

槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞增殖及迁移的影响

李辉莉¹ 方厂云² 苏征³

1. 厦门医学院附属口腔医院儿童口腔科 厦门 361003;

2. 中南大学湘雅医院口腔科 长沙 410078;

3. 首都医科大学附属北京口腔医院牙体牙髓病科 北京 100050

[摘要] 目的 通过观察槟榔碱诱发人类颊黏膜成纤维细胞增殖、迁移能力以及微丝形态的改变,探讨槟榔碱在口腔黏膜下纤维性变(OSF)的致病途径。方法 使用甲噻唑四唑氮(MTT)比色法、划痕法、激光共聚焦扫描显微镜检测不同浓度槟榔碱(5、10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对成纤维细胞增殖、迁移、微丝形态的影响。结果 5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槟榔碱可轻微提高颊黏膜成纤维细胞增殖迁移能力及微丝聚合($P<0.05$); 40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槟榔碱抑制颊黏膜成纤维细胞增殖、迁移能力及微丝解聚($P<0.05$)。结论 槟榔碱改变颊黏膜成纤维细胞增殖、迁移能力及微丝形态分布,可能在口腔黏膜下纤维性变病理过程中起着重要的作用。

[关键词] 槟榔碱; 微丝; 增殖; 迁移

[中图分类号] R 781.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2020027



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Effects of arecoline on proliferation and migration of human buccal mucosal fibroblasts *in vitro* Li Huili¹, Fang Changyun², Su Zheng³. (1. Dept. of Pediatric Dentistry, Stomatological Hospital Affiliated to Xiamen Medical College, Xiamen 361003, China; 2. Dept. of Stomatology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China; 3. Dept. of Endodontics, Hospital of Stomatology, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective** The role of arecoline in the pathogenesis of oral submucous fibrosis (OSF) was explored by investigating the effects of arecoline on the cell proliferation, migration and filament actin of human buccal mucosal fibroblasts *in vitro*. **Methods** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, wound healing assay and laser scanning confocal microscopy were used to detect the effect of arecoline at different concentration (5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for human buccal mucosal fibroblasts proliferation, migration and filament actin. **Results** Cell proliferation, migration and polymerization of filament actin of human buccal mucosal fibroblasts *in vitro* were enhanced by arecoline at lower concentrations (5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($P<0.05$), and inhibited by arecoline at higher concentrations (20, 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ($P<0.05$). **Conclusion** Arecoline may change the proliferation and migration of human buccal mucosal fibroblasts through polymerization of filament actin.

[Key words] arecoline; filament actin; proliferation; migration

目前研究^[1]已证实,槟榔是世界第四广泛流行的精神成瘾物质,仅次于咖啡因、尼古丁及酒精,在亚洲地区,如中国湖南、台湾地区及印度流行范围较广,并有扩展趋势。大量调查^[2-3]显示咀嚼槟榔不仅与口腔疾病紧密联系,如:口腔黏

膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)、白斑、口腔癌,还与食道癌、肝肾疾病等有关。槟榔含有大量生物碱,其中槟榔碱是其主要成分。大量研究^[4-5]证实,槟榔碱重要的致病机制为影响细胞增殖周期、刺激细胞分化、诱导细胞凋亡,但也有研究^[6-7]观察到槟榔碱对某些特定细胞有促进其细胞增殖及迁移的作用。本研究以体外原代培养的颊黏膜成纤维细胞为对象,观察不同浓度槟榔碱导致颊黏膜成纤维细胞增殖、移行能

[收稿日期] 2019-04-08; **[修回日期]** 2019-09-21

[作者简介] 李辉莉,副主任医师,硕士, Email: nancyhuili@163.com

[通信作者] 方厂云,主任医师,博士, Email: biodenti@gmail.com

力及微丝形态的变化,为进一步探明OSF病理途径改变提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

槟榔碱粉剂、改良伊格尔培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)、甲噻唑四唑氮(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma公司,美国),二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(北京Solarbio公司),异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记鬼笔环肽(Fluka公司,瑞士),细胞刮刀(Greiner bio-one公司,德国),6、24、96孔细胞培养板(Costar公司,美国),激光共聚焦扫描显微镜(ZEISS公司,德国)。

1.2 细胞培养鉴定及实验分组

经志愿者知情同意后,上皮组织取自无烟酒及咀嚼槟榔习惯的健康自愿者颊黏膜,组织块法培养颊黏膜成纤维细胞,细胞免疫组织化学法染色进行细胞鉴定。

按照培养液槟榔碱的含量分为6组:对照组成纤维细胞加入含10%胎牛血清DMEM完全培养液,实验组成纤维细胞分别加入含5、10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槟榔碱的10%胎牛血清DMEM完全培养液。

1.3 槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞增殖的影响

MTT比色法:将第4代成纤维细胞制备成细胞悬液后,以每毫升 1×10^4 的密度接种于96孔细胞培养板中,每孔加入200 μL 细胞悬液。

置于细胞培养箱继续培养24 h,吸除上清液,分别加入6组培养液,每浓度槟榔碱设3个复孔,分别在培养12、24、48、72 h时加入MTT溶液($5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.4$)20 μL 继续孵育4 h,弃上清液。每孔加150 μL DMSO液10 min,酶联免疫检测仪测490 nm波长处各孔吸光度值。

1.4 槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞迁移的影响

划痕试验:将第4代成纤维细胞制备成细胞悬液后,以每毫升 2.5×10^4 的密度接种于24孔细胞培养板中,每孔加入2 mL细胞悬液。置细胞培养板于细胞培养箱24 h,单层细胞层融合至90%后换不含血清的培养基培养24 h,细胞刮刀在板底制造横行无细胞带,宽度为4 mm,磷酸缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗培养板2遍,每孔

分别加入6组培养液,每个浓度组设3个复孔。12 h后在光学显微镜下($\times 200$)观察,每孔随机抽取10个视野,计算迁移入划痕区的细胞数量,分别取各组数量平均值。

1.5 槟榔碱对微丝形态及分布的影响

将第4代成纤维细胞制备成细胞悬液后,以每毫升 1×10^5 的密度接种于6孔细胞培养板中(置有多聚赖氨酸的灭菌盖玻片),每孔加入2 mL细胞悬液。置于细胞培养箱继续培养24 h后,吸除上清液, PBS冲洗2遍,加入6组培养液培养24 h。

取出细胞爬片后,使用4%的多聚甲醛固定15 min, PBS冲洗2次,每次3 min, 0.2%聚乙二醇辛基苯基醚破膜10 min,加入FITC标记鬼笔环肽工作液($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 含1% DMSO)每孔50 μL ,在室温下于湿盒内染色40 min,再用PBS冲洗2次,每次5 min, 50%缓冲甘油封固。激光共聚焦扫描显微镜观察各组细胞,镜下显示绿色荧光(激发波长为494 nm,发射波长为518 nm)。

1.6 统计学分析

实验重复3次,采用SPSS 17.0统计软件,单因素方差分析比较多组之间差异, Dunnett *t*检验比较两组间差异, $P<0.05$ 记为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果

光镜下可见成纤维细胞呈长梭形或星形,伸出细长胞质突,为典型成纤维细胞形态。免疫组织化学法染色:抗波形丝蛋白染色呈阳性代表细胞具有成纤维细胞特征,抗角蛋白染色阴性显示未见上皮细胞成分,证实细胞为成纤维细胞(图1、2)。

2.2 不同浓度槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞增殖能力的改变

各浓度槟榔碱作用颊黏膜成纤维细胞12 h,相对于对照组来说, MTT值的差异无统计学意义($P>0.05$)。作用24 h后,浓度为10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槟榔碱促进了细胞的增殖($P<0.05$),而40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槟榔碱则抑制细胞增殖($P<0.05$);作用48 h后,浓度为5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的槟榔碱促进细胞增殖($P<0.05$),而20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槟榔碱组明显抑制细胞增殖($P<0.05$);作用72 h后,各实验组细胞增殖均受到了抑制($P<0.05$)(表1、图3)。

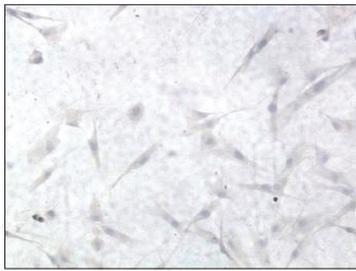


图1 抗角蛋白阴性 免疫组织化学染色 ×100

Fig 1 Negative expression of anti-keratin immunohistochemical staining ×100



图2 抗波形蛋白阳性 免疫组织化学染色 ×100

Fig 2 Positive expression of anti-fibroin immunohistochemical staining ×100

表1 不同浓度槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞增殖活性的影响

Tab 1 Effect of arecoline on the proliferation of human buccal mucosal fibroblasts

浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	作用时间/h			
	12	24	48	72
0	0.080±0.005	0.150±0.027	0.230±0.021	0.348±0.021
5	0.060±0.006	0.186±0.001	0.273±0.006*	0.312±0.021*
10	0.068±0.004	0.194±0.006*	0.275±0.021*	0.319±0.008*
20	0.070±0.003	0.178±0.003*	0.190±0.016*	0.330±0.009*
40	0.079±0.012	0.130±0.002*	0.186±0.004*	0.292±0.006*
80	0.073±0.018	0.078±0.016*	0.077±0.017*	0.218±0.036*

注: *与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

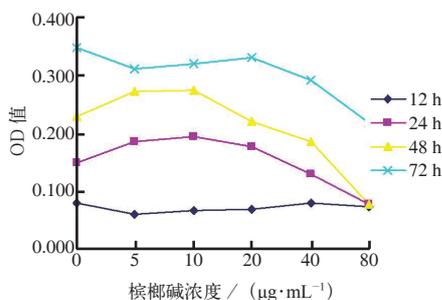


图3 不同浓度槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞增殖活性的影响

Fig 3 Effect of arecoline on the proliferation of human buccal mucosal fibroblasts

2.3 槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞迁移能力的改变

各组移行细胞数分别为: 对照组 (12.07 ± 3.56) 个, $5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 (19.47 ± 5.58) 个, $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组为 (21.90 ± 8.54) 个, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组为 (8.23 ± 3.43) 个, $40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组为 (5.70 ± 2.42) 个, $80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组为 (5.27 ± 2.63) 个 (图4), 各实验组与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

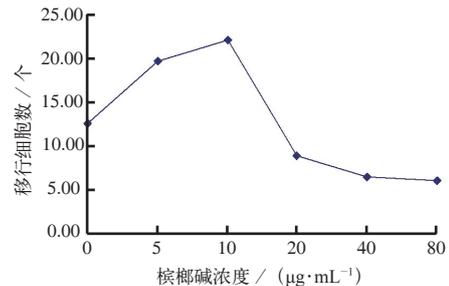


图4 不同浓度槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞迁移能力的影响

Fig 4 Effect of arecoline on the migration of human buccal mucosal fibroblasts

2.4 槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞微丝形态的改变

通过激光共聚焦扫描显微镜, 成纤维细胞微丝呈现绿色荧光。对照组颊黏膜成纤维细胞呈现多角形或星形, 有长短不一伪足突出, 应力纤维呈束状平行排列, 形成网格状结构, 布满整个胞浆、伸入伪足中 (图5A)。 $5、10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槟榔碱孵育颊黏膜成纤维细胞24 h, 细胞呈长梭形, 极性增强, 胞体宽大, 伪足明显增长, 应力纤维粗大, 沿细胞及伪足长轴平行排列 (图5B、C)。 $20、40、80\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槟榔碱实验组, 随着浓度增大, 细胞形态变圆形或椭圆形, 伪足缩短或消失, 应力纤维紊乱, 部分缺如。大量斑点样荧光染色亮点聚集于细胞皮层 (图5D、E、F)。

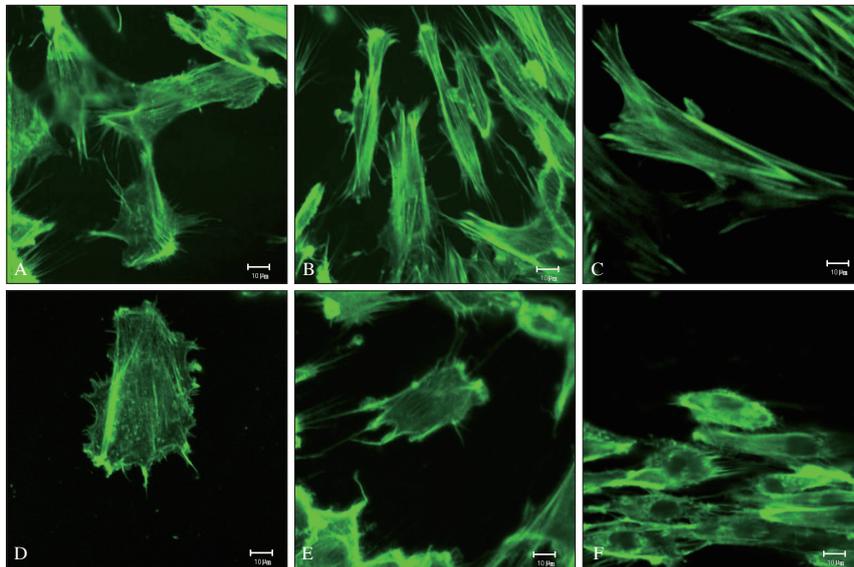
3 讨论

OSF是一种以胶原代谢紊乱为特征的纤维化疾病, 成纤维细胞是病变过程中主要细胞成分, 具有增殖, 合成分解、黏附、迁移等功能。近年来, 关于槟榔碱影响成纤维细胞增殖活性存在较多不同的说法: 有学者^[8-10]证实不同浓度的槟榔碱可浓度依赖性抑制牙龈、牙周、颊黏膜成纤维细胞生长、增殖及胶原合成; 也有学者^[11]发现较低浓度的槟榔碱在较短的持续时间内, 对成纤维细胞具有促进增殖的作用; 还有研究^[12]证实, 槟榔碱对人成纤维细胞在72 h内增殖并无明显抑制。槟

椰碱改变成纤维细胞增殖能力的差异来自于药物浓度区间、作用时间、细胞亚群、细胞分化程度的差异。目前国内外对槟榔碱的研究多集中于高浓度区间槟榔碱对细胞的毒性研究。Cox等^[13]在检测健康志愿者咀嚼槟榔时，唾液槟榔碱含量均超过 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，最高浓度介于 $5.66\sim 97.39 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，且在45 min之内降到 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。故本研究所选取实验组槟榔碱浓度主要集中于 $10\sim 80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，更具有合理性。本实验结果显示：槟榔碱作用12 h，各组细胞未发生明显增殖，推测细胞未达到倍增时间；72 h后，各实验组细胞增殖均呈明显抑制状态，应为槟榔碱长时间作用造成细胞毒性累积所致细胞凋亡；24及48 h细胞增殖趋势相似，低浓度

组细胞增殖率轻微升高、高浓度组细胞增殖率明显降低。提示在纤维化病变早期，槟榔碱促进成纤维细胞增殖及胶原合成，造成胶原堆积；晚期细胞毒性导致成纤维细胞数量减少，吞噬降解胶原能力下降，进一步加剧胶原堆积。在纤维化病变过程中，病变成纤维细胞的迁移有促进作用^[14]。OSF患者的非咀嚼摩擦区，如前庭沟、软腭及舌底常出现同等程度甚至更为严重的纤维化病变，推测可能是由于病变成纤维细胞移行导致。

曾有文献^[10]报道，浓度大于 $62.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的槟榔碱可显著抑制牙龈成纤维细胞移行能力，但对于较低浓度槟榔碱对细胞迁移的研究较少见。



A: 对照组; B: $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; C: $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; D: $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; E: $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; F: $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

图 5 免疫荧光染色后的细胞微丝 $\times 200$

Fig 5 The filament actin of cells after immunofluorescence stain $\times 200$

在迁移实验中，为了避免细胞增殖的影响，计算各组细胞在12 h迁移细胞数目。结果表明 $5、10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槟榔碱可以刺激颊黏膜成纤维细胞移行， $20、40、80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 槟榔碱明显抑制细胞移行能力。这种改变和微丝的改变具有一致性。微丝主要由肌动蛋白组成，广泛存在于各类细胞。微丝通过聚合及解聚状态的转化，影响细胞内信号通路、细胞周期及基因表达的改变，进而影响细胞生长、分化、运动、吞噬能力^[15]。已有报道^[16]显示，不同浓度槟榔碱作用肝癌细胞24 h可显著刺激细胞形成应力纤维，但目前槟榔碱对于成纤维细胞微丝影响的报道较少。本研究中低浓度槟榔碱可刺激微丝聚合，出现束状应力纤维；而较高浓度槟榔碱导致细胞变形，应力纤维紊乱消失，

细胞皮层出现大量荧光斑点，大量微丝解聚。推测成纤维细胞微丝改变可能是OSF致病途径之一。

综上所述，观察到槟榔碱对颊黏膜成纤维细胞的增殖、迁移及微丝形态的影响具有双向性，推测槟榔碱通过影响微丝状态、数量间接导致成纤维细胞增殖、迁移能力发生变化，可能是OSF的致病途径之一，但还需要进一步研究阐明具体作用机制。

4 参考文献

[1] Zdrojewicz Z, Kosowski W, Królikowska N, et al. Betel—the fourth most popular substance in the

- world[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2015, 39(231): 181-185.
- [2] Zhang SS, Li WH, Gao YJ, et al. Betel-quid and oral submucous fibrosis: a cross-sectional study in Hunan province, China[J]. *J Oral Pathol Med*, 2012, 41(10): 748-754.
- [3] Lee CH, Ko YC, Huang HL, et al. The precancer risk of betel quid chewing, tobacco use and alcohol consumption in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis in southern Taiwan[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(3): 366-372.
- [4] 刘健, 凌天牖, 傅润英, 等. 槟榔碱对HaCaT细胞增殖活性及S100A7 mRNA表达的影响[J]. *口腔医学研究*, 2010, 26(5): 664-666, 670.
- Liu J, Ling TY, Fu RY, et al. Effect of arecoline on proliferation and expression of S100A7 mRNA in HaCaT[J]. *J Oral Sci Res*, 2010, 26(5): 664-666, 670.
- [5] Tseng SK, Chang MC, Su CY, et al. Arecoline induced cell cycle arrest, apoptosis, and cytotoxicity to human endothelial cells[J]. *Clin Oral Investig*, 2012, 16(4): 1267-1273.
- [6] 凌宏艳, 杨丝丝, 李兴, 等. 槟榔碱对3T3-L1前脂肪细胞增殖和分化的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41(1): 7-9, 27.
- Ling HY, Yang SS, Li X, et al. Effects of arecoline on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Med Sci J Central South China*, 2013, 41(1): 7-9, 27.
- [7] Harvey W, Scutt A, Meghji S, et al. Stimulation of human buccal mucosa fibroblasts *in vitro* by betel-nut alkaloids[J]. *Arch Oral Biol*, 1986, 31(1): 45-49.
- [8] Chang YC, Tai KW, Lii CK, et al. Cytopathologic effects of arecoline on human gingival fibroblasts *in vitro*[J]. *Clin Oral Investig*, 1999, 3(1): 25-29.
- [9] 王焕玲, 张建平. 槟榔碱对人牙周膜成纤维细胞凋亡的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2017, 25(4): 223-226.
- Wang HL, Zhang JP. Effects of arecoline on apoptosis of human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2017, 25(4): 223-226.
- [10] Jeng JH, Lan WH, Hahn LJ, et al. Inhibition of the migration, attachment, spreading, growth and collagen synthesis of human gingival fibroblasts by arecoline, a major areca alkaloid, *in vitro*[J]. *J Oral Pathol Med*, 1996, 25(7): 371-375.
- [11] Khan I, Pant I, Narra S, et al. Epithelial atrophy in oral submucous fibrosis is mediated by copper (II) and arecoline of areca nut[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(10): 2397-2412.
- [12] Zhou ZS, Li M, Gao F, et al. Arecoline suppresses HaCaT cell proliferation through cell cycle regulatory molecules[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6): 2438-2444.
- [13] Cox S, Vickers ER, Ghu S, et al. Salivary arecoline levels during areca nut chewing in human volunteers[J]. *J Oral Pathol Med*, 2010, 39(6): 465-469.
- [14] Sandulache VC, Parekh A, Li-Korotky H, et al. Prostaglandin E₂ inhibition of keloid fibroblast migration, contraction, and transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen synthesis[J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15(1): 122-133.
- [15] Bugyi B, Carlier MF. Control of actin filament treadmilling in cell motility[J]. *Annu Rev Biophys*, 2010, 39: 449-470.
- [16] Cheng HL, Su SJ, Huang LW, et al. Arecoline induces HA22T/VGH hepatoma cells to undergo anoikis - involvement of STAT3 and RhoA activation[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 126.

(本文编辑 张玉楠)