

颊粘膜上皮癌前和癌变中细胞凋亡的分析

金 岩 邓志宏

摘要 应用原位末端标记 (ISEL) 方法检测口腔颊部粘膜在正常、炎症、异常增生及鳞癌状态下的细胞凋亡情况。结果表明: 细胞凋亡在正常和炎症上皮中处于一种较稳定和低的程度。异常增生中的凋亡细胞数量最多, 其次为鳞癌, 二者的细胞凋亡较正常和炎症组明显增多。结果表明细胞凋亡在颊粘膜癌前病变和癌变中发挥着重要作用, 与颊癌的发生发展密切相关。

关键词 口腔粘膜 上皮 癌前病变 癌变 细胞凋亡

细胞的死亡分为凋亡和坏死两种类型。细胞凋亡是一种由基因控制的一种不同于坏死的细胞程序性细胞死亡, 在保持组织器官的活力、维持组织细胞的结构, 以及肿瘤的发生中发挥着重要的作用¹⁻⁵。但是, 由于细胞凋亡发生的时间短以及在组织中细胞凋亡发生率较低, 因此, 用常规的形态学方法不易发现组织中的凋亡细胞。已有研究显示, 原位末端标记方法可以标记凋亡细胞核内断裂的双链DNA, 因此容易从形态学上检测出凋亡细胞^{6,7}。为了深入了解细胞凋亡在肿瘤中, 尤其是在口腔粘膜上皮癌变中的作用, 本实验通过原位末端标记法对颊粘膜上皮良性、癌前及癌变中的细胞凋亡情况进行了初步的观察。

1 材料和方法

1.1 标本

选用 30 例颊部粘膜标本, 其中包括 4 例正常粘膜上皮 (简称 N), 5 例慢性非特异性炎症 (简称 IF), 5 例异常增生 (简称 DYS), 不同分化程度的鳞癌 16 例 (简称 SCC)。所有标本经 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 切片厚 5 μm。

1.2 原位末端标记方法 (in situ end-labeling, 简称 ISEL)

切片脱蜡入水, 2 × SCC 切片 80 处理 20 min, 水洗。用 1 μg/ml 蛋白酶 K 消化组织切片 15 min, 洗涤终止消化反应。98 °C 下灭活蛋白酶 K 活性, 切片用 buffer A (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0.005% BSA) 洗 5 min × 2。用原位末端标记反应液 (含有标记地高辛的核苷酸混合物、Klenow 酶、buffer A) 孵育组织切片 3 h 后, 再用 buffer A 轻洗 5 min × 3。经 2% 正常羊血清封闭组织 30 min 后, 滴加标记 DIG-AP 抗体 2 h, buffer A 轻洗 5 min × 3。用 NBT/BCIP 显色液暗处理显色后, 切片常规脱水、透明、封片。

阴性对照分别为反应液中不加 Klenow 酶或不加地高辛标记的核苷酸混合物; 阳性对照为一例已证实为阳性的鳞癌标本。

2 结 果

用 ISEL 方法在 N, IF, DYS 及 SCC 中均检测到数量不一的凋亡细胞, 凋亡细胞阳性反应为位于核膜内分布均匀的深蓝色细颗粒。在 N 组中, 凋亡细胞数量较少, 分布散在, 主要位于接近于上皮表层处。IF 中的凋亡细胞分布方式与 N 组基本接近, 随着上皮的增殖和细胞数量的增多, 凋亡细胞数量稍有增多。在 DYS 组中, 凋亡细胞数量明显增多, 阳性着色的细胞散在分布于棘层全层, 也基本为上皮内孤立和散在的细胞, 个别副基底层细胞偶见阳性, 基底层细胞基本为阴性反应 (图 1)。与 DYS 组相比, 除个别 SCC 外, SCC 组的整体凋亡细胞数量有所下降。SCC 中的凋亡细胞数量和分布差异较大, 高分化的鳞癌细胞的阳性着色基本位于基底层和分化末端的角化细胞之间, 中等分化和分化差的鳞癌细胞的阳性着色可见于除基底层外的其它细胞 (图 2)。

3 讨 论

在正常机体内, 细胞凋亡与细胞增生处于一种稳定的平衡状态^{1,3,8}。已证实细胞凋亡在胚胎发育、自身免疫性疾病及维持组织中不断更新的细胞

作者单位: 710032 第四军医大学口腔医学院病理科 (金岩), 第四军医大学西京医院耳鼻喉科 (邓志宏)

数量的恒定中发挥着重要的作用²。在肿瘤的发生发展中,这种细胞凋亡与增殖之间的平衡受到破坏^{5,6}。一些研究发现肿瘤抑制剂或促进剂可以明显地促进或抑制细胞凋亡,从而证实了细胞凋亡与肿瘤的发生密切相关⁷。然而由于不同类型的肿瘤由于其细胞来源或分化程度的不同,因而肿瘤细胞对细胞凋亡的敏感程度不一,而且诱导细胞凋亡发生的机制也不同⁸。目前对在不同的肿瘤,以及癌前病变和癌变中发生细胞凋亡程度的结论不一^{5,9~11}。Isacson等^{5,9}对子宫颈癌和前列腺癌的研究发现,癌前病变及癌变中凋亡细胞大量增多,癌变中的细胞凋亡数量较癌前病变高,而且随着肿瘤恶性程度升高,肿瘤细胞发生凋亡的数量增多。而Tsuji-tani等¹⁰的报道有不同的发现,他们发现癌变周围的腺瘤组织中细胞凋亡的发生率明显高于癌细胞,认为腺瘤转化为癌的过程与细胞凋亡的抑制及增殖活性的提高密切相关。

本实验结果显示,组织中的凋亡细胞是以单个细胞死亡的形式出现,表现为孤立和散在分布。在口腔颊部粘膜鳞癌中的细胞凋亡数量较正常和炎症组明显增多。此外,异常增生作为癌前病变,细胞发生凋亡的数量在所有的病变中最多。因而可见,在正常和炎症中,细胞凋亡可能处于一种较稳定的状态,细胞凋亡出现于接近分化末端的上皮细胞;这样通过基底层细胞的增殖和细胞凋亡的出现以达到维持上皮的正常结构和消除异常和接近分化末端的细胞。但是,在肿瘤发生的早期(如癌前病变),基因调控等因素可能处于严重的紊乱状态,表现为细胞形态上的异常以及凋亡细胞数量的增多。而在癌变确定之后,基因的调控也进入另一种相对稳定的状态,同时细胞凋亡受到一定程度的抑制,因而细胞凋亡的数量有所下降。与正常和炎症相比,颊粘膜上皮发生癌变时细胞凋亡有明显增加。这一结果提示在组织发生恶变时出现了大量的异常细胞,表现为细胞、胞核的结构和形态的异常以及基因的损伤,此时机体通过凋亡细胞来对异常的细胞进行削减,但由于致癌的因素并没有消除以致于细胞凋亡的速度远不及肿瘤细胞增殖的速度,最终导致上皮的癌变。

本研究结果显示了细胞凋亡在口腔粘膜癌前病变和癌变中的作用。但是,细胞凋亡不仅受到生长因子和营养性激素的影响,而且受一些癌基因和

肿瘤抑制基因,如c-myc, bcl-1和p53的调控,此外组织细胞的微环境也可促进和抑制细胞凋亡的发生^{3,7,13}。今后,为了深入了解细胞凋亡的发生机制,以及细胞凋亡在口腔粘膜癌变中的作用,尚需进行综合的了解和分析。作者认为,对细胞凋亡进一步研究将对认识肿瘤发生机制及预防和治疗肿瘤产生深远的影响。

(本文图见中心插页11)

4 参考文献

- 1 Majno G, Joris I Apoptosis, oncosis and necrosis *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 3
- 2 Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*, 1992, 11: 95
- 3 Rodriguez-Tarduchy G, Collins M KL, Garcia I, et al Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis in L-3-dependent hemopoietic cells *J Immunol*, 1992, 149: 535
- 4 Golstein P, Ojcius DM, Young JD-E Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*, 1991, 121(1): 29
- 5 Isacson C, Kessiss TD, Hedrick L, et al Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papilloma virus type *Cancer Res*, 1996, 56: 669
- 6 Czader M, Mazur J, Pettersson M, et al Prognostic significance of proliferative and apoptotic fractions in low grade follicle center cell-derived non-Hodgkin's lymphomas *Cancer*, 1996, 77: 1180
- 7 Liaudet-Coopman EDE, Berchem GJ, Wellstein A. In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma *Clin Cancer Res*, 1997, 3: 179
- 8 Staunton MJ, Gaffney EF. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis *Am J Clin Pathol*, 1995, 103: 300
- 9 Veltri RR, Vukanovic J, Epstein JI, et al Implications of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer *Clin Cancer Res*, 1995, 1: 473
- 10 Tsujitani S, Shirai H, Tatebe S, et al Apoptotic cell death and its relationship to carcinogenesis in colorectal carcinoma *Cancer*, 1996, 77: 1711
- 11 王朝夫, 梁英锐 肝细胞癌凋亡病变的原位末端标记显示 *临床与实验病理学杂志*, 1996, 12(4): 275
- 12 Wijman JH, Jonker RR, Keijzer R, et al A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41(1): 7

13 Diebold J, Baretton G, Felchner M, et al bcl-2 expression, p53 accumulation, and apoptosis in ovarian carcinoma-

mas Am J Clin Pathol, 1996, 105: 341

(1997- 05- 07 收稿)

Analysis of Apoptosis in Premalignant and Malignant Epithelia of Buccal Mucosa

Jin Yan

Department of Oral Pathology, Qindustatological College, the Fourth Military Medical University

Deng Zhihong

Department of Otolaryngology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University

Abstract

To determine the relationship between apoptosis and carcinogenesis of oral mucosa, the distribution patterns of apoptosis in normal (N), inflammation (IF), dysplasia (DYS) and squamous cell carcinoma (SCC) of oral mucosa were evaluated by in situ end-labeling method. Results showed that the apoptosis levels in N and IF were relatively lower and stable, whereas the apoptosis of DYS was the highest one in all observed groups. The apoptosis of DYS and SCC were increased obviously higher than N and IF. The results indicated that apoptosis played an important role in premalignant lesion and malignancy of oral mucosa.

Key words: oral mucosa epithelium premalignant malignant apoptosis

突发性软腭肌功能障碍一例报告

庞松玉 冯向民

突发性软腭肌功能障碍国内文献中尚未查见报道。我科于 1996 年 9 月 10 日门诊收治一例, 报道如下。

患者, 男, 14 岁, 突发性说话含糊不清伴时有呛咳 10 d 余。半月前患者头痛, 发烧, 鼻塞, 流清鼻涕, 经服用“感冒通、红霉素”症状好转。但突然发现说话含糊不清, 呈开放性鼻音, 且声音稍有嘶哑, 吃饭喝水时有呛咳。速到当地县医院耳鼻喉科就诊, 诊断为 1. 急性鼻炎, 2. 咽喉炎, 给予鼻炎康、苍乌合剂、滴鼻净、六神丸治疗, 未见好转, 又来我院口腔科就诊。专科检查: 颌面部发育对称无畸形, 恒牙列⁷⁺⁷/₇₊₇无龋齿, 口腔卫生良好, 牙龈无红肿, 口腔粘膜无异常, 咽部无充血, 扁桃体不大。左侧软腭弓较低, 悬雍垂偏向右侧, 发“啊”声时, 左侧软腭不能上抬, 悬雍垂右偏加重, 右侧软腭上抬正常。间接喉镜检查, 声带无充血水肿, 无结节及息肉,

令发“衣- 衣”声时, 左侧声带麻痹, 内收障碍。左侧咽感觉缺失, 咽反射迟钝, 余未见异常。初步诊断: 左侧软腭肌功能障碍, 给予病毒灵、大青叶合剂、维生素 B₁₂、谷维素口服, 6 d 后症状明显好转, 半月后痊愈。

讨论 作者认为, 患者出现以上临床症状, 可能是副神经的延髓根、迷走神经、舌咽神经受损所致, 是一种延髓麻痹综合症。产生延髓麻痹的病因一般分为三类: 肿瘤、血管压迫和炎症。而此例患者为突发性软腭肌功能障碍, 且又是感冒后发病, 所以, 可能是病毒感染所致。

(1996- 11- 19 收稿, 1997- 05- 27 修回)

作者单位: 272600 山东省梁山县中医院口腔科