

# 槟榔提取液诱发大鼠 口腔粘膜下纤维性变的实验研究

## II. 肥大细胞对胶原代谢的影响

黄生高 凌天牖 吴汉江 李运良 杨秀云 曾庆善 谭爱玲

**摘要** 借助组织化学、生化分析和透射电镜方法,探讨肥大细胞对水溶性槟榔提取液诱发的大鼠口腔粘膜下纤维性变(OSF)的胶原代谢的影响。结果发现:在OSF发生过程中,肥大细胞与成纤维细胞关系密切,其数量明显增多,与同期对照组比较具有显著性差异,且随刺激时间延长而逐渐增加;模型组颊粘膜胶原纤维大量堆积,组织羟脯氨酸含量明显高于同期对照组,且随刺激时间延长而升高;各时期模型组肥大细胞计数与组织羟脯氨酸含量均呈高度正相关;血清总羟脯氨酸含量各期各组间无显著性差异。提示:槟榔某些水溶性成份可能通过激发肥大细胞增殖与活化,干扰组织胶原代谢而诱发OSF。

**关键词** 口腔粘膜下纤维性变 肥大细胞 胶原代谢

近来,许多研究发现在速发性变态反应中起重要作用的肥大细胞(mast cell,MC)与某些组织纤维化疾病关系密切<sup>1-3</sup>。自从Bhat等<sup>4</sup>(1977)发现口腔粘膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)病变组织中MC大量聚集以来,MC在OSF发生中的体内作用机制的研究,国内外均未见详细报道。本文用组织化学、生化分析及透射电镜等手段探讨MC对水溶性槟榔提取液(aqueous areca nut extracts, AANE)诱发的大鼠OSF的胶原代谢的影响。

### 1 材料和方法

标本来源与采集见参考文献5。

MC计数:常规连续切片3张(5 μm),脱蜡至水,0.5%甲苯胺蓝浸染15 min,水洗,0.5%冰醋酸分化直至胞核及颗粒清晰,稍水洗,吹干,透明封固。在高倍镜下(400倍),用每网格面积为0.25 × 10<sup>-2</sup> mm<sup>2</sup>的接目镜测微器测量,算出每单位面积内的MC数。

超微结构观察:将固定组织取出,修块,PBS漂洗,10%锇酸后固定,双蒸水浸洗,0.5%醋酸铀浸染,丙酮分级脱水,Epon 812包埋,修块定位,LKB超薄切片机切片(700~900 Å),捞片,柠檬酸铅复染,H-600透射电镜下观察。

组织总羟脯氨酸(hydroxyproline, HyP)含量测定:参照文献6进行,血清总HyP含量测定:参照文献6进行。

统计学处理:计量资料以均数加减标准差表示,行t检验;MC计数与组织HyP含量关系行相关性分析,α=0.05。

### 2 结果

#### 2.1 MC计数结果

MC在模型组明显增加,与正常对照组及溶剂对照组比较具有极显著性差异,且随刺激时间延长而增加;MC呈多种形态,如圆、卵圆、带状,与间质中其它细胞成份特别是成纤维细胞(fibroblast, FB)关系密切(见表1)。

表1 MC计数结果( $\bar{x} \pm s$ , 个/mm<sup>2</sup>)

组别	12周	16周	22周	28周
A组 (n=5)	13.00 ± 3.12	12.20 ± 2.86	13.80 ± 2.59	12.60 ± 2.88
C组 (n=8)	13.50 ± 3.51	14.38 ± 3.81	14.25 ± 3.49	14.00 ± 3.70
B组 (n=8)	25.75 ± 6.29 <sup>#</sup>	33.75 ± 7.42 <sup>#</sup>	41.25 ± 7.40 <sup>#</sup>	39.16 ± 8.37 <sup>#</sup>

注:## B与A: P < 0.001 B与C: P < 0.001  
\* B组后,前期比较 P < 0.05

#### 2.2 透射电镜观察结果

与正常组及溶剂组相比,模型组组织中MC明显增多;MC胞质中充满明、暗及明暗嵌合3种颗粒;MC与FB关系密切,可见胞膜融合现象,FB胞

作者单位:410011 湖南医科大学第二临床学院口腔科(黄生高,凌天牖,吴汉江,李运良),中心实验室(杨秀云),电镜室(曾庆善,谭爱玲)

质内可见MC颗粒;在MC与FB之间,可见大量排列紊乱的胶原纤维(参考文献5插图2,3)。

### 2.3 组织HyP含量测定结果

与正常对照组及溶剂对照组比较,模型组组织HyP含量均明显增加。具有显著性差异,且随刺激时间延长逐渐升高,停止刺激6周后,HyP含量未明显回落(见表2)。

表2 组织HyP含量测定结果( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{mg}$ )

组别	12周	16周	22周	28周
A组 (n=5)	83.00 ± 6.15	83.54 ± 7.66	83.52 ± 9.18	84.19 ± 8.21
C组 (n=8)	84.80 ± 8.24	85.80 ± 7.97	86.87 ± 9.83	83.04 ± 7.55
B组 (n=8)	105.90 ± 18.70 <sup>#</sup>	135.80 ± 26.31 <sup>#</sup>	178.45 ± 34.65 <sup>#</sup>	169.75 ± 37.78 <sup>#</sup>

# B与A:  $P < 0.05$  B与C:  $P < 0.05$  ## B与A:  $P < 0.01$   
B与C:  $P < 0.01$  \* B组后期与前期  $P < 0.05$

### 2.4 血清总HyP测定结果

血清总HyP含量各期各组间无显著性差异(表3)。

表3 血清总HyP含量测定结果( $\bar{x} \pm s, \text{mmol}/\text{L}$ )

组别	12周	16周	22周	28周
A组 (n=5)	0.177 ± 0.015	0.176 ± 0.016	0.179 ± 0.015	0.176 ± 0.014
C组 (n=8)	0.178 ± 0.015	0.181 ± 0.013	0.185 ± 0.014	0.182 ± 0.013
B组 (n=8)	0.181 ± 0.016	0.184 ± 0.018	0.188 ± 0.017	0.186 ± 0.014

各期各组间比较  $P > 0.05$

### 2.5 不同时期模型组组织HyP含量与MC计数相关分析

各期模型组组织HyP含量与MC计数均呈正相关。12周时  $r = 0.968, P < 0.001$ , 16周时,  $r = 0.942, P < 0.001$ , 22周时  $r = 0.899, P < 0.01$ , 28周时  $r = 0.921, P < 0.01$ 。

## 3 讨论

HyP是胶原蛋白的重要组份。目前所知,除胶原外,仅有3种蛋白质即血清中补体C1q、弹性蛋白、乙酰胆碱脂酶的尾部含有极少量的HyP<sup>8</sup>,因此,测定组织HyP含量可以间接反映胶原的含量。在正常情况下,胶原代谢处于动态平衡中,当其异常增生时,分解速度比合成速度慢,但较正常速度快,胶原分解出的游离HyP或含有HyP的多肽片段,不能被机体再利用而在肝脏中分解和(或)从尿

中排出。因此,测定血尿中的HyP含量可以间接反映胶原的降解水平<sup>9</sup>。本研究结果显示:模型组动物组织HyP均显著高于溶剂对照组及正常对照组,且随刺激时间延长而增加,说明组织中胶原大量堆积;而血清中HyP含量未明显升高,说明AANE可能抑制组织胶原的降解,另外也可能是由于口腔粘膜局部胶原降解量虽然增加,但不足以影响整体胶原代谢水平。

在OSF病理切片中,可见大量炎症细胞浸润(特别在早期阶段),推测在OSF发生发展过程中起作用。以往认为:槟榔有效成份可能通过激发淋巴细胞释放致纤维化淋巴因子如白细胞介素1刺激FB增殖与胶原合成<sup>9-11</sup>。1977年,Bhat等<sup>4</sup>发现OSF病损中MC密度明显增加,推测其在OSF发生发展中起作用。本研究亦发现,受AANE刺激后大鼠颊粘膜组织中MC大量聚集,并且其数量与组织HyP含量呈高度正相关。由于MC数量增加在其它许多器官硬化性疾病中亦可见到,因此,关于MC致纤维化作用的机理已成为各家学者关注的热门课题。1992年,Heard等<sup>2</sup>证实MC能引起培养中的FB失去接触性抑制而增殖,并可增强其对胶原和糖蛋白的合成与分泌,使之在细胞外基质中大量堆积。本研究进一步发现:在AANE诱发的OSF样病损中,MC多呈活化状态且与FB关系密切,在超微结构上表现为:利用伸长扭曲的胞突相互接触;细胞间面对面靠近;细胞局部接触或融合;MC颗粒进入FB胞体内。有研究指出:MC脱颗粒或转颗粒可释放大量的组织胺、肝素、过敏性嗜酸性粒细胞聚化因子(ECF-A)、中性粒细胞趋化因子、慢反应物质(SRS-A)、血小板活化因子、前列腺素、促血栓素等<sup>12</sup>,推测与OSF病损中大量炎症细胞浸润、组织水肿、胶原变性、血管闭塞或扩张、血栓形成等有关,但确切机制尚待进一步探索。

## 4 参考文献

- 1 Irani AM. Mast cell changes in scleroderma presence of MCT cells in the skin and evidence of mast cell activation. *Arthritis Rheum*, 1992, 35: 933
- 2 Heard BE, Dewar A, Corrin B. Apposition of fibroblasts to mast cells and lymphocyte in normal lung and cryptogenic fibrosing alveolitis. Ultrastructure and cell perimeter measurement. *J Pathol*, 1992, 166: 303

3 Takeda K. Increased number of mast cells accompany enhanced collagen synthesis in linear localized scleroderma Arch Dermatol Res, 1989, 281: 288

4 Bhat AP, Dholakiah M. Mast cell density in oral submucous fibrosis J Ind Dent Assoc, 1977, 49: 187

5 黄生高, 凌天牖, 吴汉江, 等. 槟榔提取液诱发大鼠口腔粘膜下纤维性变的实验研究 I. 组织形态学观察 华西口腔医学杂志, 1997, 15(2): 91

6 许志勤, 高兰兴. 组胺羟脯氨酸测定的改进 解放军预防医学杂志, 1990, 8(1): 40

7 李玉林, 李十月, 伍琼. 血清总羟脯氨酸碱水解测定 临床检验杂志, 1988, 6(2): 11

8 李玉瑞主编. 细胞外基质的生物化学及研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 3

9 李衡, 杨艳燕. 血尿羟脯氨酸的测定方法及影响因素 职业卫生, 1986, 13(1): 51

10 Johnson RL. Lymphokine stimulation of collagen accumulation J Clin Invest, 1976, 58: 240

11 Wahl SM, Wahl LM, McCarthy JB. Lymphocyte mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production J Immunol, 1979, 121: 942

12 Li QY, Asma RA, Macaulay MA, et al. The relationship of mast cells and their secreted products to the volume of fibrosis in post transplant hearts Transplant, 1992, 53: 1047

(1996- 12- 16 收稿)

## Experimental Study on Aqueous Areca Nut Extracts Inducing Oral Submucous Fibrosis in Rats

### II. Effect of Mast Cells on Collagen Metabolism

Huang Shenggao, Ling Tianyou, Wu Hanjiang, et al

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

#### Abstract

The effect of mast cells (MC) on collagen metabolism of oral submucous fibrosis (OSF) induced by aqueous areca nut extracts (AANE) in rats was studied by transmission electron microscope, histochemical and biochemical analyses. The results revealed that there was a close relationship between MC and fibroblasts (FB) in the pathogenesis of OSF; MC which appeared in the buccal mucosa in the model groups increased significantly and became more active in the function. A great deal of collagen compacted in the buccal mucosa in the model groups. The contents of tissue hydroxyproline (Hyp) in the model groups were obviously higher than those in the control groups. Moreover, the longer the time of irritation continued, the higher the contents were. The number of MC had a higher positive correlation with the contents of tissue Hyp at the same time. Total serum Hyp had no significant difference among all the groups and any stages. The results indicated that some aqueous components of areca nuts might disturb collagen metabolism by accumulation and activation of MC.

**Key words:** oral submucous fibrosis    mast cell    collagen metabolism

(上接第 93 页)

inflammation, accumulation and disorder of collagen fibre in juxta-epithelial region, along with concomitant muscle degeneration. The lesions didn't reverse obviously themselves after the authors stopped using AANE. Histomorphologic changes didn't appear in any animal of the control groups. The results indicated that the typical and stable OSF animal model were induced rapidly by submucosa injecting and surface painting AANE.

**Key words:** oral submucous fibrosis    aqueous areca nut extracts    histomorphology