

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.01.004

· 基础研究 ·

槟榔碱和Ca²⁺对口腔黏膜异常增生上皮体外模型通透性的影响

侯冬兰¹, 陈蓉¹, 高义军¹, 尹晓敏²

1. 中南大学湘雅二医院口腔医疗中心, 湖南长沙(410011); 2. 中南大学湘雅医院口腔医学中心, 湖南长沙(410008)

【摘要】 目的 研究槟榔碱对口腔黏膜异常增生上皮通透性的影响及Ca²⁺对其的调节作用。方法 建立口腔黏膜异常增生上皮体外细胞模型; 设置对照组、槟榔碱处理组及Ca²⁺+槟榔碱处理组, 以荧光黄表观通透系数(P_{app})评价槟榔碱及Ca²⁺对细胞模型通透性的影响。结果 在槟榔碱处理组, 各亚组荧光黄P_{app}均大于相应对照组(P < 0.05), 且荧光黄P_{app}随槟榔碱浓度及干预时间增加而增大(P < 0.05)。在Ca²⁺+槟榔碱处理组, 10 μg/mL 槟榔碱浓度下各亚组荧光黄P_{app}分别比相同浓度和时间点的槟榔碱处理组低(P > 0.05), 4 h 10 μg/mL 小组的荧光黄P_{app}与相应对照组的差异无统计学意义(P > 0.05), 其他各小组荧光黄P_{app}均大于对照组(P < 0.05), 且荧光黄P_{app}随槟榔碱浓度及干预时间增加而增大(P < 0.05)。结论 槟榔碱干预使细胞模型通透性增大, 可能是上皮异常增生组织癌变的重要原因之一, 钙离子预处理使槟榔碱增加上皮通透性的作用减弱。

【关键词】 槟榔碱; 口腔黏膜异常增生上皮; 体外模型; Ca²⁺; 通透性

【中图分类号】 R781.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)01-021-05

【引用著录格式】 侯冬兰, 陈蓉, 高义军, 等. 槟榔碱和Ca²⁺对口腔黏膜异常增生上皮体外模型通透性的影响. 口腔疾病防治, 2017, 25(1): 21-25.

Effects of arecoline and calcium ion on the permeability of dysplastic oral epithelia model *in vitro* HOU Dong-lan¹, CHEN Rong¹, GAO Yi-jun¹, YIN Xiao-min². 1. Oral Medical Center of the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China; 2. Center of Stomatology of Xiangya hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: YIN Xiao-min, Email: yxm6569@163.com, Tel: 0086-731-84327495

【Abstract】 Objective To study the effects of arecoline and Calcium ion (Ca²⁺) on the permeability of dysplastic oral epithelia model *in vitro*. **Methods** To establish the dysplastic oral epithelia model *in vitro* by culturing oral keratinocyte (DOK) and harvesting a DOK cell monolayer. The models were divided into control group, arecoline group and "Ca²⁺+ arecoline" group. The values of Lucifer Yellow P_{app} were used to estimate the permeability changes of models after treated with arecoline and Ca²⁺. **Results** In arecoline group, the lucifer yellow P_{app} values of each subgroup were higher than that of control group (P < 0.05), and the values increased as arecoline concentration elevated and time lasted (P < 0.05). When the "Ca²⁺+ arecoline" group were pretreated with Ca²⁺, the values of subgroup "10 μg/mL" was lower than that of the corresponding arecoline group (P > 0.05). However, the value of subgroup "4 h 10 μg/mL" of "Ca²⁺+ arecoline" group had no statistical difference with that of control group (P > 0.05), while the other subgroups were increased (P < 0.05); Besides, these values in "Ca²⁺+ arecoline" group were increased as the arecoline concentration elevated and time lasted too (P < 0.05). **Conclusion** Intervention of arecoline contributes to the increase of permeability of DOK cell monolayer model, which maybe an important reason for the cancerization of dysplastic oral epithelia, however Ca²⁺ might weaken these effects of arecoline in the process.

【Key words】 Arecoline; Dysplastic oral epithelia; *In vitro* model; Calcium; Permeability

【收稿日期】 2016-05-29; **【修回日期】** 2016-08-12

【基金项目】 湖南省自然科学基金资助项目(14JJ2030)

【作者简介】 侯冬兰, 医师, 硕士, Email: 836150976@qq.com

【通讯作者】 尹晓敏, 副主任医师, 硕士, Email: yxm6569@163.com

在世界上消耗量最大的几种精神活性物质中,以槟榔碱为主要成分的槟榔果排列第四,仅次于烟草、酒和咖啡因^[1]。目前世界范围内有约12亿人咀嚼槟榔^[2],且咀嚼槟榔人群有低龄化趋势。国内调查结果显示,湖南居民槟榔咀嚼率为16.2%。研究表明,咀嚼槟榔与口腔潜在恶性病损口腔黏膜下纤维性变(oral submucous fibrosis, OSF)、口腔黏膜白斑以及口腔癌关系密切^[3]。咀嚼槟榔致病、致癌的前提是槟榔中所含的生物碱(以槟榔碱为主)能顺利通过正常或已经发生病变的口腔黏膜上皮屏障。口腔黏膜上皮屏障对外源性物质具有防御作用,那么槟榔碱是否是通过改变口腔上皮屏障的通透性来达到致病作用呢?如果是,这种影响能否被一些物质减弱,目前相关文献鲜见报道。口腔黏膜异常增生细胞株(dysplastic oral keratinocyte, DOK)来源于舌白斑,该细胞的角蛋白谱与其来源的异常增生组织呈现出惊人的相似,且其染色体组为非整倍体^[4]。本实验通过培养DOK细胞建立DOK细胞上皮模型,体外模拟口腔黏膜异常增生上皮,观察槟榔碱对此模型通透性的影响;并观察在钙离子预处理后,这种影响是否被减弱。从一种新的角度探讨槟榔碱的致癌作用,并为抑制或延缓槟榔相关性疾病癌变寻找新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

DOK细胞株(Sigma公司,美国);DMEM/F-12培养基、青-链霉素双抗及胰蛋白酶-EDTA(Hy-Clone,美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(GIBCO,美国),氢化可的松(天津金耀氨基酸有限公司);HANK'S平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)(北京索莱宝科技有限公司);槟榔碱、氯化钙及荧光黄二钠(Sigma,美国),12孔Transwell™小室(1.2 cm直径,0.4 μm孔径,1.12 cm²生长面积)及96孔细胞培养板(Corning,美国);倒置相差显微镜(TS-100, Nikon,日本),CO₂温箱(Thermo, USA),细胞电位仪(EVOM, WPI,美国),多功能酶标仪(Thermo,美国)。

1.2 溶液配制

精密称取25 mg荧光黄、5.55 g氯化钙及50 mg槟榔碱分别溶于50 mL HBSS(不含酚红)、50 mL蒸馏水及20 mL F12培养基,得到母液浓度分别为500 μg/mL、1 mol/L及2 500 μg/mL的荧光黄溶液、氯化钙溶液、槟榔碱溶液。实验前用相应溶剂稀

释得工作液浓度:荧光黄100 μg/mL,氯化钙2 mmol/mL,槟榔碱10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL,并配制梯度浓度的荧光黄标准液(0.3 ~ 5.0 μg/mL)以供建立标准曲线。

1.3 细胞培养及MTT实验

用含适量FBS、青-链霉素双抗及氢化可的松的DMEM/F-12培养液常规培养DOK细胞。取对数增长期的DOK细胞以 1×10^5 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔100 μL。37℃、5% CO₂培养24 h后吸尽每孔培养液。实验组加含不同浓度槟榔碱的培养液、对照组加不含槟榔碱的培养液100 μL,培养4 h、8 h、12 h后,每孔加MTT液(5 mg/mL)20 μL,继续培养4 h,终止培养,小心吸尽孔内培养液,每孔加入150 μL DMSO,摇床上低速摇晃约10 min。用酶标仪检测490 nm处各孔的光密度值(OD值),计算各组细胞存活率。

1.4 DOK单层细胞模型的建立及紧密性、通透性检测

DOK细胞按 3×10^5 个/mL接种到Transwell™上室聚碳酸酯膜上,隔天换液,CO₂温箱中孵育。定期观察细胞形态,第3天起隔天用EVOM电位仪测每孔跨膜电阻(transepithelial electrical resistances, TEER)。实际跨膜电阻值为接种细胞的小室所测电阻值与未接种细胞的小室所测电阻值之差乘以聚碳酸酯膜面积,即 $TEER = (R - R_0) \times A$ (Ω·cm²)。(R与R₀分别为接种、未接种细胞的小室所测电阻值,A为膜面积1.12 cm²)。

电阻值稳定后进行4 h液面试漏试验:上下室液面高度差为5 mm,4 h后高度差仍为5 mm者为阳性。挑选结果阳性者进行荧光黄通透性试验:吸弃小室内培养基,用预热至37℃的HBSS洗细胞3次,每次20 min;吸弃HBSS,下室加1.5 mL HBSS,上室加0.5 mL荧光黄(100 μg/mL),CO₂温箱中孵育2 h;分别取荧光黄标准液及下室待测样品100 μL至96孔板,用多功能酶标仪检测荧光强度(激发波长427 nm,发射波长536 nm),得出待测样品浓度;根据公式根据公式 $P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$ (cm/s)计算荧光黄在各小室的P_{app}值。P_{app}表示药物转运能力大小,dQ表示dt时间内药物转运量,A为膜面积(1.12 cm²),C₀为上室中药物的初始浓度,P_{app}的单位是cm/s。

1.5 槟榔碱和钙离子对DOK单层细胞模型通透性的影响

1.5.1 实验分组 分为A组(对照组)、B组(槟榔碱处理组)、C组(Ca²⁺+槟榔碱处理组)。A组按干

预时间(4 h、8 h、12 h)分为3个亚组, B、C组按槟榔碱浓度(10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL)及干预时间(4 h、8 h、12 h)不同再各自细分为9个亚组, 共21个亚组, 每组设5个复孔。

1.5.2 实验步骤 ①将建好的DOK单层细胞模型随机分为21个亚组; ②在C组的上、下室分别加入含钙离子2 mmol/mL的培养液0.5 mL和1.5 mL预孵2 h, 2 h后弃去培养液; ③按要求在B、C组加入不同浓度槟榔碱培养液, A组加入不含槟榔碱的培养液, CO₂温箱中孵育; ④分别于4 h、8 h、12 h取出相应亚组, 弃去各组培养液; ⑤按1.4所述方法检测荧光黄P_{app}, 比较各组P_{app}差异以观察槟榔碱和钙离子对DOK单层细胞模型通透性的影响。

1.6 统计学方法

用SPSS 19.0软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性检验采用两独立样本t检验和单因素方差分析。在单因素方差分析中, 若统计结果间差异有统计学意义, 则进一步进行LSD检验或Dunnett t检验。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT法检测槟榔碱细胞毒性结果

本实验MTT结果示: 用浓度为10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL的槟榔碱刺激细胞4 h、8 h、12 h均不会对细胞产生明显毒性作用, 细胞存活率约为100%, 该浓度及处理时间可用于后续实验。

2.2 DOK单层细胞模型紧密性、通透性检测结果

DOK细胞接种于Transwell™后, 约2~3 d可长满, 倒置显微镜下见细胞呈扁平的多角形, 形态略为瘦长, 有些类似于成纤维细胞, 表现出接触抑制, 为单层贴壁生长, 融合成片, 犹如铺路石状(图1)。第9~11天时, TEER值趋于稳定, 约为60 Ω·cm²且4 h液面试漏结果(+)。第9~11天荧光黄表观渗透系数为(2.26 ± 1.18) × 10⁻⁷ cm/s (n = 10)。

2.3 槟榔碱和钙离子对DOK单层细胞模型通透性的影响

2.3.1 槟榔碱处理组 槟榔碱及Ca²⁺+槟榔碱干预后各组DOK单层细胞模型荧光黄P_{app}如表1所示。以10 μg/mL (F = 839.672)、20 μg/mL (F = 107.778)、30 μg/mL (F = 669.572)槟榔碱干预DOK单层细胞模型不同时间后, 总体差异均有统计学意义 (P < 0.05), 各亚组荧光黄P_{app}均大于相应正常对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.001)。

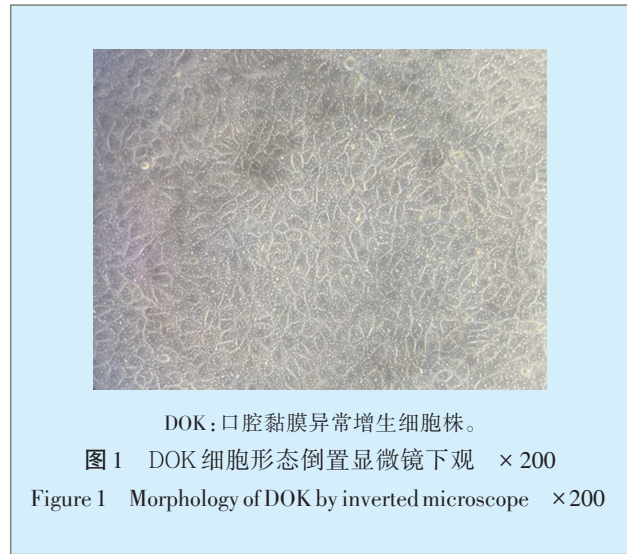


表1 槟榔碱及Ca²⁺+槟榔碱干预后各组DOK单层细胞模型荧光黄P_{app} $\bar{x} \pm s$, ×10⁻⁶ cm/s

Table 1 P_{app} of lucifer yellow of different DOK cell monolayer models after treated with arecoline or Ca²⁺+ arecoline

组别		4 h	8 h	12 h
对照组(A组)		2.27±0.66	2.23±0.33	2.29±0.56
槟榔碱处理组(B组)	10 μg/mL	2.39±0.63	2.56±0.21	2.81±0.30
	20 μg/mL	2.59±0.31	2.79±0.33	3.12±0.43
	30 μg/mL	2.77±0.59	3.03±0.18	3.40±0.68
钙离子+槟榔碱处理组(C组)	10 μg/mL	2.23±0.40	2.37±0.56	2.59±0.36
	20 μg/mL	2.35±0.38	2.56±0.27	2.85±0.19
	30 μg/mL	2.51±0.21	2.79±0.41	3.16±0.60

注: 对照组表示未用槟榔碱及钙离子干预; 钙离子+槟榔碱处理组表示用槟榔碱处理前先用钙离子预处理。

当干预时间一致时, 无论是4 h (F = 146.143)、8 h (F = 2 188.041), 还是12 h (F = 52.309), 均为槟榔碱浓度越高, 荧光黄P_{app}越大, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 当槟榔碱浓度一致时, 无论是10 μg/mL (F = 659.076)、20 μg/mL (F = 43.936), 还是30 μg/mL (F = 422.750), 均为干预时间越长, 荧光黄P_{app}越大, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2.3.2 钙离子+槟榔碱处理组 在钙离子+槟榔碱处理组, 当干预时间一致时, 无论是4 h (F = 1 748.957)、8 h (F = 1 346.851), 还是12 h (F = 322.320), 槟榔碱浓度越高, 荧光黄P_{app}越大, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 当槟榔碱浓度一致时, 无论是10 μg/mL (F = 4 327.230)、20 μg/mL (F = 869.023), 还是30 μg/mL (F = 318.330), 干预时间越长, 荧光黄P_{app}越大, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2.3.3 钙离子预处理对槟榔碱改变上皮通透性的影响 用钙离子预处理后, 10 μg/mL槟榔碱浓度

下各亚组荧光黄 P_{app} 分别比相同浓度和时间点的单纯槟榔碱处理组低, 差异有统计学意义 ($t_{4h} = 49.262$, $P < 0.001$; $t_{8h} = 34.873$, $P < 0.001$; $t_{12h} = 24.290$, $P < 0.001$)。

此外, 用钙离子预处理后, $10 \mu\text{g/mL}$ 槟榔碱浓度下, 4 h 组的荧光黄 P_{app} 与相应正常对照组差异无统计学意义 ($t = 46.695$, $P = 0.219$), 8 h 组 ($P = 0.002$)、12 h 组 ($P < 0.001$) 荧光黄 P_{app} 均大于相应正常对照组, 差异有统计学意义。

而 $20 \mu\text{g/mL}$ 、 $30 \mu\text{g/mL}$ 槟榔碱浓度下钙离子预处理各亚组荧光黄 P_{app} 比相同浓度和时间点的单纯槟榔碱处理组低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 比相应正常对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

3 讨论

3.1 DOK 单层细胞模型评价

单层细胞模型的完整性是评价化合物对模型屏障性影响的前提, 细胞生长情况及细胞间隙、TEER 值、液面试漏实验及荧光黄 P_{app} 是常用的几种验证上皮细胞模型完整性的方法。TEER 值及荧光黄 P_{app} 的大小与细胞来源有关。本实验中 TEER 最高值约为 $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 比文献报道^[5] 的 TR146 细胞模型 TEER 值低, 这可能是由于 TR146 细胞来源于人类癌组织, 可短时间内堆砌生长, 在模型中形成了 4~7 层的复层结构。而 DOK 细胞在生长过程中有接触抑制, 形成单层细胞模型。口腔黏膜的通透性一般介于表皮和肠黏膜的通透性之间。Caco-2 细胞单层模型与正常肠上皮高度相似, 荧光黄 P_{app} 小于 $0.5 \times 10^{-6} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 可认为模型完整性良好^[6]。但本实验中, DOK 细胞模型的荧光黄 P_{app} 为 $(2.26 \pm 1.18) \times 10^{-7} \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 大于前者。笔者推测, 相对较高的荧光黄渗透, 除了与 DOK 细胞模型为单层模型有关, 还与 DOK 细胞形态学特点有关。据周曾同等^[7] 报道, 电镜下正常口腔角质细胞表面有许多微绒毛, 细胞之间有丰富的桥粒, 而 DOK 细胞间桥粒鲜见, 胞间连接以微绒毛连接为主, 连接较松散。本实验中细胞生长融合成片, 犹如铺路石状, 4 h 液面试漏实验结果为阳性, 综合 TEER 值以及荧光黄 P_{app} 情况, 认为 DOK 单层细胞模型可以作为体外模拟人口腔黏膜异常增生上皮的雏形, 用于初步探究槟榔碱对口腔黏膜异常增生上皮屏障的影响。

3.2 槟榔碱对 DOK 单层细胞模型通透性的影响及其与癌变的关系

口腔黏膜上皮屏障是口腔防御系统的重要组成部分。膜被颗粒是一种细胞质颗粒, 与细胞膜融合后释放内容物 (主要为脂质) 至细胞间隙^[8]。上皮屏障作用主要由这些细胞间脂质决定, 脂质的类型、含量及结构与上皮的渗透性密切相关^[9]。DOK 细胞为异常增生上皮细胞, 分化能力差, 易受外界刺激影响^[7]。本实验在单纯槟榔碱处理组, 以不同浓度槟榔碱刺激 DOK 单层细胞模型不同时间后, 各亚组荧光黄 P_{app} 均大于相应正常对照组 ($P < 0.05$), 且荧光黄 P_{app} 随槟榔碱浓度及刺激时间增加而增大 ($P < 0.05$)。荧光黄是特异性细胞旁路转运标志物, 槟榔碱使模型荧光黄 P_{app} 增大, 推测槟榔碱所致的通透性增大可能是因为槟榔碱刺激 DOK 细胞, 通过某种途径干扰膜被颗粒的形成或释放, 使细胞间隙中脂质含量减少或脂质类型、结构发生变化, 致细胞旁路途径开放引起, 且槟榔碱浓度越高, 干预的时间越长, 这种干扰作用越明显, 具体机制尚需要证实。

DOK 细胞之间连接较松散和脆弱会使得该处组织易受机械和化学损伤, 从而易出现糜烂充血状态^[7]。白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 是慢性炎症的关键促炎因子并参与许多癌症的发生发展, 烟、酒、槟榔致癌物的刺激及慢性炎症与口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 关系密切^[10-11]。Lee 等^[12] 发现烟和槟榔相关致癌物能诱导 IL-1 β 的产生, IL-1 β 通过提高 DOK 增殖能力、刺激产生致瘤因子及增强 OSCC 侵袭性参与到癌症发生发展的全过程。本实验提示, 槟榔碱使异常增生上皮通透性增大, 这可能会增加槟榔碱透过量, 从而加剧槟榔碱的对异常增生组织的毒性作用, 促使局部 IL-1 β 分泌增多, 进而促进了癌变的进程。

3.3 Ca^{2+} 对槟榔碱改变 DOK 单层细胞模型通透性的调节作用及其与癌变的关系

研究证明, Ca^{2+} 能与负电荷脂质连接, 减小脂质的流动性, 在上皮屏障中起重要作用, 降低胞外 Ca^{2+} 浓度能可逆性增加黏膜渗透性, 促进药物吸收^[13]。那么, 增加胞外 Ca^{2+} 浓度或许能可逆性降低黏膜渗透性。本实验发现, 在钙离子 + 槟榔碱处理组, $10 \mu\text{g/mL}$ 浓度下各亚组荧光黄 P_{app} 分别比单纯槟榔碱处理组中相同浓度和时间点的槟榔碱处理组低, 提示 Ca^{2+} 预处理后, 上皮通透性可能下降,

进而使槟榔碱增加上皮通透性的作用减弱。此外,在钙离子+槟榔碱处理组,4 h 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亚组的荧光黄 P_{app} 与相应正常对照组差异无统计学意义,而其他各亚组荧光黄 P_{app} 均大于相应正常对照组,且荧光黄 P_{app} 随槟榔碱浓度及干预时间增加而增大。以上结果提示,在4 h 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 亚组, Ca^{2+} 的作用能完全抵消槟榔碱对上皮通透性的影响,但当槟榔碱浓度增大、作用时间延长时, Ca^{2+} 调节槟榔碱对通透性的相应减弱。笔者推测,这除了与槟榔碱的浓度与作用时间有关外,还可能与 Ca^{2+} 干预的方式、时间和浓度有关,若增加 Ca^{2+} 浓度、延长其干预时间,或许会发挥更大的作用。综上所述, Ca^{2+} 可能在一定程度上降低上皮通透性,使上皮对外源性物质的防御能力增强,进而减弱槟榔碱对黏膜的致病作用。

桥粒是一种细胞间连接结构,通过增强连接、阻止上皮间质转化及肿瘤进展而发挥肿瘤抑制功能^[14]。桥粒与癌变关系密切:一方面,桥粒成分减少或缺失有助于肿瘤的侵袭和转移^[15]。另一方面,桥粒成分的表达会促进细胞连接并抑制其迁移及侵袭。Tselepis等^[16]发现,在无黏着力、具侵袭性的L929成纤维细胞上转染桥粒成分后,其连接能力形成且原有的侵袭能力受抑制,用抗黏着肽处理转染细胞后,细胞的侵袭能力得到恢复。胞外 Ca^{2+} 的改变与桥粒形成密切相关,DOK细胞间无桥粒存在,或桥粒连接较少而微绒毛连接较多,连接较松散。本实验发现 Ca^{2+} 预处理后,上皮的通透性下降,进而使槟榔碱增加上皮通透性的作用减弱,这除了可能与升高了的胞外 Ca^{2+} 使脂肪酸钙复合物形成增加进而减小脂质的流动性有关外,高钙环境使DOK细胞桥粒表达增加、促进细胞连接、细胞间隙变小可能也参与其中,具体机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Sullivan RJ, Hagen EH. Psychotropic substance-seeking: evolutionary pathology or adaptation?[J]. *Addiction*, 2002, 97(4): 389-400.
- [2] 高义军,尹晓敏. 口腔黏膜下纤维性变致病因素研究进展[J]. *中国医师杂志*, 2015, 17(9): 1309-1313.
- [3] 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.
- [4] Chang SE, Foster S, Betts D, et al. DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype[J]. *Int J Cancer*, 1992, 52(6): 896-902.
- [5] Holm R, Meng-Lund E, Andersen MB, et al. In vitro, ex vivo and in vivo examination of buccal absorption of metoprolol with varying pH in TR146 cell culture, porcine buccal mucosa and Göttingen minipigs[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 117-124.
- [6] 颜苗,方平飞,李焕德,等. 甘草次酸18位差向异构体对P-gp底物罗丹明123在Caco-2细胞上跨膜转运的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2012(19): 1552-1558.
- [7] 周曾同,黄吉燕. 人口腔黏膜上皮异常增生细胞形态学观察[J]. *临床口腔医学杂志*, 2003, 19(10): 620-623.
- [8] Squier CA. Membrane coating granules in nonkeratinizing oral epithelium[J]. *J Ultrastruct Res*, 1977, 60(2): 212-220.
- [9] Nicolazzo JA, Finnin BC. In vivo and in vitro models for assessing drug absorption across the buccal mucosa[J]. //Ehrhardt C, Kim KJ. *Drug absorption studies: in situ, in vitro and in silico models*. New York:Springer, 2008: 89-111.
- [10] Rao SK, Pavicevic Z, Du Z, et al. Pro-inflammatory genes as biomarkers and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(42): 32512-32521.
- [11] 张斌. 口腔鳞状细胞癌的表现遗传学研究现状和进展[J]. *口腔颌面外科杂志*, 2016, 26 (2): 77-82.
- [12] Lee C, Chang JS, Syu S, et al. IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4): 875-884.
- [13] Jaipal A, Pandey MM, Abhishek A, et al. Interaction of calcium sulfate with xanthan gum: effect on in vitro bioadhesion and drug release behavior from xanthan gum based buccal discs of buspirone[J]. *Colloids SURF B*, 2013, 111: 644-650.
- [14] 孟繁魁,郭应军,林冰,等. 宣白承气汤预先给药对脓毒症大鼠肠上皮机械屏障保护作用机制研究[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(24): 4012-4014.
- [15] Xin Z, Yamaguchi A, Sakamoto K. Aberrant expression and altered cellular localization of desmosomal and hemidesmosomal proteins are associated with aggressive clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma[J]. *Virchows Arch*, 2014, 465(1): 35-47.
- [16] Tselepis C, Chidgey M, North A, et al. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(14): 8064-8069.

(编辑 张琳,孟文霞)