

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.07.003

· 基础研究 ·

槟榔碱涂擦对颊黏膜活检术后SD大鼠生存的影响

杨博, 符梦凡, 唐瞻贵

中南大学湘雅口腔医学院, 湖南长沙(410008)

【摘要】 目的 研究槟榔碱涂擦或机械刺激建立SD大鼠颊黏膜下纤维化动物模型的活检术后的生存状况,为动物实验样本量预测提供实验依据。**方法** 将48只大鼠分为8组,每组6只。A~D组为单纯不同浓度槟榔碱(0、0.5、2、8 mg/mL)涂擦颊黏膜,E~H组为不同浓度槟榔碱(0、0.5、2、8 mg/mL)涂擦联合机械刺激颊黏膜。16周后活检取直径6 mm颊黏膜组织块后间断缝合。记录大鼠生存时间,分析大鼠生存期与不同槟榔碱浓度和机械刺激的关系。**结果** 所有大鼠在前16周处理至活检时均未死亡。其中,单纯2 mg/mL槟榔碱刺激口腔黏膜下纤维化建模成功率为66.7%。所有SD大鼠活检术后的平均观察时间为42.5 d,截止大鼠颊黏膜创伤后120 d,8组的累积生存率分别(按组别字母顺序)为50%、33%、17%、0%、33%、17%、0%、0%。0 mg/mL(A组和E组)、0.5 mg/mL(B组和F组)、2 mg/mL(C组和G组)、8 mg/mL(D组和H组)的累积生存率分别为42%、25%、8%、0%。COX生存分析结果显示中高浓度槟榔碱(2、8 mg/mL)显著影响大鼠生存时间($P < 0.05$),机械刺激对生存时间影响不显著($P > 0.05$)。卡方检验结果显示伤口愈合的大鼠存活率(33.3%)高于伤口未完全愈合的大鼠存活率(0.0%),差异具有统计学意义($P = 0.003$)。**结论** 中高浓度槟榔碱涂擦大鼠颊黏膜的口腔黏膜下纤维化建模成功率较高,但活检术后生存时间明显下降;而机械刺激不会导致生存时间的显著下降,伤口不愈合可能为大鼠死亡的原因之一。

【关键词】 槟榔碱; 口腔黏膜下纤维化; 机械刺激; 颊黏膜; 活检; SD大鼠; 生存分析

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)07-0423-05

【引用著录格式】 杨博,符梦凡,唐瞻贵. 槟榔碱涂擦对颊黏膜活检术后SD大鼠生存的影响[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(7): 423-427.

Effect of arecoline on SD rat survival after buccal mucosal biopsy YANG Bo, FU Mengfan, TANG Zhanguai. Xiangya School of Stomatology, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: TANG Zhanguai, Email: tangzhanguai@aliyun.com, Tel: 86-731-84805482

【Abstract】 Objective To provide an experimental basis for predicting the sample size needed for animal experiments by studying the survival of SD rats after buccal mucosal biopsy with arecoline administered at different concentrations with different methods. **Methods** In all, 48 rats were divided into 8 groups, with 6 in each group, as follows: rats in groups A-D were treated with arecoline at different concentrations (0, 0.5, 2, 8 mg/mL); rats in groups E-H were treated with arecoline at different concentrations (0, 0.5, 2, 8 mg/mL), followed by stimulation of the buccal mucosa by mechanical rubbing. After 16 weeks, a 6-mm-diameter sample of the buccal mucosa was collected, and the wound was closed with interrupted sutures. The survival time of the rats was recorded, and the relationship between the survival time and the concentration of arecoline and mechanical stimulation was analyzed. **Results** No rats died during the first 16 weeks after treatment or after biopsy. The success rate of the arecoline stimulation model was 66.7%. The average observation time of all SD rats after biopsy was 42.5 days. Up to 120 days after biopsy, the cumulative survival rate in the eight groups was 50%, 33%, 17%, 0%, 33%, 17%, 0% and 0%, respectively (in alphabetical order). The cumulative sur-

【收稿日期】 2018-09-29; **【修回日期】** 2019-03-22

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81671003)

【作者简介】 杨博, 医师, 硕士在读研究生, Email: tihs86@126.com

【通信作者】 唐瞻贵, 主任医师, 博士, Email: tangzhanguai@aliyun.com, Tel: 86-731-84805482

vival rate in the groups administered 0 mg/mL (groups A and E), 0.5 mg/mL (groups B and F), 2 mg/mL (groups C and G), and 8 mg/mL (groups D and H) was 42%, 25%, 8% and 0%, respectively. Cox survival analysis showed that moderate and high concentrations of arecoline (2, 8 mg/mL) significantly affected the survival duration ($P < 0.05$), while mechanical stimulation had no significant effect on the survival duration ($P > 0.05$). The chi-squared test showed that the survival rate of rats showing wound healing (33.3%) was significantly higher than that of rats showing incomplete wound healing (0.0%) ($P = 0.003$). **Conclusion** The success rate of the rat buccal submucosal fibrosis model was higher than moderate and high concentrations of arecoline, but the survival duration was significantly reduced after biopsy. Mechanical stimulation did not lead to a significant decrease in the survival duration, and impaired wound healing may be a cause of death in this model.

[Key words] arecoline; oral submucous fibrosis; mechanical stimulation; buccal mucosa; biopsy; SD rats; survival analysis

J Prev Treat Stomatol Dis, 2019, 27(7): 423-427.

口腔黏膜下纤维化(oral submucous fibrosis, OSF)是一种以上皮萎缩、胶原堆积和微血管改变为主要病理特征的口腔黏膜慢性疾病^[1]。咀嚼槟榔是口腔黏膜下纤维化的主要致病因素^[2]。槟榔碱为口腔黏膜下纤维化发病主要的化学刺激因素^[3],而质地粗糙的槟榔咀嚼物对人类口腔颊部黏膜造成机械摩擦刺激,同样有可能导致口腔黏膜下纤维化^[4]。Perera等^[5]采用槟榔提取液刺激大鼠口腔黏膜,成功诱导出口腔黏膜下纤维化病变;Wen等^[6]通过槟榔碱饮水法长期刺激小鼠口内黏膜制备了口腔黏膜下纤维化模型。由于口腔黏膜下纤维化模型是否建立成功需要在实验动物口内取部分活体组织进行检查^[7-8],缝合后仍可能发生感染或由于其它原因导致实验动物死亡影响后续研究的开展^[9]。本研究的实验目的是探讨在SD大鼠口内的槟榔碱及机械刺激是否会导致大鼠存活率的下降,分析槟榔碱浓度和机械刺激对大鼠生存率的影响,为以后的动物实验的样本量计算及实验方案设定提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD大鼠48只,雄性,健康,合格证号为SCXK(湘)2016-0002,购自中南大学湘雅医学院动物学部。8周龄,SPF级,体重(325.4 ± 22.7)g,在标准环境下饲养(室温 $18 \sim 25$ ℃、湿度30%~50%、24 h光暗循环)。

1.2 主要试剂及材料

槟榔碱(Sigma公司,美国)置于4℃冰箱保存,与生理盐水(0.9%氯化钠注射液)配置成0.5 mg/mL、2 mg/mL、8 mg/mL三种不同浓度溶液。自制毛刷

刷毛采用尼龙612(PA612)。直径为6 mm的皮肤活检器,3-0可吸收外科缝线(上海浦东金环医疗有限公司)。

1.3 分组

通过槟榔碱浓度(a因素)和机械刺激(b因素)两因素单独或共同作用,将48只SD大鼠分为8组,分别记为A(对照)、B、C、D、E、F、G、H组(表1)。

表1 实验分组

Table 1 Experimental groups

机械刺激 (b因素)	槟榔碱浓度(a因素)			
	0 mg/mL (生理盐水)	0.5 mg/mL (低浓度)	2 mg/mL (中浓度)	8 mg/mL (高浓度)
无机械刺激	A组(对照组)	B组	C组	D组
有机机械刺激	E组	F组	G组	H组

1.4 实验方法

所有槟榔碱溶液采用医用棉签进行涂擦20次;机械刺激采取自制尼龙毛刷向黏膜垂直施加6 N的压力进行摩擦20次。先行机械刺激,后行槟榔碱涂擦。每2日所有大鼠处理1次,禁食禁水2 h。每1个月记录1次所有大鼠体重。建模成功的标准为活检后病理切片经病理医师检查为口腔黏膜下纤维化病变。

处理16周时停止槟榔碱及机械刺激处理,采用10%水合氯醛麻醉大鼠,口腔黏膜消毒,使用皮肤活检器取所有大鼠刺激区颊部黏膜直径6 mm,深3 mm圆柱形组织块,再进行间断缝合3针,生理盐水冲洗创口,局部酒精消毒,手术全程无菌操作。病理活检大鼠口内组织块。术后不使用抗生素,继续观察120 d。记录大鼠死亡时间。

1.5 统计学方法

对大鼠生存情况应用统计软件SPSS 22.0进行

分析。运用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,COX比例风险回归模型用于生存分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

实际可评价SD大鼠48只,实验前各组间体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。在槟榔碱和机械刺激处理过程中所有大鼠均表现健康。处理16周时各组间的体重差异无统计学意义($P > 0.05$),无大鼠在处理期间及组织活检术中死亡,活检后1周各组大鼠体重略有下降,各组间大鼠体重差异仍无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。

2.2 局部黏膜情况及病理检查结果

低中高浓度槟榔碱组(B、C、D、F、G、H组)部分大鼠口内出现白色病变,病理活检可见出现口腔黏膜下纤维化病变;生理盐水组(A、E组)均未

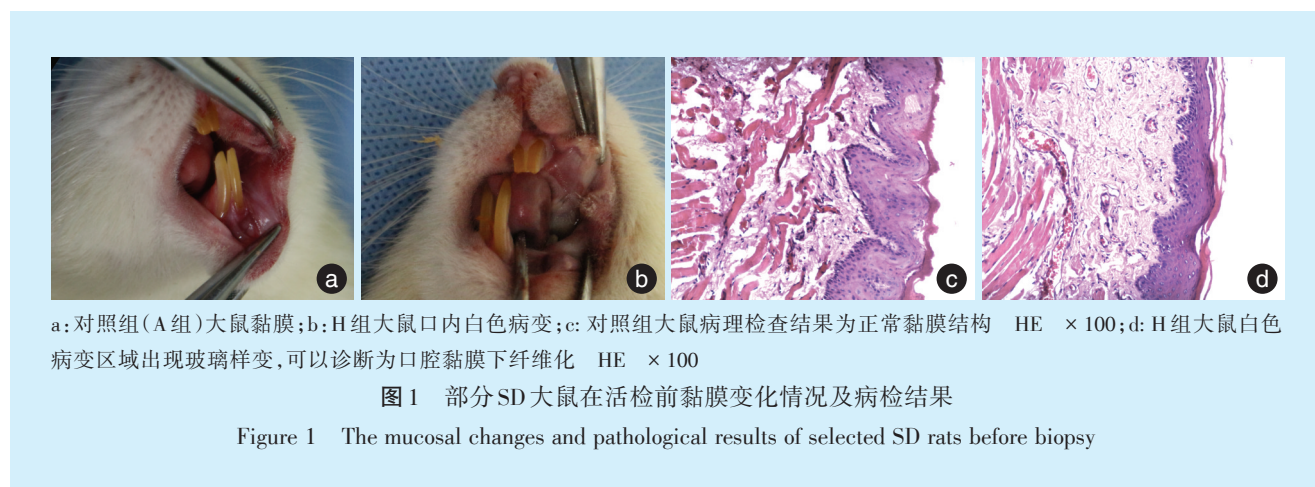
表2 实验前、处理16周和活检后1周各组大鼠体重及OSF发病率

Table 2 Weight of rats in each group before treatment, 16 weeks after treatment and 1 week after biopsy and OSF morbidity in each group $\bar{x} \pm s, g$

组别	实验前	处理16周	活检后1周	OSF发病率(%)
A组	323.4 ± 23.9	554.3 ± 47.1	533 ± 52.3	0.0
B组	333.1 ± 25.1	572.5 ± 54.7	524 ± 49.6	16.7
C组	335.3 ± 30.5	586.4 ± 45.2	519 ± 50.4	66.7
D组	341.7 ± 20.7	571.0 ± 35.3	540 ± 46.9	50.0
E组	319.2 ± 20.0	579.4 ± 34.9	542 ± 32.6	0.0
F组	328.3 ± 18.7	581.6 ± 49.4	528 ± 66.1	33.3
G组	320.9 ± 19.3	570.5 ± 42.8	512 ± 39.0	50.0
H组	334.1 ± 22.7	569.2 ± 39.0	537 ± 48.5	66.7
卡方值	3.474	4.023	6.075	15.289
P值	0.832	0.774	0.467	0.032

注 OSF:口腔黏膜下纤维化

见大鼠口内有异常(图1)。



a: 对照组(A组)大鼠黏膜;b: H组大鼠口内白色病变;c: 对照组大鼠病理检查结果为正常黏膜结构 HE × 100;d: H组大鼠白色病变区域出现玻璃样变,可以诊断为口腔黏膜下纤维化 HE × 100

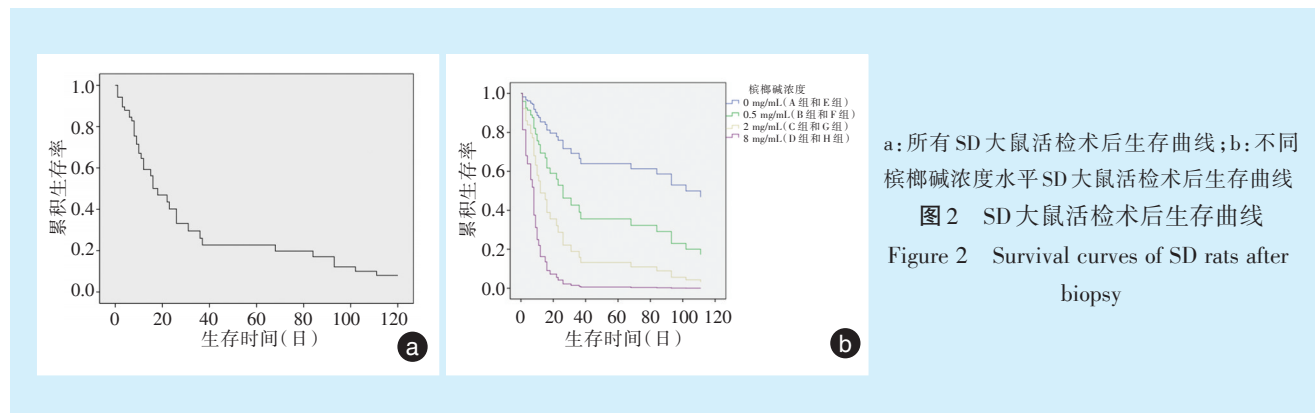
图1 部分SD大鼠在活检前黏膜变化情况及病检结果

Figure 1 The mucosal changes and pathological results of selected SD rats before biopsy

2.3 生存分析

所有SD大鼠活检术后的平均观察时间为42.5 d。截止大鼠颊黏膜创伤后120 d,39只大鼠死亡,9只大鼠存活:A组存活3只,B、E组各存活2

只,C、F组各存活1只。不同浓度槟榔碱因素下,各组大鼠活检后生存曲线见图2,30 d、60 d、90 d、120 d的累积生存率如表3所示。



a: 所有SD大鼠活检术后生存曲线;b: 不同槟榔碱浓度水平SD大鼠活检术后生存曲线

图2 SD大鼠活检术后生存曲线

Figure 2 Survival curves of SD rats after biopsy

2.4 生存时间的影响因素分析

单因素 COX 分析显示:中、高浓度槟榔碱显著影响SD大鼠的生存时间,差异有统计学意义($P < 0.05$);中、高浓度槟榔碱处理较生理盐水处理的风险比(Hazard ratio, HR)分别为3.696和9.441(表3)。

多因素 COX 分析显示:中、高浓度槟榔碱和机械刺激均可显著影响SD大鼠的生存时间($P < 0.05$);中、高浓度槟榔碱处理较生理盐水处理的HR分别为4.531和11.523;机械刺激处理较无机机械刺激的HR为1.990(表4)。机械刺激与低中高浓度槟榔碱之间的相关系数分别为0.148、0.212、0.193。不同浓度槟榔碱生存曲线图也可以看出随着槟榔碱浓度的增大,SD大鼠的累积生存率也逐渐减小。累积风险曲线见图3。

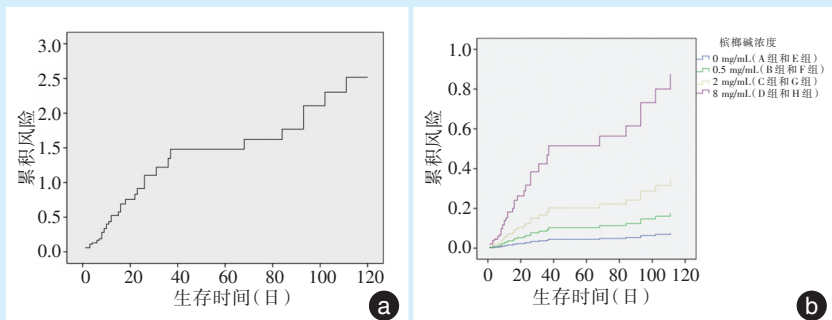
表3 活检术后每30天各组大鼠累积生存率

Table 3 Cumulative survival rate in each group of rats every 30 days after biopsy %

组别	时间(d)				
	0	30	60	90	120
A	100.0	83.3	66.7	66.7	50.0
B	100.0	66.7	50.0	50.0	33.3
C	100.0	33.3	33.3	33.3	16.7
D	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E	100.0	83.3	83.3	50.0	33.3
F	100.0	33.3	16.7	16.7	16.7
G	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
H	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0 mg/mL	100.0	83.3	75.0	58.3	41.7
0.5 mg/mL	100.0	50.0	33.3	33.3	25.0
2 mg/mL	100.0	16.7	16.7	16.7	8.3
8 mg/mL	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表4 活检后SD大鼠生存分析
Table 4 Survival analysis of SD rats after biopsy

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% 可信区间)	P值	HR(95% 可信区间)	P值
槟榔碱浓度(mg/mL)	0(生理盐水)	1.000	1.000	
	0.5(低)	1.990(0.739, 5.363)	2.315(0.849, 6.313)	0.101
	2(中)	3.696(1.393, 9.804)	4.531(1.644, 12.491)	0.003
	8(高)	9.441(3.321, 26.838)	11.523(3.880, 34.221)	< 0.001
机械刺激	无	1.000	1.000	
	有	1.557(0.827, 2.934)	1.990(1.026, 3.861)	0.042



a: 所有SD大鼠活检术后死亡风险曲线; b: 不同槟榔碱浓度水平SD大鼠活检术后死亡风险曲线

图3 SD大鼠活检术后死亡风险曲线

Figure 3 Risk curves of SD rats after biopsy

2.5 死亡原因分析结果

通过观察发现,部分死亡大鼠口腔内伤口未完全愈合,出现明显的感染症状。而120 d仍存活大鼠口腔内伤口均愈合良好。大鼠死亡或终止观察时口腔内伤口情况统计见表5。伤口愈合的大鼠存活率(33.3%)高于伤口未完全愈合的大鼠存活率(0.0%),经Fisher确切检验,伤口愈合情况不同的大鼠死亡率差异具有统计学意义($P = 0.003$)。

表5 大鼠死亡时或终止观察时口内伤口情况

Table 5 Wound condition at death or termination of observation in rats

伤口情况	observation in rats		
	存活	死亡	存活率(%)
愈合	9	18	33.3
未完全愈合	0	21	0

注 Fisher确切检验,伤口愈合情况不同的大鼠死亡率差异具有统计学意义($P = 0.003$)

3 讨论

本研究表明,2 mg/mL浓度槟榔碱刺激或伴机械刺激时,口腔黏膜下纤维化建模成功率为66.7%,但以往的研究中缺乏槟榔诱导后SD大鼠口内活检后的生存分析,又因为病理活检是检测口腔黏膜下纤维化的金标准^[10-11],进而导致在基础动物实验研究中,无法预测所有SD大鼠在一次活检后的存活率,可能会导致大鼠死亡过多无法继续实验^[12]。同时在实验设计时也较难预测实验动物的样本量需求。本实验为首次研究槟榔刺激因素及机械刺激因素是否会导致SD大鼠口内黏膜活检后存活率的下降,进而为以后大鼠动物实验样本量计算提供依据。本研究发现,当槟榔碱或机械刺激处理大鼠颊部黏膜16周,大鼠全部存活。对照组的大鼠在颊部创伤后120 d的生存率为50.0%。而当处理大鼠颊部黏膜的槟榔碱浓度达到中浓度(2 mg/mL)时,120 d时SD大鼠生存率为8.3%;达到高浓度(8 mg/mL)时120 d大鼠全部死亡。通过单因素和多因素COX分析均表明中高浓度槟榔碱处理区域颊部创伤后SD大鼠的生存率较生理盐水组有显著的下降。可见在中高浓度处理下的大鼠颊部黏膜组织如果进行切取组织检查或小手术后则存活率会受到很大的影响,提示如果需要进行相关动物实验,需要增加实验组动物数量,而不宜采取在同一只大鼠口内多次活检手术的实验设计,避免导致后续实验动物数量不足。单因素COX分析显示机械刺激对SD大鼠生存时间影响不显著,而多因素COX分析显示机械刺激显著影响减少SD大鼠的生存时间。机械刺激与低中高浓度槟榔碱之间的相关系数较大,分别为0.148、0.212、0.193,因素间存在共线性,所以单因素COX分析可信度较高,则认为机械刺激对大鼠生存时间影响不显著。提示如果采取相关SD大鼠动物实验,在大鼠口内采取机械刺激因素后,并不会导致活检术后大鼠生存率的显著性下降。对于死亡后大鼠的观察统计中发现,伤口未愈合大鼠更容易死亡,提示槟榔碱导致大鼠口腔内黏膜愈合情况较差,活检后可能会发生口腔内伤口感染导致死亡率的上升。本实验在活检后均未使用抗生素治疗,所以对于使用抗生素治疗后大鼠的存活率不明,这些问题都还有待于进一步的研究。

综上所述,中高浓度槟榔碱可以导致SD大鼠

活检后存活率的下降,提示中高浓度槟榔碱对黏膜的损伤较大,活检后大鼠更难以愈合并容易死亡。而低浓度槟榔碱和机械刺激对黏膜损伤较小,不会导致活检后大鼠死亡率的明显上升。而大鼠口腔内伤口未完全愈合可能为大鼠死亡原因之一。采取中高浓度(≥ 2 mg/mL)槟榔碱的刺激时,应当相应增加样本量以避免活检后大鼠死亡过多而导致实验无法继续。

参考文献

- [1] Arakeri G, Rai KK, Hunasgi S, et al. Oral submucous fibrosis: an update on current theories of pathogenesis[J]. J Oral Pathol Med, 2017, 46(6): 406-412.
- [2] Sharma A, Kumar R, Johar N, et al. Oral submucous fibrosis: an etiological dilemma[J]. J Exp Ther Oncol, 2017, 12(2): 163-166.
- [3] Awadallah M, Idle M, Patel K, et al. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018, 125(6): 628-636.
- [4] Razi A, Iqbal A, Ul WN. Topical application of tocopherol with corticosteroid in reducing the early signs and symptoms of oral submucous fibrosis patients[J]. AS Hospital Kar Med, 2016, 21(2): 100-105.
- [5] Perera M, Gunasinghe D, Perera P, et al. Development of an *in vivo* mouse model to study oral submucous fibrosis[J]. J Oral Pathol Med, 2007, 36(5): 273-280.
- [6] Wen QT, Warg T, Yu DH, et al. Development of a mouse model of arecoline-induced oral mucosal fibrosis[J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(12): 1177-1184.
- [7] Zhang SS, Gong ZJ, Xiong W, et al. A rat model of oral submucous fibrosis induced by bleomycin[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2016, 122(2): 216-223.
- [8] Troutman AD, Gallardo EJ, Brown MB. Measurement of nitrate and nitrite in biopsy-sized muscle samples using HPLC[J]. J Appl Physiol, 2018, 125(5): 1475-1481.
- [9] Wael YE. Age - dependent differential expression of apoptotic markers in rat oral mucosa[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(11): 3245-3250.
- [10] De Caro V, Sutera FM, Giannola LI. *In situ* delivery of corticosteroids for treatment of oral diseases[J]. Ther Deliv, 2017, 8(10): 899-914.
- [11] Liu DJ, Zhao X, Zeng X, et al. Non-Invasive techniques for detection and diagnosis of oral potentially malignant disorders[J]. Tohoku J Exp Med, 2016, 238(2): 165-177.
- [12] Porter S, Gueiros LA, Leao JC. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2018, 125(6): 603-611.

(编辑 张琳,曾曙光)