

## 基础研究 ·

## 口腔粘膜白斑组织中上皮细胞凋亡的实验研究

王勤涛 朱萧玲 周 威 董广英 袁乃梅

【摘要】 目的 观察和比较口腔粘膜白斑(LK)病变和正常对照的局部活检粘膜组织中上皮细胞凋亡和增殖的情况。方法 应用原位末端转移酶标记技术和ABC免疫组化技术,通过组织学定位、相对染色强度和阳性细胞计数来评估上皮细胞凋亡和增殖细胞核抗原的变化程度及主要部位。结果 与对照相比,LK病变中凋亡阳性信号在棘细胞层较强,而增殖细胞核抗原则在基底细胞层及其周围呈现强阳性反应,病变组织固有层中浸润的部分炎细胞和血管内皮细胞也表达出较强的阳性凋亡信号。病变组和对照组阳性细胞计数有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论 白斑病变时上皮层棘细胞凋亡增强,而基底细胞的增殖能力活跃,该处局部组织的免疫防御能力可能有所下降。

【关键词】 细胞凋亡; 口腔粘膜白斑; 原位末端转移酶标记技术; 增殖

## An Experimental Study of Apoptosis in Epithelia of Oral Leukoplakia

WANG Qintao, ZHU Xiaoling, ZHOU Wei, et al. (Department of Periodontology and Oral Medicine, College of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 **Objective** The purpose of this study was to investigate the relationship between apoptosis and proliferation of oral mucosa in lesions of leukoplakia and the role of apoptosis in the pathogenesis of this common oral disease. **Methods** The mucosa was obtained from the leukoplakia lesions from 6 patients, with average age of 57 years, and all the patients had not received any treatment before this investigation. The lesions were located on the lip (1), gingiva (1), tongue (2) and buccal mucosa (2). All the patients did not have any systemic diseases. Other three normal oral mucosa tissues were collected as the control. In situ terminal deoxynucleotidyl transferase end-labeling (TUNEL) and avidin-biotin peroxidase complex (ABC) immunohistochemical assay were used to detect single-strand DNA breaks and proliferating cell nuclear antigens (PCNA). The negative control slides were treated with the tris saline buffer to substitute the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and PCNA-Ab in the assay. Five consecutive high power fields with the magnification of 400 were used to search for positive stained keratinocytes. **Results** Compared with the normal mucosa, the keratinocytes in leukoplakia showed positive apoptotic signals in the nucleus of suprabasal epithelial layers, while PCNA-positive stain was present in the basal position. In the connective tissue, positive apoptotic signals were found in lymphocytes and the endothelia of blood vessels. **Conclusion** The results indicate that the death of cells in leukoplakia is partly due to apoptosis which may play an important role in the genesis of oral leukoplakia.

【Key words】 apoptosis; oral mucosa leukoplakia; terminal deoxynucleotidyl transferase end-labeling; proliferation

目前观点认为,细胞的死亡是以两种不同的机制进行的,一种方式是坏死,另一种方式就是细胞凋亡;前者往往是由于生理条件发生明显改变(如高温、缺氧等)所致,多伴随较重的组织损伤和炎症性反应;后者则可在正常生理状态下发生(细胞自杀),会出现一些特征性的生化和形态学的细胞改变<sup>1~4</sup>。本试验通过观察口腔白斑(leukoplakia, LK)病变粘膜组织中上皮细胞凋亡的情况,初步分析其可能的病理学基础和影响。

## 1 材料和方法

## 1.1 临床资料

6例LK,性别各半,年龄50~65岁(平均57岁),平均病程7年;主要表现为粘膜表面略隆起的白色斑块,界限清楚,分别位于颊部2例、舌部2例、牙龈1例、唇部1例;其中颊部1例和舌部1例后来发生癌变。

所有病例均无确切的全身系统性疾病,病损均局限于口腔粘膜内;所有病例均活检取材制作石蜡切片;常规组织病理报告与临床诊断相符。

另取3例正常口腔粘膜做为对照。

## 1.2 原位杂交

选择原位细胞死亡检测试剂盒(Oncor公司,美国),采用原位末端转移酶标记技术(in situ terminal deoxynucleotidyl trans-

ferase end-labeling, TUNEL), 碱性磷酸酶显色, 检测组织单细胞的凋亡情况。阴性对照为用 Tris 缓冲生理盐水 (Tris buffered saline, TBS) 替代末端脱氧核苷转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)。

### 1.3 免疫组化

选择增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、单克隆抗体 (DAKO 公司), 采用 ABC 免疫组化技术 (avidin biotin peroxidase complex), 二氨基联苯氨 (diaminobezidin, DAB) 显色, 检测上皮组织细胞的增殖情况。阴性对照为用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 替代一抗。

### 1.4 计数和统计分析

每例标本高倍镜下选择 5 个视野, 用计数网格测定和记录阳性细胞数量, 用 SPSS10.0 软件分组作统计学  $t$  检验分析, 比较差异。

## 2 结 果

### 2.1 基本病理学改变

LK: 上皮过角化, 棘层肥厚, 钉突肥大伸长, 部分细胞表现为不典型增生, 固有层慢性炎细胞浸润。

### 2.2 原位杂交 (细胞凋亡)

阳性反应为细胞核呈分布均匀的深蓝色染色。

LK: 阳性反应细胞数量增多, 在棘细胞全层中均有较多分布, 固有层部分炎细胞和血管内皮细胞也呈现有阳性反应信号, 见图 1。

对照: 阳性细胞较少, 主要位于较深部的棘细胞层中, 固有层少见阳性反应信号, 见图 2。

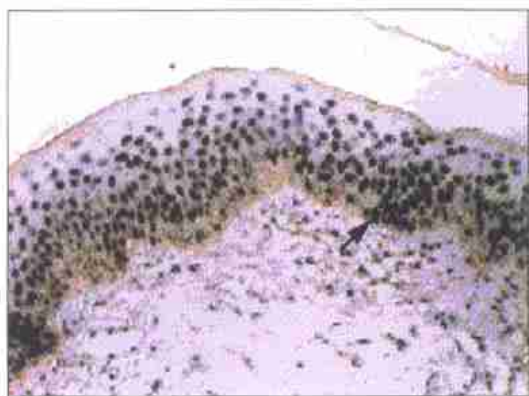


图 1 箭头示 LK 病损上皮全层中阳性反应信号强 碱性磷酸酶显色  $\times 33$

Fig 1 More stronger positive apoptotic signals are scattered all the epithelia in the LK (arrow) alkaline phosphatase staining  $\times 33$

### 2.3 免疫组化 (细胞增殖)

阳性反应为细胞核呈分布均匀的深棕褐色染色。

LK: 基底层细胞和紧贴基底层细胞 PCNA 阳性细胞明显增多, 排列致密, 染色较强, 见图 3。

对照: 部分基底细胞及基底旁细胞有 PCNA 阳性反应, 见图 4。

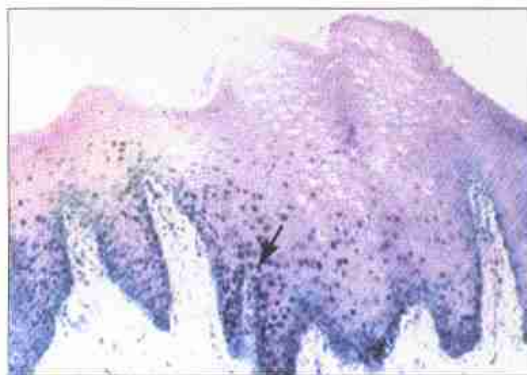


图 2 箭头示对照者上皮层阳性反应信号弱且局限 碱性磷酸酶显色  $\times 33$

Fig 2 Positive signals are located in the suprabasal area in the control (arrow) alkaline phosphatase staining  $\times 33$



图 3 箭头示 LK 病损上皮基底区 PCNA 阳性细胞增多 二氨基联苯胺显色  $\times 33$

Fig 3 More PCNA positive signals can be seen in the basal layer of LK (arrow) DAB staining  $\times 33$



图 4 箭头示对照者 PCNA 阳性细胞相对较少 二氨基联苯胺显色  $\times 33$

Fig 4 Relative less PCNA positive cells in the basal layer of control (arrow) DAB staining  $\times 33$

### 2.4 阳性细胞计数结果

阳性细胞计数结果见表 1。从表 1 可见, 凋亡细胞和增殖细胞在白斑组明显高于对照组。

表1 阳性细胞计数结果

Tab 1 Positive cells counting results

计数对象	白斑组	对照组
凋亡细胞	126.5 ±33.4 *	78.7 ±8.0
增殖细胞	119.7 ±27.1 *	72.0 ±10.8

\* 示与对照组相比  $P < 0.05$ 

### 3 讨 论

正常生理状态下,机体保持着自身细胞增殖与细胞凋亡之间的动态平衡,即细胞为了维持自身内环境的稳定,如机体不再需要某类细胞或当某些细胞受到较严重的损伤后,就会发生程序性细胞死亡——即细胞凋亡;这是一种主动耗能的多种基因参与调控的自我毁灭过程,其易感性决定于多种凋亡相关基因表达产物的水平和相互作用。对细胞凋亡过程及其基因产物的影响、调控机制的研究将对深入认识不同疾病如肿瘤、免疫功能异常、炎症性反应等有着积极的意义<sup>5-7</sup>。

一般的 HE(hematoxylin and eosin staining, 苏木精—伊红染色)染色很难从形态上区分细胞的凋亡与坏死;当细胞发生凋亡后,细胞核 DNA 断裂为 180 ~ 200 bp 的片段从而形成缺口。TUNEL 测试法即利用带有标记物的 DNA 进行填补,再经一系列免疫反应显示出来从而检测凋亡细胞中 DNA 的断裂情况,并由此评价整体细胞的凋亡状况,它从生化角度而非形态学改变表明凋亡的发生;与电镜相比,这种方法相对简便价廉,且可应用于经常规处理的组织标本的检测<sup>8,9</sup>。

粘膜的完整性即依赖于上皮细胞增殖与凋亡之间的相互平衡作用来维持。本实验结果显示:与正常对照相比,LK病变所表现的阳性信号在棘细胞层较强、较多,而 PCNA 则显示在基底细胞层及其周围呈现强阳性反应,说明增殖和凋亡机制在 LK 病变中均有影响,但作用部位和细胞类型有所差别;虽然棘细胞层中的凋亡细胞数量较对照组增多,但基底细胞的增殖能力同时更为活跃,使得组织的自我更新能力增强,导致凋亡和增殖之间的平衡被打破,相应的即可能表现出临床上的上皮增生变厚。病变粘膜组织固有层中浸润的部分炎细胞和血管内皮细胞也表达出较强的阳性凋亡信号,推测白斑的发生可能也与该处局部组织的免疫防御能力下降有关。

然而,细胞凋亡是一种复杂的、由基因调控的细

胞死亡方式,一些结构上或功能上有同源性的基因产物和细胞表面受体(如 Bcl-2, Bcl-x, Bax, Fas, Fas-L, p53 等),通过部位特异性和细胞特异性参与介导这一过程,发挥着抑制或诱导刺激效应;这些凋亡相关蛋白在口腔粘膜病变中的表达和功能尚待深入研究<sup>10-12</sup>。因此,本实验观察仅是一个探索性的起步,提示在口腔粘膜白斑病变中有细胞凋亡过程的存在和变化,但凋亡相关蛋白和基因在此过程中的表现和调控作用研究尚不明确,笔者拟进一步研究这些凋亡相关蛋白与不同粘膜病变组织细胞凋亡或增殖的相互关系和调控影响,这将为治疗和预防相关疾病的发生有所裨益。

(致谢:本实验得到我院组织病理学教研室金岩教授的指导,特表感谢!)

### 参考文献

- 1 李晓丹,李 进. 细胞凋亡. 国外医学生理、病理科学与临床分册,1997,17(3):231-234
- 2 Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of number in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer Metastasis Rev,1992,11(2):95-103
- 3 Wyllie AH. Apoptosis. Br J Cancer,1993,67(2):205-209
- 4 Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. Am J Pathol, 1995,146(1):3-15
- 5 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, et al. Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers. J Physiol Pharmacol, 1999,50(2):211
- 6 Anti M, Armuzzi A, Gasbarrini G. Epithelial cell turnover and apoptosis. Ital J Gastroenterol Hepatol,1998,30(Suppl 3):S276
- 7 Metcalfe A, Streuli C. Epithelial apoptosis. Bioessays, 1997,19(8):711
- 8 王剑波,李 青,马福成,等. 原位末端标记法检测凋零细胞. 第四军医大学学报,1996,17(3):211-212
- 9 仇红刚,王景明. 细胞凋亡 DNA 检测技术概况. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1997,18(1):12-14
- 10 Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. Arch Pathol Lab Med, 1998,122(4):310-319
- 11 Chrysomali E, Lozada-Nur F, Dekker NP, et al. Apoptosis in oral erythema multiforme. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,1997,83(2):272-280
- 12 Dekker NP, Lozada-Nur F, Lagenaur LA, et al. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. J Oral Pathol Med,1997,26(4):170-175

(2000-08-28 收稿,2002-06-11 修回)

(本文编辑 王 晴)