶抑制剂，蛋白酶抑制剂 : RIPA 裂解液 = 1 : 100），提取总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒检测样本的蛋白浓度，取 50 μg 总蛋白进行上样，恒压 100 V 电泳 40 min，恒流 400 mA，聚偏氟乙烯（polyvinylidene fluoride, PVDF）转膜 40 min，无蛋白封闭液封闭 30 min，抗体稀释液稀释 CB2 抗体（1 : 1 000）、

DSG3 抗体（1 : 1 000）、β-catenin（1 : 1 000）和 GAPDH（1 : 3 000），孵育 PVDF 膜，4 °C 过夜。山羊抗鼠荧光二抗 1 : 5 000 和山羊抗兔荧光二抗 1 : 5 000，37 °C 孵育 2 h。Odyssey 双色红外荧光成像仪扫描 PVDF 膜，Image-Pro Plus 5.1 软件分析目标条带的灰度值。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

引物	序列
CB2	F: 5'-TTGCCACTGAGGACCGAGGAC-3' R: 5'-TCGCCCCAAACAACAGGATGCC-3'
DSG3	F: 5'-CTGTGCAGCAGCCTGGTAAGTC-3' R: 5'-GCGAGCCACCGTTGAGAAGC-3'
β-catenin	F: 5'-GCTCTTGTGCGTACTGTCCTTC-3' R: 5'-TGGTGTCCGGCTGGTCAGATG-3'
GAPDH	F: 5'-TGGGTGTGAACCACGAGAA-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'

1.11 细胞解离实验观察 AM630 对 HaCaT 细胞黏附功能的影响

将 HaCaT 细胞以每孔 1×10⁵ 个的密度接种于 6 孔培养板中，细胞贴壁后，按照 1.8 中实验分组更换培养液，培养细胞 3 d，PBS 冲洗 2 遍，加入 2 U/mL 分散酶 II（Dispase II）溶液 1 mL，37 °C 孵育 30 min，吸除 Dispase II 溶液，加入 1 mL PBS，在相同机械力（1 mL 移液器匀速吹打 5 次）作用下，细胞发生解离，计数细胞碎片数量和面积。

1.12 统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析，2 组间比较采用独立样本 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

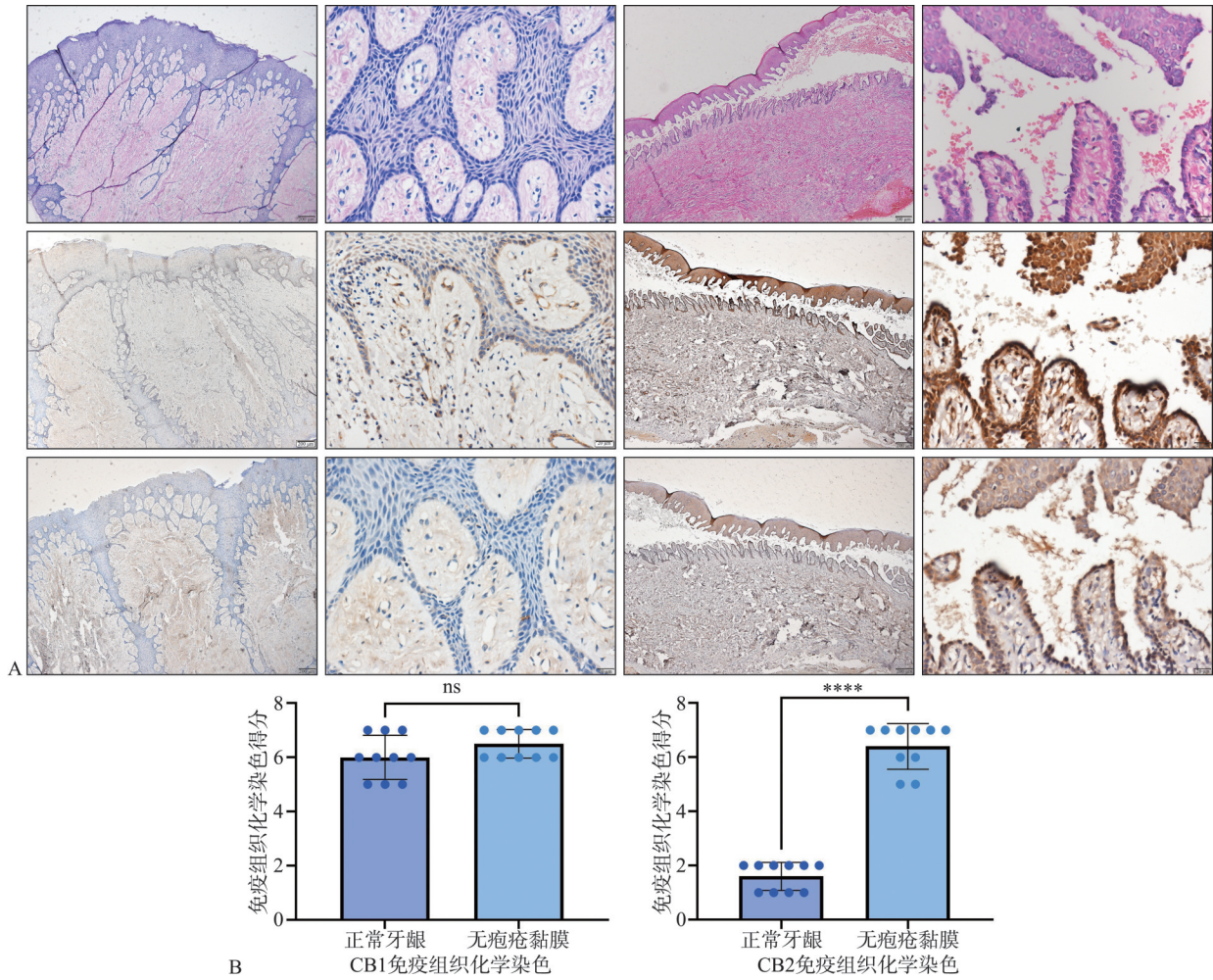
2.1 HE 染色和免疫组织化学染色

HE 染色和免疫组织化学染色结果见图 1。免疫组织化学染色结果显示：正常牙龈 CB1 呈阳性表达，CB2 呈阴性表达；天疱疮上皮组织中 CB1 和 CB2 均呈阳性表达，固有层中血管周围可见散在棕黄色阳性细胞。t 检验分析表明，CB1 在正常牙龈和天疱疮黏膜的表达差异无统计学意义，CB2 在正常牙龈和天疱疮黏膜中的表达差异有统计学意义（P < 0.000 1）。

2.2 ELISA 检测血清中 CB2 表达

正常受试者、天疱疮患者血清中 CB2 表达分别为（2 033.78±376.85）、（2 569.57±248.41）pg/mL。

t检验分析表明,二者CB2间的差异有统计学意义 ($P<0.001$)。



A: 从上到下依次为HE染色、CB1免疫组织化学染色、CB2免疫组织化学染色,左侧2幅图为正常牙龈($\times 40, \times 400$),右侧2幅图为天疱疮黏膜($\times 40, \times 400$); B: 免疫组织化学染色得分统计分析, **** $P<0.0001$, ns为差异无统计学意义。

图1 正常牙龈和天疱疮黏膜HE染色和CB1、CB2免疫组织化学染色

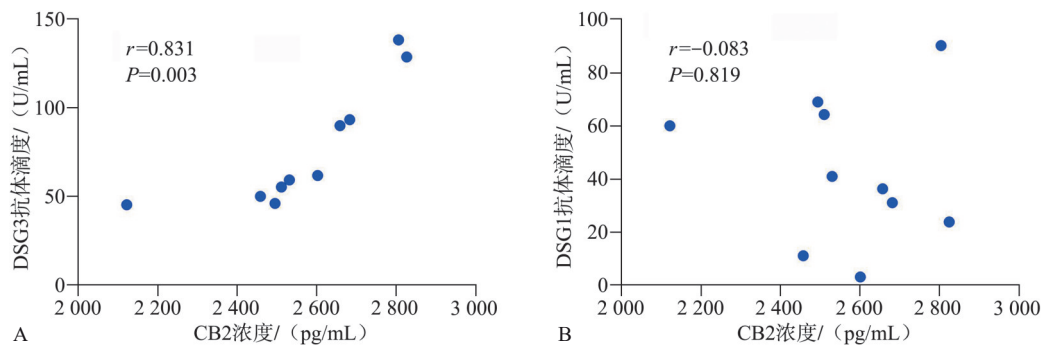
Fig 1 HE staining and CB1 and CB2 immunohistochemical staining of normal gingiva and pemphigus vulgaris mucosa

2.3 天疱疮患者血清CB2浓度与DSG相关性分析

Pearson相关性分析表明:天疱疮患者血清CB2表达与DSG3呈正相关($r=0.831, P=0.003$),与DSG1无相关性($r=-0.083, P=0.819$)(图2)。

2.4 AM630对HaCaT细胞增殖的影响

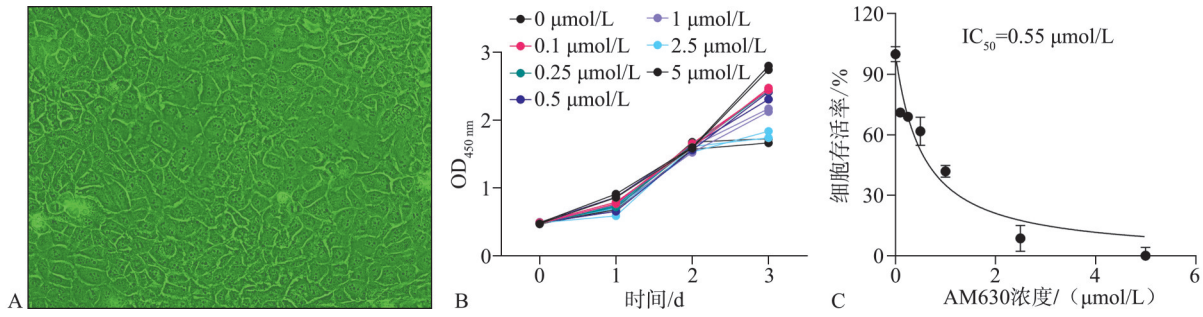
AM630对HaCaT细胞增殖的影响见图3。培养3d, AM630对HaCaT细胞的 IC_{50} 为 $0.55 \mu\text{mol/L}$ 。



A: CB2表达与DSG3表达呈正相关; B: CB2表达与DSG1表达无相关性。

图2 血清CB2与DSG相关性分析

Fig 2 Analysis of the correlation between serum CB2 and DSG



A: HaCaT细胞 倒置显微镜 ×200; B: 不同时间不同浓度 AM630 对 HaCaT 细胞增殖的影响; C: AM630 对 HaCaT 细胞的 IC₅₀ 浓度。

图 3 AM630 对 HaCaT 细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of AM630 on HaCaT cell proliferation

2.5 实时荧光定量 PCR 检测 CB2、DSG3 和 β-catenin 基因表达

4 组 CB2、DSG3 和 β-catenin 基因表达非参数检验统计结果显示：与对照组相比，天疱疮组 CB2、DSG3 基因表达升高，β-catenin 基因表达降低；与天疱疮组相比，AM630 组 CB2、DSG3 基因表达降低，β-catenin 基因表达升高，表明 CB2 抑制剂 AM630 可逆转 3 种基因的表达（图 4）。

剂 AM630 可逆转 3 种蛋白的表达（图 5）。

2.6 Western blot 检测 CB2、DSG3 和 β-catenin 蛋白表达

4 组细胞 CB2、DSG3 和 β-catenin 蛋白表达非参数检验结果显示：与对照组相比，天疱疮组 CB2、DSG3 蛋白表达升高，β-catenin 蛋白表达降低。与天疱疮组相比，AM630 组 CB2、DSG3 蛋白表达降低，β-catenin 蛋白表达升高，表明 CB2 抑

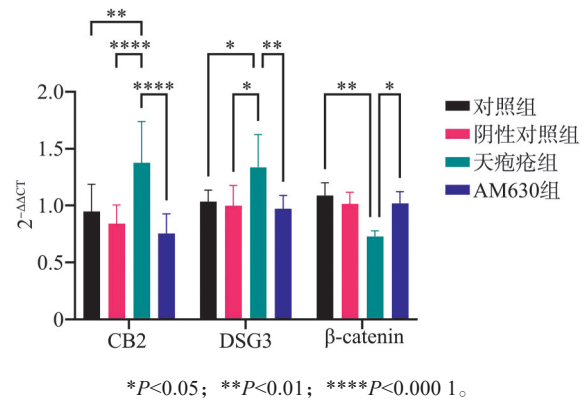
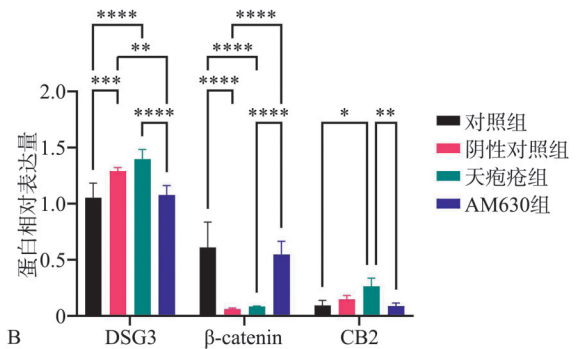
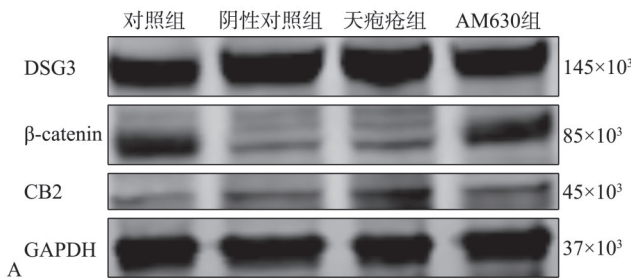


图 4 实时荧光定量 PCR 检测 CB2、DSG3 和 β-catenin 基因表达
Fig 4 Real-time PCR analysis was performed to quantify the relative mRNA expression levels of CB2, DSG3 and β-catenin



A: CB2、DSG3 和 β-catenin 蛋白表达; B: Western blot 灰度值统计。**P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001; *****P*<0.000 1。

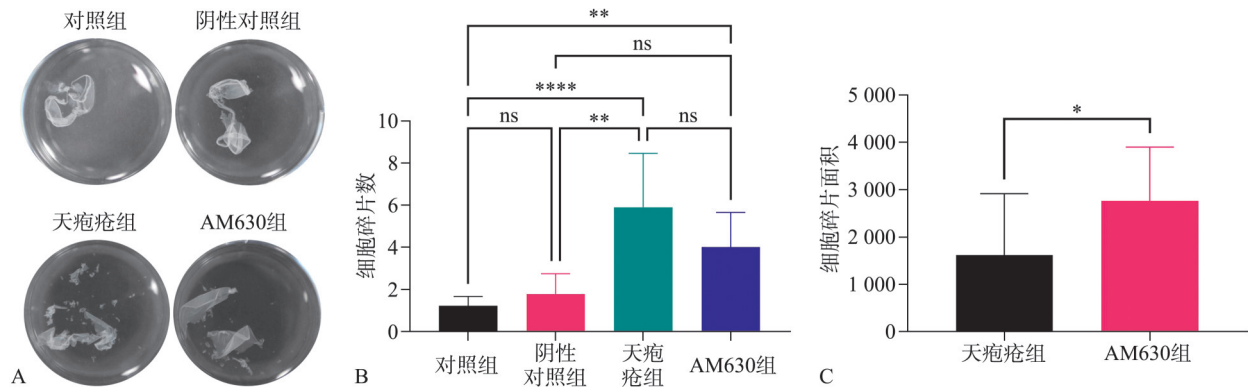
图 5 蛋白质印迹检测 CB2、DSG3 和 β-catenin 蛋白表达

Fig 5 Western blot analysis of CB2, DSG3 and β-catenin protein expression

2.7 AM630 对 HaCaT 细胞黏附功能的影响

细胞解离实验（图 6）表明，天疱疮组和 AM630 组细胞明显解离，对照组和阴性对照组未见明显细胞解离碎片。Kruskal-Wallis 检验分析表明，天疱疮组与对照组、阴性对照组细胞碎片数差异有统计学意义（*P*<0.01），AM630 组与对照组细

胞碎片数差异有统计学意义（*P*<0.01），天疱疮组与 AM630 组细胞碎片数差异无统计学意义（*P*>0.05）。Mann-Whitney *U* 检验统计分析显示，天疱疮组与 AM630 组细胞解离碎片面积差异有统计学意义（*P*<0.05）。



A: 细胞解离大体图; B: 细胞解离碎片数分析; C: 细胞解离碎片面积分析。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$; ns为差异无统计学意义。

图6 AM630对HaCaT细胞黏附功能的影响

Fig 6 Effect of AM630 on the adhesive function of HaCaT

3 讨论

自身免疫性疾病是指由环境和遗传因素共同作用,引发机体自身抗原产生应答,造成组织损伤或功能异常,常见疾病包括系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、天疱疮和类天疱疮等疾病^[8]。这类疾病的口腔表征往往早于全身症状,成为临床早期诊断的重要窗口^[9]。此类疾病的治疗面临双重挑战,一方面,糖皮质激素等传统疗法长期应用导致心血管疾病风险增加和代谢紊乱等副作用^[10-11];另一方面,针对免疫调控的新型靶向治疗仍存在机制研究不足的困境。因此目前更多聚焦于自身免疫性疾病生物标志物的探寻及适宜疗法的研究^[12]。CB2作为免疫调节系统的重要分子,已经在新型冠状病毒感染、糖尿病中展现出良好的应用前景^[13-14],但其在天疱疮中的作用尚未见研究。本研究结果发现天疱疮患者组织和血清中CB2高表达,表明CB2参与了天疱疮的自身免疫。CB1在正常牙龈和天疱疮中同时有高表达且差异无统计学意义,这使其难以作为特异性干预靶点。CB2在正常牙龈和天疱疮中表达差异有统计学意义,这一发现为后续聚焦CB2的研究提供了关键依据。

天疱疮疾病的细胞模型已经被研究^[7,15]报道。本研究为了克服纯化IgG的复杂过程,创新性构建基于临床血清的快速天疱疮疾病细胞模型,通过将天疱疮患者的血清离心、无菌过滤后与完全培养液按照体积1:1混匀,培养HaCaT细胞,成功复现棘层松解特征(细胞解离实验中天疱疮组细胞碎片数增加),充分说明该方法的可行性。本研究细胞模型操作简便,为后续研究提供了高效可重复的疾病模型。

实时荧光定量PCR和Western blot检测结果显示,天疱疮组CB2表达升高。相关性分析显示,CB2表达与DSG3正相关,随CB2表达升高,DSG3增加,而CB2表达与DSG1无相关性。口腔黏膜棘层松解的过程是桥粒结构中的DSG产生自身抗体导致,其中最重要的参与亚型为DSG3。桥粒初始形成过程中依赖 β -catenin与黏着斑相互作用,从而启动桥粒成核,最终形成桥粒^[16],可见DSG3与 β -catenin对角质细胞黏附至关重要。本研究中实时荧光定量PCR和Western blot结果显示,对照组与天疱疮组DSG3、 β -catenin表达差异显著,表明天疱疮患者血清培养的HaCaT细胞可作为研究天疱疮疾病的细胞模型。CB2相关制剂在不同疾病、器官中已有较为明确的剂量使用标准。本研究结果表明,AM630对HaCaT细胞的抑制作用呈时间—浓度依赖性。基因、蛋白检测表明,AM630可逆转天疱疮组CB2、DSG3的高表达和 β -catenin的低表达。细胞解离实验中,尽管天疱疮组和AM630组细胞碎片数差异无统计学意义,但AM630组细胞碎片面积高于天疱疮组,说明AM630可逆转天疱疮对上皮细胞的黏附破坏作用,同时也证明CB2参与了天疱疮疾病的发生和发展。

本研究选择正常受试者的血清作为阴性对照,Western blot检测结果未发现阴性对照组与天疱疮组DSG3、CB2和 β -catenin差异有统计学意义,推测原因可能是正常受试者的血清也可作为外来的刺激因素,激发相应的细胞免疫反应,从而导致阴性对照组与天疱疮组差异不显著。

综上,本研究通过免疫组织化学染色结果,锁定CB2作为研究靶基因,利用天疱疮患者血清成功简化HaCaT细胞天疱疮模型,并采用AM630抑制CB2表达,成功阻抑HaCaT天疱疮细胞模型

下 DSG3 增高和 β -catenin 降低, 有效降低天疱疮模型下的细胞解离。CB2 可作为寻常型天疱疮的治疗靶向分子, CB2 抑制剂 AM630 可以抑制天疱疮的细胞棘层松解, 为天疱疮的血清诊断和治疗提供了新的分子目标。本研究发现 CB2 在天疱疮患者黏膜组织和血清中特异性高表达, 这一发现具有双重意义: 一是揭示了 CB2 作为新型免疫调控靶点在天疱疮病变中的独特作用, 有别于在正常和病变组织中普遍表达的 CB1 受体; 二是为研究天疱疮的发病机制提供了新视角, CB2 可能调节获得性免疫应答参与自身抗体的异常产生。该发现不仅填补了 CB2 在皮肤黏膜自身免疫病领域的研究空白, 更重要的是为开发精准靶向治疗提供了理论依据, 未来或可通过调控 CB2 信号通路实现免疫稳态重建, 这对改善现有治疗方案的选择局限性和降低药物毒副作用具有重要转化价值。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] 陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2020: 70-76.
Chen QM. Diseases of oral mucosa[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020: 70-76.
- [2] 中国医疗保健国际交流促进会皮肤科分会. 寻常型天疱疮诊断和治疗专家建议(2020)[J]. 中华皮肤科杂志, 2020, 53(1): 1-7.
Dermatology Branch of China International Exchange and Promotion Association for Medical and Healthcare. Diagnosis and treatment of pemphigus vulgaris: an expert proposal (2020)[J]. Chin J Dermatol, 2020, 53(1): 1-7.
- [3] 陈琰, 张佩莲. 寻常型天疱疮的治疗进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2025, 41(3): 234-238.
Chen Y, Zhang PL. Progress in the treatment of pemphigus vulgaris[J]. China J Lepr Skin Dis, 2025, 41(3): 234-238.
- [4] Basavarajappa BS, Subbanna S. Molecular insights into epigenetics and cannabinoid receptors[J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1560.
- [5] Sarsembayeva A, Kienzl M, Gruden E, et al. Cannabinoid receptor 2 plays a pro-tumorigenic role in non-small cell lung cancer by limiting anti-tumor activity of CD8+ T and NK cells[J]. Front Immunol, 2023, 13: 997115.
- [6] Garofano F, Schmidt-Wolf IGH. High expression of cannabinoid receptor 2 on cytokine-induced killer cells and multiple myeloma cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3800.
- [7] 李志量, 荆可, 李锁, 等. 寻常型天疱疮患者血清 IgG 与 HaCaT 细胞共培养构建天疱疮细胞模型[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2018, 32(1): 8-14.
Li ZL, Jin K, Li S, et al. Establishment of cell model of pemphigus using co-cultured HaCaT cells with pemphigus vulgaris (PV)-IgG[J]. Chin J Derm Venereol, 2018, 32(1): 8-14.
- [8] Wójcik P, Gęgotek A, Źarković N, et al. Oxidative stress and lipid mediators modulate immune cell functions in autoimmune diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 723.
- [9] 王倩, 赵岩, 金建秋. 自身免疫性疾病口腔表现及诊治策略的研究进展[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2024, 16(11): 31-38, 5.
Wang Q, Zhao Y, Jin JQ. Research progress in oral manifestations, diagnosis and treatment of autoimmune diseases[J]. Chin J Front Med Sci, 2024, 16(11): 31-38, 5.
- [10] Namazi N, Ariaeenejad S, Azad ME, et al. Risk of atrial fibrillation in pemphigus vulgaris[J]. Indian J Dermatol, 2022, 67(6): 639-644.
- [11] Zhao L, Chen Y, Wang M. The global incidence rate of pemphigus vulgaris: a systematic review and Meta-analysis[J]. Dermatology, 2023, 239(4): 514-522.
- [12] Juarranz Y. Molecular and cellular basis of autoimmune diseases[J]. Cells, 2021, 10(2): 474.
- [13] Nagoor Meeran MF, Sharma C, Goyal SN, et al. CB2 receptor-selective agonists as candidates for targeting infection, inflammation, and immunity in SARS-CoV-2 infections[J]. Drug Dev Res, 2021, 82(1): 7-11.
- [14] Shafiei-Jahani P, Yan S, Kazemi MH, et al. CB2 stimulation of adipose resident ILC2s orchestrates immune balance and ameliorates type 2 diabetes mellitus[J]. Cell Rep, 2024, 43(7): 114434.
- [15] 李秋菊, 陆家荣, 郑文军. 天疱疮体外及动物模型研究进展[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2024, 38(11): 1284-1287.
Li QJ, Lu JR, Zheng WJ. Research progress on *in vitro* and animal models of pemphigus[J]. Chin J Derm Venereol, 2024, 38(11): 1284-1287.
- [16] Yin T, Green KJ. Regulation of desmosome assembly and adhesion[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(6): 665-677.

(本文编辑 李彩)