

# 复发性阿弗它溃疡患者血小板游离钙及溃疡组织钙含量定量分析

黄生高 凌天慵 吴汉江 李运良

**摘要** 为探讨钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )异常活动与复发性阿弗它溃疡(RAU)发生的关系,随机收集50例RAU患者及30例健康志愿者,分别采集外周全血及口腔正常或溃疡粘膜组织,应用Fura-2/AM荧光比值法及邻甲酚酞复合物(OCPC)自动分析法分别检测血小板游离钙浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )及组织钙含量( $W_{\text{Ca}^{2+}}$ )。结果发现:RAU患者不论发作期还是间歇期血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 均显著高于正常对照者( $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ );溃疡组织 $W_{\text{Ca}^{2+}}$ 明显升高,与正常对照组比较具有极显著性差异( $P < 0.001$ );血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 与同期溃疡组织 $W_{\text{Ca}^{2+}}$ 呈显著正相关( $P < 0.01$ )。提示:血小板游离钙及组织钙超载可能在RAU发生中起重要作用。

**关键词** 复发性阿弗它溃疡 钙 钙超载 血小板

复发性阿弗它溃疡(recurrent aphthous ulceration, RAU)是一类具有周期复发特征的口腔粘膜局限性溃疡性损害,其发病机制远未明确。钙离子(calcium ion,  $\text{Ca}^{2+}$ )广泛存在于机体各组织器官及体液中,行使着重要的生理功能。许多疾病如心脑血管病、胃十二指肠溃疡等均与 $\text{Ca}^{2+}$ 异常活动有关。关于 $\text{Ca}^{2+}$ 与RAU发病的关系,国内外尚未见报道。作者采用Fura-2/AM荧光比值法及邻甲酚酞复合物(OCPC)自动分析法分别对50例RAU患者发作期和间歇期血小板游离钙浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )及溃疡组织钙含量( $W_{\text{Ca}^{2+}}$ )进行测定,以探讨 $\text{Ca}^{2+}$ 异常活动在RAU发病中的作用。

1 材料和方法

## 1.1 病例选择及分组

### 1.1.1 病例选择及分组

RAU患者组:临床确诊为RAU者。能合作,有复诊条件,近期内未用过影响血小板功能的药物如阿司匹林、潘生丁、激素、ATP等,无其它严重口腔疾患及系统性疾病。共50例,男23例,女27例,平均年龄41.3岁(18~68岁),溃疡平均数目3.5个(1~11个)、溃疡平均直径6.8mm(3~12mm)。

正常对照组:湖南医科大学健康志愿者。无RAU及RAU史,其余要求同上。共30例,男12例,女18例,平均年龄38.4岁(22~54岁)。

### 1.2 主要试剂及来源

Fura-2/AM, EGTA, Hepes, Triton X-100, 小牛血清白蛋白均为Sigma公司产品,OCPC试剂盒购自我国台北元

生公司;其它试剂为国产分析纯,部分自行配制。

### 1.3 标本采集及预处理

全血标本:空腹抽肘静脉血6ml,置含有1ml ACD液硅化试管中快速送检,RAU间歇期患者标本在溃疡痊愈14d后抽取。

组织标本:双氧水、生理盐水交替冲洗组织表面,去除表面污秽物,常规消毒,阻滞局麻,沿溃疡边缘外约3mm整块切取粘膜组织,置Hepes液中漂洗两次待检。

### 1.4 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定

参照Rao方法<sup>1</sup>:全血离心(680 r/min, 10 min),取富含血小板血浆(即上清),加入240 mmol/L EDTA液稀释,离心(2800 r/min, 10 min),弃上清,再以ACD液2ml洗涤离心(2800 r/min, 10 min)两次,调节血小板数到 $3 \times 10^8/\text{ml}$ 。加入10%小牛血清白蛋白及Fura-2/AM,使其终浓度分别为0.1%,  $1 \mu\text{mol/L}$ ,温育(37, 40 min),避免光照离心,弃上清,再以ACD液洗涤离心两次,最后将负载血小板沉淀物悬浮在Hepes液中,置日立850型单波长荧光分光光度计上测定荧光值F(340 nm波长激发,490 nm波长发射)再加入Triton X-100(终浓度0.01%),测得 $F_{\text{max}}$ ;再加入EGTA,测得 $F_{\text{min}}$ 。按下式计算血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ :

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{\text{min}}}{F_{\text{max}} - F} \quad (\text{nmol/L}) \quad (K_d = 224 \text{ nm})$$

### 1.5 组织 $W_{\text{Ca}^{2+}}$ 测定

在万分之一光学天秤上精确称量组织总重量G,然后按OCPC试剂盒操作说明书进行操作,最后在SP-501(美国)自动生化分析仪上测定吸光值OD(波长570 nm),按下式计算组织 $W_{\text{Ca}^{2+}}$ :

$$W_{Ca^{2+}} = \left( \frac{OD_{\text{样本}}}{OD_{\text{标准}}} \times \text{标准液浓度} \right) \div 100 \times \frac{V}{G} \times 10^6 \text{ (ng/g)}$$

1.6 统计学处理

在 SPSS 统计软件包上行 *t* 检验及相关分析。

2 结 果

2.1 不同时期 RAU 患者血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与正常对照比较

RAU 发作期血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (126.5 ± 29.1 nmol/L) 与正常对照 (68.1 ± 12.3 nmol/L) 比较具有极显著性差异 (*P* < 0.01); RAU 间歇期血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (89.1 ± 18.1 nmol/L) 明显回落, 但与正常对照比较仍具有显著性差异 (*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 不同时期 RAU 患者血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与正常对照比较 ( $\bar{x} \pm s$ , nmol/L)

组 别	n	血小板 [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	<i>P</i>
RAU 发作期	50	126.5 ± 29.1	< 0.01
RAU 间歇期	50	89.1 ± 18.1	< 0.05
正常对照	30	68.1 ± 12.3	

2.2 组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> 测定结果

溃疡组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> 明显升高 (253.3 ± 16.8 ng/g), 与正常组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> (23.6 ± 5.5 ng/g) 比较具有极显著性差异 (*P* < 0.001), 见表 2。

表 2 溃疡组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> 与正常对照比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/g)

组 别	n	组织 W <sub>Ca<sup>2+</sup></sub>	<i>P</i>
RAU 溃疡组织	50	253.3 ± 16.8	< 0.001
正常对照	30	23.6 ± 5.6	

2.3 血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与同期溃疡组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> 相关性分析

血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与同期溃疡组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> 呈高度正相关 (*P* < 0.01)。

3 讨 论

RAU 作为口腔粘膜反复发作的溃疡性损害, 严重影响着人们的生活和工作。许多研究者对其病因、发病机理、防治进行了大量的探索。但迄止为止, 对其自愈、复发等特征仍难作出满意的解释。许多研究指出其发生发展与遗传、病毒或细菌感染、营养缺乏、细胞或体液免疫反应异常、谷胶过敏、纤溶障碍等有关, 但几乎均有相反的观点<sup>2</sup>。笔者认为: RAU 属于非特异性炎症反应, 不应过分强调某

一种因素的作用, 而可能是多种因素综合作用的结果, 要对其发病规律作较完善的解释并建立有效的防治措施, 应抛开表面现象, 对其细胞水肿坏死形成溃疡的本质进行深入的研究。

Ca<sup>2+</sup> 作为细胞遗传或代谢的第二信使之一, 参与多种生理生化过程, 行使重要的生理功能, 但功能的正常发挥依赖于在细胞内外的正常分布。Ca<sup>2+</sup> 异常活动或反常与炎症免疫异常反应及细胞损伤关系密切。目前, 普遍认为 Ca<sup>2+</sup> 超载是细胞死亡的“最后共同径路”(a final common pathway)<sup>3</sup>。Ca<sup>2+</sup> 超载导致细胞死亡的确切机制尚未完全明确, 概述起来包括: 大量 Ca<sup>2+</sup> 集聚于线粒体, 与含磷酸根的化合物结合, 形成磷酸钙沉淀, 干扰细胞内呼吸, ATP 合成减少; 同时, Ca<sup>2+</sup> 依赖性 ATP 酶激活, ATP 分解, 胞内 ATP 耗竭。Ca<sup>2+</sup> 本身以及与胞浆受体钙调蛋白结合, 激活蛋白酶, 使黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶, 后者在催化次黄嘌呤及黄嘌呤生成尿酸的过程中产生大量的超氧阴离子 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>); 激活磷脂酶, 致膜磷脂降解, 促进磷脂花生四烯酸 (AA) 前列腺素 (PGs)、白三烯 (LT<sub>3</sub>) 途径代谢, 在 PGG<sub>2</sub> 变为 PGH<sub>2</sub> 的过程中产生大量氧自由基 (OFR), 而 LT<sub>3</sub>、血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 可引发粒细胞“呼吸爆发”产生更多的 OFR, 同时促进血小板聚集和释放反应, 组织毒性物质血小板活化因子 (PAF) 大量释放, 组织细胞进一步受损或死亡<sup>4</sup>。

血小板是最小的血液细胞, 在生理性凝血过程中起重要作用。近来有报道称其亦参与多种炎症免疫反应, 血小板致密颗粒与 α 颗粒可释放多种生物活性因子, 如 5 羟色胺、缓激肽、通透性因子、趋化因子、TXA<sub>2</sub>、PAF, 增加血管通透性, 加强其它炎症细胞趋化, 激活补体, 造成或促进血管炎变、血栓形成、组织缺血缺氧, 细胞损伤。而血小板功能直接受其 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响<sup>5</sup>。测定血小板 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, 既可判断其自身的功能状态及在疾病中的作用, 也可作为细胞模型间接反映组织 Ca<sup>2+</sup> 超载及受损伤程度。

本研究发现: RAU 患者溃疡组织 W<sub>Ca<sup>2+</sup></sub> 大量增加, 提示 Ca<sup>2+</sup> 异常集聚导致 Ca<sup>2+</sup> 超载在 RAU 发生中起重要作用。这与近年来国内有关作者的研究相吻合。李秉琦等<sup>6</sup>、黄永谦等<sup>7</sup> 对 RAU 患者及实验性口腔粘膜溃疡动物模型进行系列研究后发现: 二者的自由基含量均明显升高, 而 SOD 对其有较好

的防治作用。目前大量研究已证明  $Ca^{2+}$  异常在自由基的产生及对组织的损害过程中起着极其重要的作用,并且二者可以相互促进,形成恶性循环。提示某些  $Ca^{2+}$  拮抗剂可能象 SOD 一样对 RAU 具有良好的防治作用,这有待于进一步研究。本研究尚发现 RAU 患者外周血小板  $[Ca^{2+}]_i$  显著升高,与同期溃疡组织  $W_{Ca^{2+}}$  呈显著正相关,尽管 RAU 间歇期已明显回落,但仍显著高于正常对照。说明 RAU 患者血小板处于一种高活化状态,这与林梅等<sup>8</sup> 研究相吻合。血小板活性增强,一方面可导致微血栓形成,动静脉炎,粘膜组织缺血缺氧;另一方面可直接参与超常炎症免疫反应,产生大量炎性介质,特别是 PAF,最终导致组织细胞水肿坏死,溃疡形成。间歇期血小板  $[Ca^{2+}]_i$  维持高水平,可能是 RAU 反复发作的基础,但血小板  $[Ca^{2+}]_i$  升高是始发于 RAU 发作之前,还是继发于 RAU 形成之后,尚待进一步探索。

#### 4 参考文献

1 Rao GHR. Measurement of ionized calcium in normal human blood platelets. *Anal Biochem*, 1988, 168: 400

2 Vincent SD, Lilly GE. Clinical, historic, and therapeutic features of aphthous stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1992, 74: 79

3 Shanne FAX, Kane AB, Yong EE, et al. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 1979, 206(9): 700

4 Lewis MS, Whately RE, Cain P, et al. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of PAF by endothelium and induced endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest*, 1988, 82: 205

5 武小玲. 钙离子与血小板功能. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1990, 10(3): 134

6 李秉琦, 陈谦明, 周红梅, 等. 超氧化物歧化酶防治口腔粘膜炎症损害的动物实验研究——SOD 清除氧自由基的直接证据. 华西口腔医学杂志, 1996, 14(2): 141

7 黄永谦, 李秉琦, 张文清, 等. 复发性口疮患者超氧化物歧化酶的临床研究. 华西医科大学学报, 1991, 22(2): 175

8 林梅, 李秉琦, 张文清, 等. 复发性口疮患者血小板聚集功能及其峰值时间测定分析. 实用口腔医学杂志, 1990, 6(1): 27

(1997- 08- 28 收稿)

## Quantitative Analysis on Platelets Cytosolic Free Calcium Concentration and Ulcerous Tissue Calcium in Patients with Recurrent Aphthous Ulceration

Huang Shenggao, Lin Tianyou, Wu Hanjiang, et al

Department of Stomatology, the Second Clinical College, Hunan Medical University

### Abstract

To study the relationship between the abnormal behavior of calcium ( $Ca^{2+}$ ) and the pathogenesis of recurrent aphthous ulceration (RAU) by measuring quantitatively the concentration of platelets' cytosolic free calcium ions ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and tissue calcium ( $W_{Ca^{2+}}$ ), the patients with RAU ( $n=50$ ) and the healthy volunteers ( $n=30$ ) were chosen randomly. Then platelets  $[Ca^{2+}]_i$  was determined in calcium fluorescent indicator Fura-2/AM loaded washed platelets by spectrofluorophotometer and tissue  $W_{Ca^{2+}}$  was measured quantitatively by OCPC autoanalyzer method. The results showed that the concentration levels of platelets  $[Ca^{2+}]_i$  in patients with RAU in attack stage and attack-free stage were significantly higher than that of the control group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), and the concentration level of the ulcerous tissue  $W_{Ca^{2+}}$  was also obviously higher than that of the normal control group ( $P < 0.001$ ). There was a significantly positive correlation between the platelets  $[Ca^{2+}]_i$  and the ulcerous tissue  $W_{Ca^{2+}}$  ( $P < 0.01$ ). The results suggested that the influx disorder and overload of  $Ca^{2+}$  might play an important role in the pathogenesis of RAU.

**Key words:** recurrent aphthous ulceration calcium calcium overload platelet