

文章编号:1004-616X(2000)02-0102-03

# 吸烟口腔白斑患者粘膜脱落细胞和外周血淋巴细胞DNA损伤关系的研究

孙正<sup>1</sup>,李宁<sup>2</sup>

(1. 首都医科大学附属北京口腔医院,北京 100050;2. 中国预防医学科学院营养卫生所,北京 100050)

**摘要:**目的与方法:本文对54例口腔白斑患者(均为吸烟者)进行了口腔脱落粘膜细胞微核和外周血淋巴细胞微核及染色体畸变率检测。结果:吸烟的口腔白斑患者口腔脱落粘膜细胞微核细胞率和外周血淋巴细胞微核细胞率及染色体畸变率均显著高于正常人,且口腔白斑病损区的脱落粘膜细胞微核细胞率的变化与口腔白斑病变程度相关,正常区粘膜脱落细胞微核细胞率的高低与外周血淋巴细胞微核细胞率呈正相关。结论:结果表明,口腔白斑病损区脱落粘膜细胞微核细胞率可反映组织病变程度,用口腔脱落粘膜细胞微核细胞率替代外周血淋巴细胞微核反映机体接触致癌物水平更简便易行。

**关键词:**口腔白斑;微核;染色体畸变

中图分类号:R793.85 文献标识码:A

细胞ras<sup>21</sup>荧光指数,从而降低了细胞发生恶化的能  
力,故可减轻肿瘤的发生、发展。

3 最近一些研究证实,许多肿瘤原发病灶和转移部位的细胞及其周围临近细胞除尿激酶型纤溶酶原激活剂(UPA)及其受体upAR的表达水平增高外,同时肿瘤细胞还产生抑制UPA活力的PAI-1以调节肿瘤细胞浸润和转移的能力<sup>8</sup>。有人发现乳腺癌组织中PAI-1活性明显高于正常和良性组织且PAI-1含量高的病人存活期短,表明组织中PAI-1水平亦是一重要预后指标<sup>9</sup>。本研究中发现刺五加组大鼠血清和组织中PAI-1含量均明显低于3-MeDAB组( $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ ),提示刺五加在改善实验性肝癌的预后方面也起着一定的作用。

## 参考文献:

- 1 吴秉纯,刘瑞梅,郭秀芳,等. 刺五加药理作用的研究J. 中医药报,1985,2:29-32.
- 2 张乃哲,赵会军,付琳杰,等. 刺五加多糖及谷胱甘肽硫转移酶对大鼠实验性肝癌防治的研究J. 天津医药,1995,23(2):77-81.
- 3 Mannervik B, Guthenberg C. Glutathione transferase(human placenta) J. Methods Enzymol, 1981, 77:28-29.
- 4 左连富,刘洪详,林元珠,等. 乳腺癌流式细胞光度分析J. 中华病理学杂志,1988,17(1):42-45.
- 5 左连富,周道安,齐凤英,等. 定量分析P53基因产物的表达J. 中华物理医学杂志,1994,16(2):78-81.
- 6 Higashi T, Fukui R, sekiyama M, et al. Decreased induction of glutamyl transferase activity by 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene in the liver of rats given carcinogen-containing diet for several generationsJ. Jpn Cancer Res, 1986, 77(2):139-114.
- 7 Harada M, Dosaka-Akita H, Miyamoto H, et al. Prognostic significance of the expression of ras oncogene product in nonsmall cell lung cancerJ. Cancer, 1992, 69:72-75.
- 8 Janicke F, Schmitt M, Pache L, et al. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancerJ. Breast Cancer Res Treat, 1993, 24:195-208.
- 9 Grondahl-Hansen J, Christensen TJ, Rosenquist C, et al. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinoma are associated with poor prognosisJ. Cancer Res, 1993; 53:2513-2521.

收稿日期:1999-01-10;修订日期:1999-10-3

作者简介:孙正,女,天津人,硕士,副教授,副主任医师,从事口腔癌前病变标志物及化学预防效果的研究。

# STUDIES ON DNA DAMAGE OF ORAL MUCOSA CELLS AND PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN SMOKING ORAL LEUKOPLAKIA PATIENTS

SUN Zheng<sup>1</sup>, LI Ning<sup>2</sup>

(1. Beijing Hospital for Stomatologe, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050 China; 2. Institute of Nutrition and Food Hygiene, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100050, China)

**Abstract : Purpose and Methods :** The incidence of micronucleated cells in exfoliated oral mucosa cells and the incidence of micronucleated cells and chromosome aberration in peripheral blood lymphocytes of 54 smoking oral leukoplakia patients were examined. **Results :** The results showed that the incidence of micronucleated cells in exfoliated oral mucosa cells, the incidence of micronucleated cells and chromosome aberration in peripheral blood lymphocytes of smoking oral leukoplakia patients were significantly higher than those of healthy persons; the incidence of micronucleated cells in exfoliated oral mucosa cells of lesion mucosa had a positive correlation with the degrees of oral lesions, and the incidence of micronucleated cells in exfoliated oral mucosa cells of normal mucosa had a positive correlation with the incidence of micronucleated cells in peripheral blood lymphocytes. **Conclusion :** It is concluded that the incidence of micronucleated cells in exfoliated oral mucosa cells of lesion mucosa may reflect the degrees of oral lesions, and it is simple and economical to use the incidence of micronucleated cells in exfoliated oral mucosa cells of normal mucosa to substitute peripheral blood lymphocytes in reflecting DNA damage levels of body exposure to carcinogens.

**Key words :** Oral leukoplakia ; micronuclei ; chromosome aberration

口腔癌位于世界恶性肿瘤的第六位,在一些发展中国家发病率可达 25%,其病因 75% 归因于吸烟和饮酒<sup>1,2</sup>。口腔白斑是 WHO 公认的口腔癌的癌前病变,其癌变率为 7~15%,非均质型白斑可达 15~40%<sup>3,4</sup>。因此,阻断口腔粘膜白斑的发展和恶变是预防口腔癌的重要措施。癌症的人群干预试验研究如果以癌发生率作为观察终点,所需样本量大、周期长、费用高,因而可行性较小。故近年来中外学者均提供用癌发生过程中的生物学标志物代替癌发生率作为中间观察终点。口腔脱落粘膜细胞微核是近年来国外在口腔癌化学预防研究中常用的中间生物标志物,其高低可反映口腔癌前病损癌变的危险性。国外 Stich 等<sup>5</sup> 研究报道,在印度咀嚼烟叶的口腔白斑患者,其口腔脱落粘膜细胞微核细胞率(微核细胞率以下简称微核)和外周血淋巴细胞微核增高,但国内这方面的研究未见报道。本文对 54 例吸烟的口腔白斑患者口腔脱落粘膜细胞微核进行了检测,同时对其外周血淋巴细胞微核和染色体畸变率进行了分析。

## 材料与方法

### 1 试验对象

选择在口腔医院就诊经临床和病理检查诊断为口腔白斑的患者 54 例,年龄为 34~78 岁,男女比例为 42:12,均为吸烟患者,平均吸烟包年数为 21.5 年(吸烟包年数 = 吸烟年数 × 吸烟包数/天),其中单纯增生性白斑 35 例,异常增生性白斑 19 例。同时选取 20 名不吸烟的非口腔白斑患者作为正常对照。

### 2 试验方法

#### 2.1 脱落粘膜细胞微核的检测

用竹制刮板刮取口腔白斑病损区和正常区脱落粘膜细胞,均匀涂于载玻片上,正常区取自试验对象右侧颊粘膜,每人每处病损区和正常区涂片两张。空气自然干燥;用甲醇:冰醋酸固定 15 min,进行 Feugen 染色;切片在室温下于 1 mol/L 盐酸中作用 1 min,放入 56℃ 1 mol/L 盐酸中作用 10 min,再于室温 1 mol/L 盐酸中作用 1 min;置 Schiff 氏碱染液中室温下作用 90 min;用 1% 偏重亚硫酸钾水洗三次,每次 2 min;用 1% 的亮绿染 45 秒,结果细胞核染成红色,细胞浆染色绿色。每张涂片计数 1000 个细胞,取平均值作为其微核率,以千分率表示。微核判定标准为与主核

分离,在同一个平面,与主核染色一致,小于主核1/3~1/5,无折光性。

## 2.2 外周血淋巴细胞微核的检测<sup>6</sup>

取肝素抗凝血0.3ml,加入5ml含有10%胎牛血清、2mg PHA的RPMI 1640培养液中,于37℃培养72小时后,离心,去上清液,加0.053mol/L KCl溶液4ml后,立即加生理盐水1ml,混匀,离心,去上清,加入甲醇:冰醋酸(1:1)的固定液5ml,混匀后立即离心,弃上清,反复固定两次,留约0.5ml液体进行滴片。玻片经Giemsa染色,在×100倍油镜下阅片,每片计数1000个细胞,记录其微核细胞数,微核率以每1000个外周血淋巴细胞微核数表示。微核判定标准同口腔脱落粘膜细胞微核。

## 2.3 外周血淋巴细胞染色体的检测<sup>7</sup>

取肝素抗凝血0.3ml,加入5ml含10%小牛血清和2mg PHA的RPMI 1640培养液中,于37℃培养66h,加20μg/ml的秋水仙素20μl,使终浓度为0.08μg/ml,继续培养1.5h后,离心去上清液,加0.075mol/L的KCl 6ml在37℃水浴中低渗20min,用甲醇:冰醋酸(3:1)固定液反复固定3次后,进行滴片。在油镜下计数100个分散良好的处于中期分裂相的淋巴细胞中的染色体畸变数,分析染色体畸变类型。染色体畸变率以每100个中期相淋巴细胞中的染色体畸变数表示。

同时对20名正常人用同样方法进行口腔脱落粘膜细胞微核率、外周血淋巴细胞微核率和染色体畸变率检测作为正常对照。用泊松分布统计分析。

## 结 果

表1 口腔粘膜正常区和白斑区脱落细胞微核率

分组	例数	微核细胞率( $\bar{x} \pm s$ )	
		正常区(%)	白斑区(%)
正常人	20	1.40 ± 0.60	
单纯增生白斑	35	4.91 ± 1.79 <sup>a</sup>	10.08 ± 3.76 <sup>a,c</sup>
异常增生白斑	19	5.94 ± 1.34 <sup>a</sup>	14.80 ± 5.28 <sup>a,b,c</sup>

a: 示与正常人比较 b: 示与单纯增生白斑比较 c: 示正常区与病损区比较 \* \* \* :  $P < 0.01$

表2 口腔白斑患者外周血淋巴细胞微核率和染色体畸变率( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	外周血淋巴细胞	
		微核率(%)	染色体畸变率(%)
正常人	20	0.90 ± 0.70	0.70 ± 0.59
单纯增生白斑	35	4.80 ± 1.38 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.91 <sup>a</sup>
异常增生白斑	19	5.10 ± 1.37 <sup>a</sup>	3.63 ± 1.12 <sup>a</sup>

a: 示与正常人比较  $P < 0.01$

表3 正常区脱落细胞和外周血淋巴细胞微核率的相关分析

组 别	例 数	正常区脱落细胞微核 细胞率(%)	淋巴细胞微核 细胞率(%)	相关系数 <i>r</i>
正常健康人	20	1.40 ± 0.60		
口腔白斑	54	5.27 ± 1.34	4.9 ± 1.34	0.91

经泊松分布检验,  $P < 0.01$

由表1可见,吸烟白斑患者无论是病损区还是正常区口腔脱落粘膜细胞微核均高于正常不吸烟者,同一个患者病损区微核又高于正常区。异常增生性口腔白斑病损区的口腔脱落粘膜细胞微核高于单纯增生性口腔白斑。

由表2可见,吸烟白斑患者外周血淋巴细胞微核率和染色体畸变率均显著高于正常不吸烟者。异常增生性白斑患者外周血淋巴细胞微核细胞率、染色体畸变率尽管高于单纯增生性白斑,但均无显著性差异。

由表3可见,口腔白斑患者正常区粘膜脱落细胞微核与外周血淋巴细胞微核显著相关。

## 讨 论

微核是组织细胞染色体断裂后形成的断片,其频率的高低反映组织DNA损伤的程度,并随着接触致癌物程度而变化<sup>8</sup>。外周血淋巴细胞微核细胞率、染色体畸变率用于反映机体接触致癌物水平早已广泛用于研究中,其DNA损伤的程度可反映组织癌变情况<sup>9</sup>。口腔脱落粘膜细胞微核是近年来发展起来的用于反映机体接触致癌物水平和口腔癌化学预防研究的中间终点标志物。口腔脱落粘膜细胞微核在基底细胞形成后,移行到表层,并在脱落粘膜细胞中检测到,微核率的高低与口腔癌的危险性呈正相关。

香烟中含有大量致癌物、促癌物和大量的自由基,是机体广泛接触的致癌物之一<sup>10</sup>,许多研究报道,香烟可引起机体DNA损伤,导致外周血淋巴细胞微核、姐妹染色单体互换和染色体畸变率增高<sup>11</sup>,但对口腔粘膜组织DNA损伤研究较少。Desai等研究报道,在印度咀嚼烟叶患口腔白斑的患者其口腔脱落粘膜细胞微核率可达12.8%,外周血微核率可达3.7%<sup>12</sup>。本研究结果,白斑患者无论是病损区还是正常区口腔脱落粘膜细胞微核形成增高,且异常增生性白斑病损区的口腔脱落粘膜细胞微核(14.8%)高于单纯增生性白斑(10.08%)。外周血微核细胞率、染色体畸变率高于正常人,且患者病损区脱落粘膜细

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0105 - 03

## 香菇多糖胶囊抗突变作用的实验研究

陈冠敏,林升清,黄宗锈,陈幼雄,何玲,姜瑞钗

(福建省卫生防疫站,福建 福州 350001)

**摘要:**目的与方法:本文采用 Ames 试验及活体小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验方法,对香菇多糖胶囊进行抗突变试验,结果:香菇多糖胶囊各剂量组在加与不加 S9 的条件下,均能抑制由 2 - 氨基芴等阳性物引起的 TA98、TA100 回变菌落数的增加;抑制由环磷酰胺引起的小鼠微核率的增加,抑制率在 45.32% - 64.72%。结论:香菇多糖胶囊具有一定的抗突变作用。

**关键词:**香菇多糖;抗突变作用;Ames 试验;微核试验

中图分类号:R155; R965.2 文献标识码:A

## STUDY ON THE ANTIMUTAGENICITY OF LENTINAN

胞微核与外周血淋巴细胞微核显著相关。由此可见,口腔白斑病损区脱落粘膜细胞微核细胞率的高低与组织病变程度相关,可反映组织病变程度,由于其取材无损伤性,患者易接受,因此,可作为动态观察和预测白斑发生癌变和化学预防效果评价的中间标志物,证明用口腔粘膜细胞微核代替外周血淋巴细胞微核反映机体接触致癌物水平是可行的,而且更简便易行。

本研究结果进一步证明香烟的致癌物引起口腔粘膜组织 DNA 损伤是诱发口腔癌前病变和口腔癌及机体其它组织癌症的一个重要因素。吸烟者口腔白斑脱落粘膜细胞微核增高,同时伴随外周血微核与染色体畸变率增高,因此,我们上述指标均可作为口腔白斑追踪观察和口腔癌化学预防效果的观察指标。

### 参考文献:

- 1 Magrath I, Litvak J. Cancer in developing countries: Opportunity and challengeJ. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85: 862 - 874.
- 2 Tanaka T. Chemoprevention of oral carcinogenesisJ. *Oral Oncol*, *Eur J Cancer*, 1995, 31B:3 - 15.
- 3 许国祺,李秉琦,等. 口腔癌前病变—白斑与扁平苔藓M. 北京:中国医药科技出版社,1992. 1 - 6.
- 4 Sankaranarayanan R, mathew B, Varghese C, et al. Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and Beta carotene: an assessmentJ. *Oral Oncol*, 33:231 - 236.
- 5 Stich HF, Rosin Mp. Quantitating the synergistic effect of smoke and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cellsJ. *Int J Cancer*, 1983, 31: 305 - 308.
- 6 陈少华. 淋巴细胞微核制片改良法. *福建医学院学报*, 1992, 26:365.
- 7 章静波,等. 细胞生物学实用方法与技术 M. 北京:北京医科大学中国医科大学联合出版社,1995. 6 - 9.
- 8 Tanaka T, Kawamori T, Ohnishi M, et al. Chemoprevention of 4 - troquinolinol - Oxide - induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phasesJ. *Cancer Res*, 1994, 54:2359 - 2365.
- 9 Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, et al. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesionsJ. *Cancer letters*, 1996, 109:9 - 14.
- 10 Carbone D. Smoking and cancerJ. 1992;93 (Suppl. 1A):1.
- 11 Mooney LVA, Bell DA, Santella RM, et al., Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokersJ. *Carcinogenesis*, 1997, 18: 503 - 509.
- 12 Desai SS, Ghaisas SD, Jakhi SD, et al. Cytogenetic damage in exfoliated oral mucosal cells and circulating lymphocytes of patients suffering from precancerous oral lesions J. *Cancer Letters*, 1996, 109:9.

收稿日期:1999-06-16;修订日期:1999-09-29

作者简介:陈冠敏(1960-),女,浙江省人,副主任技师,理学学士,从事食品毒理研究。