

口腔黏膜组织结构及 DNA 损伤修复功能的增龄性变化

周红梅 杨 娅 周 敏 郑晓晖 王 智 何志秀 李秉琦

【摘要】目的 研究口腔黏膜组织结构及 DNA 损伤修复功能(以 P53 蛋白表达为指标)的增龄性变化,探讨老年人好发口腔鳞状细胞癌的可能机制。方法 以不同年龄健康人的正常口腔黏膜组织作为实验对象,分别采用常规 HE 染色法和免疫组织化学技术(SP法),研究各组口腔黏膜组织结构特征及 P53 蛋白表达情况,并用半定量法对 SP 染色结果进行判定。结果 随年龄的增长,口腔黏膜组织结构发生系列变化;随年龄增长,口腔黏膜组织中 P53 阳性表达率增高,染色分值也呈上升趋势($P < 0.05$)。结论 口腔黏膜组织结构及 DNA 损伤修复功能的增龄性变化可能是老年人口腔上皮易发生癌变的原因之一。

【关键词】 增龄性变化; 组织结构; P53 蛋白表达; DNA 损伤修复功能; 口腔黏膜

A Study on Age-related Changes of Histological Structure and DNA Repair Capacity in Oral Mucosa

ZHOU Hongmei*, YANG Ya, ZHOU Min, et al. (*Department of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To investigate the age-related changes of histological structure and DNA repair capacity (P53 protein expression) in oral mucous membrane and try to explain why the elders are prone to oral squamous cell carcinoma. **Methods** The routine HE staining and an immunohistochemical technical (SP method) were used respectively to study the changes of histological structure and P53 expression in normal oral mucosa of different age groups. The SP staining results were evaluated by semi-quantity method. **Results** With aging, a series of histological changes were observed in the oral mucosa; With aging, an elevating tendency of P53 protein level emerged in the oral mucosa ($P < 0.05$). **Conclusion** The sensitivity to carcinogenic agents in elder people may be accentuated by the age-related histological changes and DNA repair capacity changes of the normal oral mucosa.

【Key words】 age-related changes; histological structure; P53 protein expression; DNA repair capacity; oral mucosa

“老年人好发上皮鳞状细胞癌”已成为广为关注的问题,学者们曾尝试从基因组稳定性、免疫功能、端粒酶等多角度寻求答案¹,但至今尚未达成共识。由于上皮的组织结构及 DNA 损伤修复功能的变化是上皮是否发生癌变的关键,因此,作者拟从这两个方面的增龄性变化入手,探讨老年人易发口腔鳞状细胞癌的可能机制。有研究显示:p53 基因及其蛋白产物具有重要的 DNA 损伤修复功能,增龄可能导致该功能出现障碍²。根据以上研究结果,本文即选择 P53 蛋白表达作为 DNA 损伤修复功能的指标。

1 材料和方法

1.1 纳入标准和排除标准

选择在四川大学华西口腔医院颌面外科门诊拔牙生牙(需去除软组织者)或在住院部接受整形手术的患者。纳入标准:口腔黏膜组织无明显病变;无严重全身系统性疾病。

排除标准:长期服用抗衰老药物者;正在或近期接受过放疗、化疗者;存在明显口腔疾病者;有遗传病史者。

1.2 材料

共收集正常口腔黏膜组织标本 30 例,取材部位主要为颊部、唇部及牙龈。分为青龄组(<40 岁)、中龄组(40~64 岁)和老龄组(≥65 岁),每组各 10 例。所有标本经 10% 福尔马林固定、石蜡包埋备用。

1.3 方法

组织石蜡块行 5 μm 厚的连续切片,每例选择 2 张切片行常规 HE 染色,光镜下观察黏膜组织结构特征;每例选择 3 张切片行 P53 免疫组织化学染色(SP法),主要试剂如兔抗人

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 30070815)

作者单位:610041 四川大学华西口腔医院口腔黏膜科(周红梅,杨 娅,周 敏,王 智,李秉琦),四川大学华西口腔医院颌面外科(郑晓晖),四川大学华西口腔医院病理科(何志秀)

P53 多克隆抗体、SP 试剂盒等均购自 ZYMED 公司。一抗工作滴度为 1:50,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以 P53 蛋白过表达的乳腺癌标本作为阳性对照,以非免疫牛血清代替一抗作为替代对照。将细胞核出现黄色或棕黄色颗粒的上皮细胞判定为 P53 蛋白染色阳性细胞,采用阳性细胞百分率和染色强度(用染色分值表示)相结合的半定量法来判定染色结果³,所有结果分别由两位病理医师独立评定。

1.4 统计学分析

所有统计处理均在 SPSS 10.0 软件上进行。不同年龄组间 P53 蛋白染色阳性率的比较采用四格表确切概率法,染色分值的比较采用秩和检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 基线比较

将各组基本情况分别进行统计分析(年龄除外),结果显示:3 个组间的标本例数、性别比例、标本来源部位等均无显著性差异。

2.2 口腔黏膜组织结构的增龄性变化

上皮层厚度随年龄增长而逐渐变薄,细胞层次减少,而角化层却增厚,常伴不全角化;基底层细胞形态无明显改变,但胞核皱缩变小,核浆比降低,细胞排列不够规则;上皮钉突变宽、变短,基底膜带变平坦。上述变化主要发生于颊部,唇部的变化则较小。结缔组织层的细胞成分减少,胶原纤维和弹性纤维增加,可形成不规则的粗束,毛细血管网减少。

2.3 口腔黏膜 P53 蛋白表达的增龄性变化

青龄组、中龄组 P53 蛋白染色均呈阴性;老龄组有 3 例阳性反应,阳性染色细胞胞核内有淡棕色颗粒,阳性染色细胞数量少、染色强度较低,散在分布于基底层和副基底层(para-basal cell layers)(图 1)。随年龄增长,口腔黏膜组织中 P53 蛋白阳性表达率增高,染色分值也呈上升趋势(表 1)。



图 1 老龄组口腔黏膜 P53 蛋白阳性染色细胞散在分布于基底层和副基底层 SP 法 $\times 200$

Fig 1 P53 protein positive staining in oral mucosa of the elder group, positive staining cells were scattered in the basal cell layer and para-basal cell layers SP $\times 200$

表 1 各组 P53 蛋白染色阳性率及染色分值比较

(n = 10)

Tab 1 Comparison of P53 protein positive staining rates and staining scores between groups(n = 10)

计算项目	青龄组	中龄组	老龄组
染色阳性率(%)	0	0	30.00*
染色分值	0	0	2.33*

* 与青龄组、中龄组比较 $P < 0.05$

3 讨 论

本实验结果显示:随着年龄的增长,口腔黏膜组织结构也随之发生系列变化,该结果与国外同类研究一致⁴。上述增龄性变化可能导致老年人口腔黏膜发生癌变的危险性增高,推测其原因可能是:口腔黏膜上皮层变薄、基底层细胞排列不够规则,将导致组织对外界刺激的抵抗力降低⁵;口腔黏膜局部免疫网络系统由角质形成细胞、朗格罕细胞、上皮成纤维细胞、T 淋巴细胞和中性粒细胞等共同构成,口腔黏膜组织结构的增龄性变化可能影响其功能的正常发挥⁶;口腔黏膜组织结构的增龄性变化还可能影响细胞基因组的稳定性。由于上述诸方面的综合作用,将使老年人口腔黏膜组织发生鳞状细胞癌的危险性增高。

P53 蛋白有野生型和突变型两种。过去普遍认为:凡是用免疫组织化学技术检测到的 P53 蛋白皆为突变型,而野生型 P53 蛋白呈“免疫组化阴性”。但目前的新观点是:用免疫组化检测到的 P53 蛋白不一定都属突变型,P53 蛋白表达阳性与基因突变间无绝对相关性⁷。进一步研究发现:在正常口腔黏膜组织中,用免疫组化可检测出 P53 蛋白。一方面,如果阳性染色细胞数量少,染色强度较低,且仅限于基底层和副基底层,则认为该类阳性表达的 P53 蛋白应属野生型,这可能是机体的一种生理性代偿反应或应急反应,使体内增多的 DNA 损伤能及时得以修复。另一方面,如果在基底层以上的细胞层检测到 P53 蛋白,且含量较高,则提示 p53 基因的功能可能已出现障碍,甚至有突变的可能⁸。

依据上述观点,本实验老龄组所检出的 P53 蛋白应属野生型,因为该组的阳性染色细胞少,染色强度较低,且仅位于基底层和副基底层。随年龄增长,正常口腔黏膜组织中 P53 蛋白表达水平为什么会呈上升趋势?作者推测:在机体的衰老过程中,口腔黏膜组织内的 DNA 损伤逐渐增多,P53 蛋白调动自身潜

力,代偿性地修复 DNA 损伤,使 DNA 的损伤及修复处于相对平衡的状态,基因组的稳定性基本得以维持,口腔黏膜即表现为健康无病。表面看来,这种 P53 蛋白表达水平的增龄性升高意味着 DNA 损伤修复功能的增强,但实质上却表明 P53 蛋白可能已处于“超负荷”状态。可以假设,一旦 DNA 损伤积累超过了 P53 蛋白的代偿能力,口腔黏膜内过多的 DNA 损伤将难以得到有效修复,基因稳定性下降,细胞恶变率升高,导致老年人发生口腔癌前损害及鳞状细胞癌的危险性明显增高。

综上,口腔黏膜组织结构及 DNA 损伤修复功能的增龄性变化可能是老年人口腔上皮易发生癌变的原因之一。

(本实验得到下列老师的帮助和指导:四川大学华西医院病理科李俸媛,四川大学华西口腔医院病理科吴兰雁、王炼,特此致谢!)

参考文献

1 Depinho RA. The age of cancer. *Nature*, 2000, 408(9): 248-254

- 2 Goukassian D, Ctd F, Yaar M, et al. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J*, 2000, 14(10): 1325-1334
- 3 Brennan PA, Conroy B, Spedding AV. Expression of inducible nitric oxide synthase and p53 in oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000, 90(5): 624-629
- 4 Squier CA, Will MW. The Effect of Aging in Oral Mucosa and Skin. Boca Raton: CRC Press, 1994: 65-74
- 5 邱蔚六,刘正主编. 老年口腔医学. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 231-232
- 6 Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Commun Dent Oral Epidemiol*, 2000, 28(5): 390-398
- 7 Kikigawa A. Immunohistochemical analysis of the p53 tumor suppressor gene product in oral leukoplakia. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 2001, 68(1): 51-59
- 8 Cruz I, Napier SS, van der Waal I, et al. Suprabasal p53 immunorexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol*, 2002, 55(2): 98-104

(2002-12-11 收稿, 2003-04-12 修回)

(本文编辑 刘怡)

超声技术与根管治疗 —— 多彩 P5 及其根管治疗工作尖介绍

早期的超声技术在口腔科的应用仅限于龈上洁治。随着赛特力公司发明压电陶瓷超声技术以及与之相适应的多种工作尖, 超声技术已越来越多地被口腔临床医生应用到更为广泛的领域, 其中根尖倒预备术和根管治疗术中超声的应用已被公认为首选或必备方式。压电陶瓷技术、可宽幅调节的功率范围和特制的工作头是进行各种超声治疗的前提条件。赛特力公司新推出的多彩 P5 则是超声根管治疗的理想设备。

多彩 P5 有专门的根管治疗功率范围, 配合不同治疗尖可以实现超声根管荡洗, 寻找根管口, 根管异物取出(断针, 断桩, 髓石, 旧充填物等), 超声根管充填等等。与洁治不同, 根管治疗时, 由于医生不再是在可视状态下工作, 所以功率输出必须相对较小且精确。多彩 P5 的 4 至 6 档是专用的根管治疗档。有时候, 根据根管治疗的性质或复杂程度不同, 医生需要用到多彩 P5 的扩展功率档位, 向低扩展的有 1 至 3 档, 向高扩展的有 7 至 10 档和 11 至 14 档。众多的功率调节档位使得临床牙医可以从容应对各种病例, 提高治疗成功率。

多彩 P5 有两种配置, 即普及型和专家型, 并分别配有专用根管治疗工作尖。以专家型多彩 P5 为例, 其配置含 4 支适合亚洲人群的超声根管锉(K10, K15, K25, K30), 2 支去根管内异物和探寻根管口的器械(ET20, ET40), 1 支既可去根管内断桩又可做超声根管充填的 SO7, 以及一支去冠取桩并可协助取断针的 5AE。

使用超声锉时应注意: 一定要把锉置于根管内再踩脚闸启动超声, 最细的锉(K10)一定用最小的功率(1 档), 沿根管侧壁作环行运动时不能施加压力, 否则会造成器械折断。

欲了解更详尽的产品信息请致电 010-64657011/2/3/4 或发电子邮件给我们: info@satelec.com.cn 网址: www.satelec.com.cn

(赛特力公司 陈 锋)