

口腔粘膜下纤维性变患者外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换率研究

凌天牖 黄生高 唐杰清

摘要 采用BrdU-Giemsa染色法检测了湖南湘潭地区居民中有咀嚼槟榔习惯的口腔粘膜下纤维性变(OSF)患者27人,有咀嚼槟榔习惯但未患OSF的健康者14人,无咀嚼槟榔习惯的正常人44名的外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换率(SCE率)。结果显示:有咀嚼槟榔习惯者SCE频率显著高于无咀嚼槟榔习惯者($P < 0.001$);患OSF者SCE频率显著高于健康者($P < 0.001$)。此研究提示了槟榔咀嚼物中含有某些致突变或恶变成份,咀嚼槟榔习惯可严重影响染色体的稳定性;OSF为一种癌前状态,其发生可能具有一定的遗传背景或易感性。

关键词 口腔粘膜下纤维性变 姐妹染色单体交换率 淋巴细胞 槟榔

人体外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换(sister chromatid exchange, SCE)频率作为衡量体细胞染色体稳定性及某些化学物质致突变或致恶性变的灵敏指标已被广泛采用¹。SCE频率BrdU-Giemsa染色检测法是一种简便、快速、灵敏的方法^{2,3}。本文采用该法对我国湘潭地区居民特定人群外周血淋巴细胞SCE频率进行检测,以考察该地区居民中口腔粘膜下纤维性变(OSF)患者染色体自身稳定性及咀嚼槟榔习惯对SCE频率的影响。

1 临床资料和方法

1.1 病例选择与分组

OSF患病组:有咀嚼槟榔习惯,无烟酒嗜好,近期内无病毒感染及放射性物质接触史,3个月内未用过影响染色体复制分裂及血液生理状态等类药物,经临床及组织病理确诊为OSF而无其它系统性疾病者,共27例(男性20例,女性7例);平均年龄38岁(20~54岁);咀嚼槟榔日平均8瓣(4~20瓣),时间6.3年(0.5~14年)。

健康组:有咀嚼槟榔习惯,临床及组织病理诊断排除OSF者,其余要求同上,共14例(男性11例,女性3例);平均年龄39岁(21~50岁);咀嚼槟榔日平均7.8瓣(2~17瓣),时间6.8年(0.5~16年)。

正常组:无咀嚼槟榔习惯,临床及病理诊断排除OSF者,其余要求同上,共44例(男性32例,女性11例);平均年龄40岁(18~56岁)。

1.2 方法

1.2.1 样本采集与制备 抽取肘静脉血0.5ml,肝素抗凝,加入含20%的小牛血清、PHA 2mg(广州生物制品所)的RPMI-1640培养液4.5ml及适量BrdU(Serua公司),使

其终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 37℃避光培养72h,加秋水仙碱适量,使其终浓度为 $0.05 \mu\text{g/ml}$,3.5h后常规收获细胞和制片。

1.2.2 分化染色 将上述标本在37℃温箱孵化过夜后,将玻片放在40℃水浴箱铝板上覆盖 $2 \times \text{SSC}$ 液(0.3 mol/L NaCl , 0.03 mol/L 柠檬酸钠, $\text{pH} 7.0$),紫外线照射10min,去离子水漂洗玻片,5%Giemsa染色。

1.2.3 观察计数 选择分散良好,姐妹染色单体着色清晰,每个细胞具有46条染色单体的第二有丝分裂中期细胞,观察计数。每一末端交换算作一次交换,长臂或短臂中间交换算作两次交换,每标本共观察30个细胞,以平均每个细胞姐妹染色单体SCE的次数作为该标本的SCE频率。

1.2.4 统计学处理 成组t检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

细胞分散良好,姐妹染色单体清晰可辨,SCE显示明显,各组均可见SCE,但SCE频率不同,各组间有显著性差异。结果见附表。

附表 三组外周血淋巴细胞SCE频率比较

组别	n	SCE 频率 ($\bar{x} \pm s$, 次/细胞)
正常组(a)	44	6.35 ± 0.28
健康组(b)	14	$9.31 \pm 1.33^*$
OSF患病组(c)	27	$13.85 \pm 2.76^{* \#}$

* b与a,c与a比较: $P < 0.001$; # c与b比较: $P < 0.001$

3 讨论

SCE是指DNA复制产物在姐妹染色单体之

作者单位:410011 湖南医科大学附属第二医院口腔科(凌天牖,黄生高),湘潭市中西医结合口腔医院(唐杰清)

间同源位点上的交换,可直接反映染色体脆性及染色体受损伤程度,目前已广泛用于癌前状态、癌前病变患者的染色体监测及化学致突变或致癌物质的筛选^{1,4~6}。OSF属于癌前状态已较明确,其发生与咀嚼槟榔习惯相关,国外有作者已对某些OSF患者的外周血淋巴细胞SCE频率进行检测,结果发现SCE频率显著升高⁷。

本研究发现:湘潭地区有咀嚼槟榔习惯的OSF患者及有咀嚼槟榔习惯但未患OSF的健康者SCE频率均显著高于无咀嚼槟榔习惯的正常人的SCE频率($P < 0.001$),与Ghosh等⁷报道相近。这提示:咀嚼的槟榔物中确含有某些致突变或致恶变成分,咀嚼槟榔可影响染色体稳定性而影响SCE频率。本文由于没有对槟榔成份及其添加剂加以区别考察,所以究竟是什么成份起作用尚不能肯定,须进一步研究。另外,本研究进一步发现:OSF患者SCE频率亦显著高于有咀嚼槟榔习惯的健康者的SCE频率($P < 0.001$),这表明OSF发生具有一定的遗传背景或易感性,OSF易感人群体细胞染色体本身可能就欠稳定,修复能力低下,在受到外界因素如咀嚼槟榔的刺激时,更易发病。这与Conniff等⁸的研究相吻合。Conniff曾检查了44例OSF患者的HLA抗原,发现其HLA-A₁₀,B₇,DR₃,DR₇₂以及单倍型A₁₀/DR₃,B₈/DR₃,A₁₀/B₇表达异常增高,故认为OSF发生存在着一定的遗传背景或易感性,或与自身免疫紊乱有关。另一方面说明,OSF确属于一种癌前状态,根据Kundson癌发生的二次突变学

说,一个正常体细胞转变为癌细胞必须经历两次突变,对于染色体不稳定如SCE频率显著升高的个体来说,其发生二次突变而恶性转化的可能性明显增加。因此,对OSF患者体细胞(外周血淋巴细胞)SCE频率进行监测,可为OSF患者的预后及癌变的追踪观察提供有意义的线索。

4 参考文献

- 1 朱世能主编 肿瘤基础理论 上海:上海科学出版社,1986:43
- 2 Wolff S, Perry P. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma*, 1974, 48: 341
- 3 Wolff S. Sister chromatid exchange. *Annu Rev Genet*, 1977, 11: 183
- 4 Ghosh R, Shama JK, Ghosh PK. Sister chromatid exchanges in the lymphocytes of patients with oral leukoplakia. *Cancer Genet Cytogenet*, 1988, 36: 177
- 5 Livingstone GK, Fineman RM. Correlation of human lymphocyte SCE frequency with smoking history. *Mutat Res*, 1983, 119: 59
- 6 Meiyin C, Jivjin X, Xianting Z. Comparative studies on spontaneous and mitomycin-c induced sister chromatid exchanges in smokers and non-smokers. *Mutat Res*, 1982, 105: 195
- 7 Ghosh PK, Madhavi R, Gunter M, et al. Sister chromatid exchanges in patients with oral submucous fibrosis. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990, 44: 197
- 8 Conniff JP. HLA-typing in oral submucous fibrosis. *Tissue Antigens*, 1985, 26: 138

(1996-07-10 收稿)

A Study on the Frequency of Sister Chromatid Exchanges in Patients with Oral Submucous Fibrosis in Peripheral Blood Lymphocytes

L in Tianyou, Huang Shenggao, Tang Jieqing

Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital, Hunan Medical University

Abstract

The frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) in peripheral blood lymphocytes in the patients (n=27) with oral submucous fibrosis (OSF) with the habit of chewing areca nuts were determined by BrdU-Giemsa staining. The healthy persons (n=14) with the same habit and the normal controls without the habit (n=44) were studied at the same time. The results showed that the frequency of SCEs in the first two groups were obviously higher than that in the last one ($P < 0.001$). The frequency of SCEs in the patients were also higher than that of the healthy persons with the habit ($P < 0.001$). These suggest that there are some substances in the areca nuts which can induce the mutation and/or malignant transformation of cells. The habit of chewing areca nuts might seriously disturb the stability of chromosome. OSF is a precancer condition. The occurrence of it perhaps has some hereditary background or genetic susceptibility.

Key words: oral submucous fibrosis frequency of sister chromatid exchanges lymphocyte areca nut