

超氧化物歧化酶防治口腔粘膜 炎性损害的动物实验研究 ——炎症介质的动态变化及比较

周红梅 陈谦明 李秉琦 胡 涛 周奇志 罗 刚 赵吉兰

摘要 采用荧光分光光度法和放射免疫法, 研究不同时段炎性组织中炎症介质组胺和前列腺素 E_2 (PGE_2) 的变化特点, 从另一方面了解超氧化物歧化酶(SOD) 防治甲基紫精(PQ) 诱导的口腔粘膜炎症性损害的机理。结果表明: 炎症早期以组胺为主, 中、晚期则以 PGE_2 为主, 二者似产生协同作用。SOD 能使这两种活性物质减少, 推测其机理可能是因为清除了过量 O_2^- 而间接抑制了炎症介质的合成及释放。

关键词 超氧化物歧化酶 口腔粘膜 炎症 组胺 前列腺素 E_2

组胺、前列腺素 E_2 (PGE_2) 是参与并加重炎症反应的重要炎症介质。研究表明: 在角叉菜胶诱发的急性炎症灶中存在大量上述物质¹。而在甲基紫精(PQ) 诱导的金黄地鼠颊囊急性炎症损害组织中, 组胺、 PGE_2 的变化规律如何以及外源性超氧化物歧化酶(SOD) 对其产生何种影响, 正是本实验要解决的问题。这将有助于从另一个方面阐明 SOD 的抗炎机理。

1 材料和方法

1.1 动物实验

将 54 只金黄地鼠随机分成 SOD 组(24 只)、对照组(24 只)、正常组(6 只), 用药方法同参考文献²。饲养至 8 h, 1 d, 3 d, 6 d 时分别处死各组动物, 取典型病变组织放入液氮保存备用。

1.2 组胺测定

样品处理: 取约 0.15 g 组织充分解冻, 吸干水分, 电子天平精确称量, 按 1 : 20 (W/V) 加入 15 mmol/L 三氯醋酸液, 用玻璃匀浆器制成组织匀浆, 3000 r/min 离心 30 min, 取上清液待用。

基本原理: 在一定条件下, 组织上清液中的组胺先被提取到正丁醇中, 然后再使之重提至水相, 并与邻苯二甲醛缩合, 产生强而稳定的荧光物质, 于荧光分光光度计测定之。

主要试剂及仪器: 磷酸组织胺标准液, 正丁醇, 正庚烷(光学纯), 甲醇邻苯二甲醛液, F-510 型荧光分光光度计(日本岛津), 测试条件为 440nm (EM)/360nm (EX)。

具体操作步骤及计算参见参考文献³。

1.3 PGE_2 测定

样品处理: 取约 0.03 g 组织充分解冻, 吸干水分, 精确称量, 置 0.2 ml 无水乙醇和 0.8 ml 生理盐水的混合液中匀浆, 加入 50 μ l 0.1 mol/L HCl 酸化。用乙酸乙酯 5 ml 提取, 低温离心(4℃, 2500 r/min) 20 min, 重复提取和离心两次, 收集提取液用氮气吹干, 置 -40℃ 保存, 待放射免疫(RIA) 测定。

主要试剂及仪器: 3H 标记 PGE_2 药盒(中国医学科学院基础医学研究所药理室), 乙酸乙酯, FJ-2105 型液体闪烁计数器。

RIA 具体操作步骤根据药盒说明进行, 制作标准曲线, 由此计算样品中 PGE_2 含量。

1.4 统计学处理

组内比较采用方差分析, 组间比较采用 t 检验, 全

国家教委博士点专项基金资助课题

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院口腔粘膜病研究室(周红梅, 陈谦明, 李秉琦, 罗 刚), 华西医科大学口腔医学院(胡 涛), 成都中医药大学针灸系中医基础理论研究室(周奇志, 赵吉兰)

部数据均由电子计算机进行统计学处理(统计分析软件: Stata 3. 0, 数据库管理软件: Foxpro 2. 0)。

2 结 果

2.1 组胺含量

各组动物颊囊组织内组胺含量见表 1, 图 1。

表 1 各组动物颊囊组织的组胺含量

		$(\bar{x} \pm s, \text{ng/mg})$			
分组		8 h	1 d	3 d	6 d
SOD 组		2731. 63 ± 615. 66	3556. 17 ± 1149. 13	2922. 32 ± 604. 65	2420. 91 ± 958. 52
对照组		3826. 25 ± 777. 71	2985. 75 ± 649. 99	2459. 81 ± 716. 71	2883. 79 ± 715. 01
正常组					2441. 79 ± 569. 31

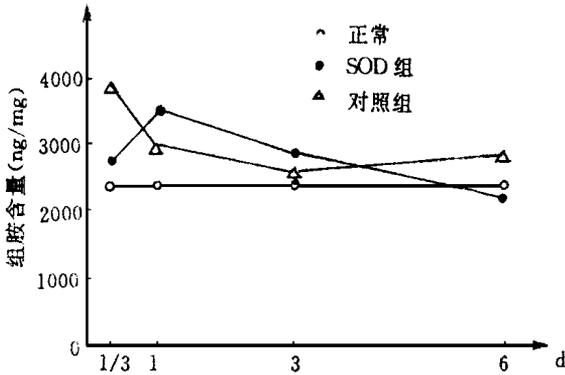


图 1 各组动物颊囊组织组胺含量随时间变化示意图

统计学分析结果: 8 h 组胺含量对照组较 SOD 组及正常组升高, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 对照期内 8 h 与 3 d, 6 d 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其余各组, 各时间段间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.2 PGE₂ 含量

各组动物颊囊组织 PGE₂ 含量如表 2, 图 2 所示。

表 2 各组动物颊囊组织的 PGE₂ 含量 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mg}$)

分组	8 h	1 d	3 d	6 d
SOD 组	30.63 ± 4.64	32.85 ± 7.44	66.99 ± 8.26	24.54 ± 5.86
对照组	27.35 ± 5.10	18.11 ± 5.19	93.16 ± 9.62	99.21 ± 20.59
正常组				23.15 ± 4.30

统计学分析结果: 组间比较: 1 d PGE₂ 含量对照组较 SOD 组低, 3 d, 6 d 对照组分别比相应时间段的 SOD 组及正常组高, 3 d SOD 组也较正常组高, 以上差异均有显著性 ($P < 0.05$); 组内比较: 对照组 3 d, 6 d 与 8 h, 1 d 相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$); SOD 组 3 d 与其它时间段相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。

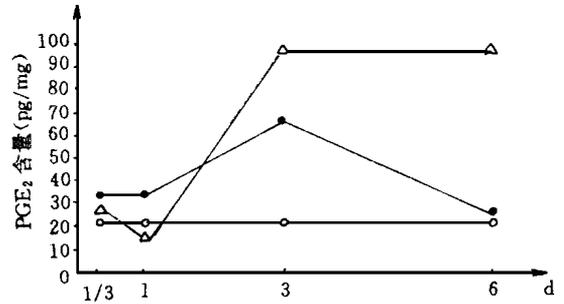


图 2 各组动物颊囊组织 PGE₂ 含量随时间变化示意图

3 讨 论

3.1 组胺的动态变化及意义

通过对结果的综合分析, 组胺的动态变化特点可概括为: 对照组早期 (8 h) 组胺含量最高, 随后逐渐下降接近正常值, 这一变化趋势与文献报道基本一致¹。SOD 组各时间段的组胺值大多在略高于正常值的范围内波动, 其差异无显著性 ($P > 0.05$)。

炎症时, 致炎因子如 O₂ 等方面使贮存于肥大细胞、嗜碱性粒细胞中的组胺大量释放 (贮存型组胺)^{1,4}; 另一方面, 使细胞内组氨酸脱羧酶活性升高, 组胺生成增多 (诱生性组胺)³。贮存型组胺主要有舒张小血管、增强小血管通透性等作用^{1,4}, 一般出现于炎症早期; 而诱生性组胺出现于创伤愈合过程中, 能促进血管新生及组织修复³。由此推测: 对照组早期产生的大量组胺主要是贮存型的, 其致炎作用占主导地位, 与形态学变化如重度水肿、血管扩张、充血等相吻合; 而在第 6 天组胺又出现上升趋势, 可能有诱生性组胺产生, 因为此时形态学上有修复迹象。SOD 组组胺变化不大, 中期似有升高趋势, 结合其形态学改变, 似可推论

SOD 组也有诱生性组胺产生。目前有关 SOD 拮抗组胺释放的机理研究较少, 作者认为 SOD 可能是通过清除致炎因子(O_2^-)而间接抑制了组胺的释放。

3.2 PGE₂ 的动态变化及意义

对照组早期 PGE₂ 在正常值上、下波动, 随后逐渐上升至最大值(6 d); SOD 组 PGE₂ 也呈上升趋势, 至第 3 天达峰值, 第 6 天下降至正常范围。

研究表明 PGs 是一系列重要的炎症介质, 具有使血管扩张、通透性升高, 加强白细胞趋化性等作用。由于炎症时产生的 PGs 多为 PGE₂, PGL₂ 等¹, 所以本文选择 PGE₂ 作为代表进行研究。有学者发现 PGs 浓度与炎症程度和病灶中白细胞数量呈平行关系¹。本实验对照组在 3 d, 6 d 时检出大量 PGE₂, 同时形态学表现为组织坏死、结缔组织水肿、大量白细胞浸润等, 似遵循这一规律。而 3 d SOD 组 PGE₂ 虽明显升高, 但仍低于对照组($P < 0.05$), 这与 SOD 组有炎症改变但比对照组轻微的事实相吻合。然而, 本实验也有矛盾的结果, 1 d 时对照组炎症较重, 但 PGE₂ 却比 SOD 组低($P < 0.05$), 推测其原因可能是: 炎症早期细胞内还原型辅酶 II (NADPH) 被 PQ 竞争, 使细胞膜不饱和脂肪酸的生物合成减少⁵, 从而影响 PGE₂ 的合成。

根据 PGE₂ 合成的途径及机理, 作者试推测 SOD 的作用机理: SOD 清除了大量 O_2^- , 使磷脂酶 A₂ 不易被激活, 减少了 PGs 的前体物质花生四烯酸的释出¹; SOD 可能清除了环加氧酶发挥作用所需的氢过氧化物⁶, 从而

抑制了 PGE₂ 的合成。

3.3 组胺、PGE₂ 的协同作用

在炎症早期, 组胺的作用似较大, 但持续时间短。随着炎症加重, PGE₂ 的作用似逐渐占主导地位, 且持续时间较长, 可见二者在致炎及损伤组织方面产生协同作用¹。然而, 也不能排除其它炎症介质的作用, 因为 1 d 时两个指标均处于较低水平, 但此时炎症反应较剧烈, 说明可能还有其它一些致炎物质参加了本实验 PQ 诱导的炎症过程。

(本文完成曾得到下列同志的协助: 华西医科大学基础同位素室张敏, 华西医科大学公共卫生学院统计教研室兰亚佳, 特此致谢。)

4 参考文献

- 1 毕涉, 高骥援 炎症与抗炎药 北京: 人民卫生出版社, 1993 1~20, 57~59
- 2 周红梅, 陈谦明, 李秉琦, 等 超氧化物歧化酶防治口腔粘膜炎症性损害的动物实验研究——组织病理学特征及定量比较 华西口腔医学杂志, 1996; 14(2) 137
- 3 吴其夏 体液因素和血液循环病理生理学 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1991 25~33
- 4 Beaven MA, Histamine N Engl J Med, 1976; 294 30
- 5 Ogata T, Manado S Correlation between lipid peroxidation and morphological manifestation of paraquat-induced lung injury in rats Arch Toxicol, 1990; 64 7
- 6 Warso MA. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. Br Med Bull, 1983; 39 277

(1996-02-29 收稿)

Protective Effects of Superoxide Dismutase (SOD) Against Paraquat (PQ) - Induced Inflammation in Anilam Oral Mucosa: Kinetic Studies on Inflammatory Mediators

Zhou Hongmei, Chen Qianming, Li Bingqi, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

The purpose of this study was to utilize the spectrofluorometry and radioimmunoassay respectively to assay the

(下转第 150 页)

它文献资料⁵ 都显示 MTT 法是一种有希望的、值得进一步研究、发展的临床恶性肿瘤药敏试验方法。作者正在将 MTT 法应用于口腔癌临床药敏试验, 希望建立一套实用、合理的口腔癌临床药敏试验。

4 参考文献

- 1 韩 锐主编 肿瘤化学预防及药物治疗. 北京 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1991 284, 521~ 522
- 2 Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular

- growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity by assays J Immunol Methods, 1983; 65 55
- 3 Cole S. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer Chemother Pharmacol, 1986; 17 259
- 4 Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia Br J Cancer, 1989; 60 206
- 5 辛华雯, 王润邦, 杜光祖, 等. MTT 法在恶性肿瘤体外药物敏感试验中的临床应用 实用癌症杂志, 1994; 9(2) 73

(1996- 01- 29 收稿)

Human Tongue Cancer Drug Sensitivity Testing in Vitro

Zheng Guangyong, Wang Dazhang

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Izumimata, Anri Suzuki, Kazuko Saito

School of Dentistry at Niigata, the Niigata Dental University

Abstract

The present study was carried out to investigate human tongue cancer (SCC-25 and SCC-9 cell line) drug sensitivity using colorimetric (MTT) assay. The results showed that (1) the order of tongue cancer cells (SCC-25 and SCC-9) drug sensitivity was as follows: CDDP, BLM, MTX, 5-Fu; (2) in the combined drug treatment planning groups the anticancer effect was better than that in the single drug treatment groups ($P < 0.05$). The results suggest that the MTT assay is a useful method for a rapid cancer chemosensitivity assay.

Key words: MTT assay oral cancer chemosensitivity assay

(上接第 147 页)

inflammatory mediators such as histamine and prostaglandin-E₂ (PGE₂) in hamster cheek pouch mucosa in different time. Thus the mechanisms of SOD for its anti-inflammation action could be further understood. The results showed that histamine predominated in the early stage, whereas PGE₂ became more intense during the later periods. The concentrations of these two mediators in the SOD group were lower than those of the control group ($P < 0.05$). The results indicated that SOD might inhibit synthesis and generation of these two inflammatory mediators indirectly by the way of scavenging O₂⁻ in tissues.

Key words: superoxide dismutase oral mucosa inflammation histamine prostaglandin-E₂