

槟榔提取物对口腔粘膜成纤维细胞表达 细胞间粘附分子-1 的影响

冯云枝 凌天麟

摘要 目的:探讨成纤维细胞(FB)与细胞间粘附分子-1(ICAM-1)在口腔粘膜下纤维化(OSF)发生中的可能作用。方法:分别从正常(NM)及 OSF 患者的口腔粘膜中培养出 FB,向培养基中加入不同浓度的槟榔提取物(ANE)培养 48 h 后,用细胞酶联免疫方法检测 FB 表达的 ICAM-1 水平。结果:表示 ICAM-1 水平高低的 OD 值在 OSF-FB 为 0.386 ± 0.099 ,高于 NM-FB 的 OD 值 0.324 ± 0.030 ($P < 0.05$);ANE 在 $50 \sim 150 \mu\text{g/ml}$ 的范围内以浓度—效应依赖关系刺激 FB 产生 ICAM-1。结论:ANE 能上调 FB 表达 ICAM-1 的水平,提示 ICAM-1 及其介导的细胞与细胞或细胞与基质间的相互作用在 OSF 的发生、发展中可能起重要作用。

关键词 成纤维细胞 槟榔提取物 细胞间粘附分子-1 口腔粘膜下纤维化

Effects of Areca Nut Extract on Levels of Intercellular Adhesion and Expression of Oral Fibroblasts

Feng Yunzhi, Ling Tianyou

Department of Stomatology, the Second Xiangya Hospital, Central South University

Abstract

Objective: The study aimed at investigating the effects of areca nut extracts on the levels of ICAM-1 expressed by the oral fibroblasts. **Methods**: The fibroblasts were obtained from normal buccal mucosa and buccal mucosal with submucous fibrosis and cultured in vitro. The levels of ICAM-1 expressed by fibroblasts incubated with/without ANE in the presence of 10% fetal calf serum in the mixed gas of 5% CO₂ and air at 37 °C for 48 h, were monitored using cell-based ELISA. **Results**: The fibroblasts obtained from mucosal with oral submucous fibrosis expressed ICAM-1 at a high level. ANE increased the expression levels of ICAM-1 in both fibroblasts obtained from normal and abnormal mucosa. **Conclusion**: The high expression levels of ICAM-1 in the fibroblasts of oral submucous fibrosis and ANE stimulated the expression of ICAM-1, which may be one of the important mechanisms why lymphocytes become localized and retained at the side of connective tissue during inflammation and lead to activation of fibroblasts.

Key words: fibroblasts areca nut intercellular adhesion oral submucous fibrosis

细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 又称 CD-54, 为单链跨膜糖蛋白, 归属于免疫球蛋白超家族, 可以介导细胞的迁移和激活, 在细胞与细胞或细胞与基质的相互作用中起重要作用, 作为配体分子的 ICAM-1 其相应的受体为淋巴细胞功能相关分子-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)。通过 ICAM-1 与 LFA-1 结合, 使 T 细胞粘附于抗原提呈细胞、内皮

细胞、成纤维细胞和各种靶细胞, 在炎症、免疫反应等病理改变中起很重要作用。细胞与细胞、细胞与基质之间的相互粘附依赖于细胞粘附分子。细胞外基质与细胞间的信号传递有密切关系, 对于细胞分化状态及细胞极性的维持有重要作用。目前认为细胞外基质与细胞间的粘附对炎症反应、纤维化和肿瘤生长等细胞增生和分化过程起着关键作用。各种细胞的 ICAM-1 表达程度有所不同, 正常时 ICAM-1 呈低表达, 在受到刺激时表达增加¹。本研究采用成纤维细胞 (fibroblasts, FB) 体外培养技术,

利用细胞—酶联免疫检测方法 (cell-ELISA), 比较 OSF-FB 和 NM-FB 分泌 ICAM-1 的水平, 观察槟榔提取物 (areca nut extract, ANE) 对 FB 表达 ICAM-1 的影响, 旨在探讨 ICAM-1 是否在口腔粘膜下纤维化 (oral submucous fibrosis, OSF) 的发生中起作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM 培养基 (Gibco), 小牛血清 (杭州四季青生物制品厂), 分散酶 dispase (Gibco), 胰蛋白酶 (Sigma), 鼠抗人 ICAM-1 单克隆抗体 (Zymed 公司, 效价为 1:50), 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (Jackson 公司), 底物 (上海科华公司), 96 孔培养板 (Nunc 公司), Elx312 酶标仪 (美国)。

1.2 方法

1.2.1 ANE 的制备 按照参考文献² 制备。

1.2.2 FB 的培养 选择经临床及病理检查确诊为 OSF 患者 (男 8 例, 女 3 例) 的口腔粘膜作为实验组, 同时从无烟酒、槟榔及辣椒嗜好, 年龄与实验组相匹配的自愿者 (男 6 人, 女 5 人) 取正常口腔粘膜作对照组。新鲜粘膜用含抗菌素的 PBS 充分洗 3 次, 浸泡入 2.4 U/ml dispase 溶液中, 37℃ 消化 2 h 后分开表层上皮及上皮组织, 将上皮组织剪成小块, 用贴壁方法培养 FB, 当细胞从组织块爬出生长并融合后, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代, 用培养的第 3 代 FB 作实验。

1.2.3 ICAM-1 的检测 采用细胞酶联免疫方法检测 FB 表达的 ICAM-1 水平³。将 FB 以 2×10^5 细胞/ml 的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l。培养 5 d 后, 换用含不同浓度 ANE 的条件培养基, ANE 的最终浓度为每毫升 0.5 μ g、50 μ g、100 μ g、150 μ g。培养 48 h 后去除原培养基, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 用 1% 的多聚甲醛固定 15 min, 用含 0.05% Tween 20 的 PBS 洗板 3 次; 用 1% 小牛血清 200 μ l/孔, 封闭 40 min; 加入抗 ICAM-1 单抗 50 μ l/孔 (单抗浓度为 1:50), 37℃ 继续孵育 1 h; 去除一抗, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 加入用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 50 μ l/孔, 37℃ 孵育 1 h, 洗孔, 加入底物 100 μ l (A 液 50 μ l, B 液 50 μ l), 避光反应 10 min, 加入 100 μ l 2 mol/L (1 N) 硫酸终止反应, 选择 450 nm 波段, 在酶联免疫检测仪中测定各孔 OD 值, 记录结果。

1.3 统计学方法

所有实验数据均输入计算机, 应用 SPSS 软件进行数据分析。OD 值采用均数表示, 均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), ANE 与 ICAM-1 水平之间的关系采用直线相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

表示 ICAM-1 水平高低的 OD 值在 OSF-FB 为

0.386 \pm 0.099, 高于 NM-FB 的 OD 值 0.324 \pm 0.030 ($P < 0.05$); ANE 在 50 ~ 150 μ g/ml 的范围内以浓度—效应依赖关系刺激 FB 产生 ICAM-1 (ANE 与 NM-FB 之间的相关系数为 0.952, ANE 与 OSF-FB 之间的相关系数为 0.985)。见表 1。

表 1 OSF-FB 与 NM-FB 表达 ICAM-1 的水平及 ANE 的影响 ($\bar{x} \pm s, OD$)

Tab 1 The levels of ICAM-1 expression in OSF-FB and NM-FB and the effects of ANE ($\bar{x} \pm s, OD$)

ANE (μ g/ml)	OSF-FB	NM-FB
0	0.386 \pm 0.099	0.324 \pm 0.030
5	0.413 \pm 0.060	0.362 \pm 0.024
50	0.488 \pm 0.026 *	0.481 \pm 0.052 *
100	0.532 \pm 0.031 *	0.489 \pm 0.081 *
150	0.602 \pm 0.105 *	0.586 \pm 0.063 *

* 与未加 ANE 组相比, 差异有显著性 $P < 0.05$

3 讨 论

OSF 是一种慢性炎性口腔粘膜疾病, 发生 OSF 的真正原因至今仍不明白, 尽管许多学者通过临床流行病学和实验研究发现咀嚼槟榔习惯与 OSF 发生有关, 但其发病机理仍不明确。OSF 的主要组织学特征为: 上皮萎缩, 上皮钉突减少; 结缔组织层呈玻璃样变性, 胶原纤维过度堆积; 慢性炎性细胞浸润; 60% 的 OSF 患者在固有层有炎性细胞浸润, 包括淋巴细胞、浆细胞、单核细胞及巨噬细胞。

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成增多并过量沉积是 OSF 的重要病理特征之一, 而 ECM 又调节着纤维化过程。Majewski 等⁴ 发现硬皮病原代培养 FB 与 I 型、II 型、III 型胶原及层粘连蛋白、纤维粘连蛋白间的粘附作用增强, 且其合成胶原增多, 提示 ECM-FB 的相互作用与 FB 合成胶原能力有关。ECM-FB 相互作用是由粘附分子介导的, ICAM-1 不仅能介导 ECM-FB 之间的粘附, 且 ICAM-1/LFA-1 的配体/受体作用系统对 FB/淋巴细胞的粘附起重要作用, 这种粘附作用与组织纤维化密切相关, 肝硬化、肺纤维化、动脉粥样硬化及系统性硬皮病患者血清及组织中 ICAM-1 含量均升高, 并且 ICAM-1 的升高是疾病活跃的指征^{5,6}。但有研究显示表达高水平与低水平 ICAM-1 的 FB 均能产生相等的总蛋白和前胶原, 说明 ICAM-1 可能不是直接引起细胞外基质的堆积, 而是通过间接作用

促进纤维化过程。

目前尚无 ICAM-1 与 OSF 发生是否有关的报道,本研究结果发现 OSF-FB 表达的 ICAM-1 水平明显高于正常,且在用 ANE 刺激 FB 后,其 ICAM-1 表达水平呈剂量依赖性升高。说明 ICAM-1 在 OSF 发生中起一定的作用。结合以往的研究,笔者推测咀嚼槟榔的刺激可能引起 FB 表达和分泌较多的 ICAM-1,而 ICAM-1/LFA-1 可介导淋巴细胞与 FB 结合,并且促使淋巴细胞活化,使其产生影响 FB 代谢的细胞因子,如内皮素、转化生长因子等,从而间接促进纤维化过程^{7,8}。明白 ICAM-1 在 OSF 发生起一定作用有重要的临床意义,目前已发现应用抗 LFA-1 抗体能减缓系统性硬皮病的发生,研究能够阻滞特异的粘附分子在 OSF 中的表达,可能会为 OSF 的治疗提供新的途径。

参考文献

- 1 王伟铭,周同,姚建.粘附分子与信号传导.生命科学,1997,9(5):214~217
- 2 冯云枝,凌天胤.槟榔提取物抑制人类口腔粘膜角朊细胞生长的实验研究.华西口腔医学杂志,1999,17(3):233~235

- 3 Noguchi K, Iwasaki K, Shitashige M, et al. Prostaglandin E₂ receptors of the EP and EP subtypes downregulate tumor necrosis factor α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human gingival fibroblasts. J Periodont Res, 1999, 34(4):478~485
- 4 Majewski S, Hunzelmann N, Schirren CG, et al. Increased adhesion of fibroblast from patients with scleroderma to extracellular matrix components in vitro modulation by IFN- γ but not by TGF- β . J Invest Dermatol, 1992, 98(1):667~671
- 5 Blann AD, Seigneur M, Steiner M, et al. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral artery disease and hypercholesterolaemia: relationship to the location of atherosclerotic disease, smoking, and in the prediction of adverse events. Thromb Haemost, 1998, 79(6):1080~1085
- 6 Krasis J, Oschmann P, Engelhardt B, et al. Soluble and cell surface ICAM-1 as markers for disease activity in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand, 1998, 98(2):102~109
- 7 冯云枝,凌天胤.口腔粘膜下纤维性变患者角朊细胞分泌细胞因子水平的变化.华西口腔医学杂志,2000,18(1):23~25
- 8 高义军,凌天胤,吴汉江,等.转化生长因子 β_1 在口腔粘膜下纤维性变角朊细胞中的表达.中华口腔医学杂志,1997,32(4):239~241

(2000-10-12 收稿,2002-02-25 修回)

(本文编辑 王 晴)

第三期“功能性外科在口腔颌面部肿瘤治疗中的应用”讲习班通知

经卫生部批准,由上海第二医科大学口腔医学院口腔颌面外科主办,山西医科大学第二医院口腔科承办的2002年国家继续教育学习班——功能性外科在口腔颌面部肿瘤治疗中的应用(卫生部立项)将于2002年8月9日~13日在山西太原市举办。届时特邀中国工程院院士、上海第二医科大学附属第九人民医院口腔颌面外科邱蔚六教授和第二医科大学附属第九人民医院院长张志愿教授莅临作专题讲座。学习班将对颌面部功能性外科的基本理论进行培训,详细介绍该领域的国内外现状,结合口腔颌面外科临床实例,理论联系实际,进行深入细致的讲解。学习班将讲述:颌颌面外科的现状;上、下颌骨缺损功能性重建的相关问题(包括种植牙部分);功能性舌再造研究进展;软、硬腭缺损再造及语言功能重建的临床研究;颈淋巴清扫术重建斜方肌功能的研究;口腔颌面部恶性肿瘤术后生存质量的评价;参观手术(视情况而定)。参加者可获一类学分10分。

联系人:金慧兰,王瑜(2002年7月1日前寄回)。联系电话:(0351)3074231-2402;E-mail:dentil@sina.com dentil@sohu.com。地址:山西省太原市五一路382号(邮编030001)。