

# 幼儿舌脱落细胞形态与口气关系的研究分析

苏红如<sup>1</sup> 石四箴<sup>2△</sup>

(1 上海市徐汇区牙病防治所 上海 200032 2 上海同济大学儿童口腔医学研究所 上海 200032)

**摘要** 目的:比较分析高口气值组和低口气值组幼儿舌脱落细胞形态计量学参数及分类计数上的差异,探讨口气是否影响舌粘膜上皮细胞的角化、凋亡过程。方法:3-5岁幼儿40名,其中高口气值组幼儿20名,低口气值组幼儿20名,取舌背中1/3脱落细胞,制作细胞涂片、H.E染色。应用计算机图像分析系统对舌脱落细胞进行形态计量学检测和分类计数。结果:高口气值组幼儿的舌脱落细胞各类细胞的细胞形态较低口气值组幼儿小,且细胞核也更小。中层细胞、完全角化细胞计数在两组间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),高口气值组角化前细胞计数明显高于低口气值组( $P<0.01$ ),而高口气值组不全角化细胞计数明显低于低口气值组( $P<0.01$ )。结论:高口气值组幼儿的舌脱落细胞较小,细胞角化程度较低,凋亡速度较慢。

**关键词:** 口气;舌脱落细胞;细胞形态计量学

中图分类号:R781 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)18-3514-04

## Relationship between Morphometry of Child's Lingual Exfoliated Cells and Oral Malodor

SU Hong-ru<sup>1</sup>, SHI Si-zhen<sup>2△</sup>

(1 Shanghai Dental Diseases Prevention and Cure Center, Shanghai 200032, China;

2 Research Institute of Pediatric Dentistry, Tongji University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT Objective:** To compare cell morphometric parameters and classified amount of lingual exfoliated cell of high VSCs group and low VSCs group in children and study whether oral malodor affects the keratinization process of the lingual exfoliated cells. **Methods:** Forty children of 3-5 years old were enrolled in this study. According to their VSCs values, they were divided into high VSCs group and low VSCs group. Exfoliated cells samples from all the 40 children were obtained from the middle 1/3 area of dorsum of the tongue, then cell smears were made and stained with H.E. Cell morphometrically and classified amount study were made with computer image analysis system. **Results:** There were difference of morphometric parameters and classified amount between high VSCs group and low VSCs group. Lingual exfoliated cells of the children of high VSCs group were smaller with smaller nucleus than those of the children of low VSCs group. The proportion of middle layer cell and horny cell had no difference in these two groups ( $P>0.05$ ). The proportion of prekeratinocyte in high VSCs group was significantly higher than in low VSCs group ( $P<0.01$ ). The proportion of cornified-incompletely cell in high VSCs group was significantly lower than in low VSCs group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Oral malodor can inhibit apoptosis process and depress keratinization degree of lingual exfoliated cells in children

**Key words:** Oral malodor; Lingual exfoliated cell; Cell morphometry

**Chinese Library Classification:** R781 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)18-3514-04

### 前言

口气,俗称口臭(oral malodor),即指口腔散发出异味的一种症状。挥发性硫化物(Volatile Sulfur Compounds,VSCs)是引起口臭的主要原因,它主要由唾液、龈沟液及舌背的G<sup>-</sup>厌氧菌分解半胱氨酸、胱氨酸、蛋氨酸等含硫氨基酸而产生<sup>[1-3]</sup>。舌是产生口臭的主要部位之一,舌苔可以增加VSCs的产生,是形成口臭的一个重要因素<sup>[4-6]</sup>。以往主要以舌苔指数评价、舌苔湿重及舌苔的细菌学研究等方法进行舌与口气关系的研究,目前尚未见到从舌脱落细胞形态学角度研究口气的报道。

本研究运用计算机图像分析系统对高口气值组和低口气值组幼儿的舌脱落细胞进行细胞形态计量学检测和分类计数,比较分析两组间幼儿舌表层脱落细胞在形态和分类计数上的差异,探讨口气是否影响舌粘膜上皮细胞的角化、凋亡过程。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验对象及取样

40例3~5岁幼儿,其中20例为高口气值组(VSCs>100ppb),20例为低口气值组(VSCs<50ppb)。所有幼儿发育正常,无遗传性及系统性疾病,乳牙列完整,无口腔急性疾病。且对所有实验对象在口气测量、舌脱落细胞采样前有一定要求。用塑料小刮片,以中等力度,由后向前同一方向刮取幼儿舌背中1/3的粘膜脱落细胞,刮取面积约为2cm<sup>2</sup>。将刮取之舌脱落细胞置于内有1.0mL磷酸盐缓冲液(PBS(Phosphate buffer solution,pH7.4))的离心管中。

**作者简介:** 苏红如(1977-),女,医学硕士,主治医师,主要研究方向:儿童口腔医学

**△通讯作者:** 石四箴,医学博士,主任医师,电话:13901968341,

E-mail: shisizhen@163.com

(收稿日期:2011-06-05 接受日期:2011-06-28)

1.2 细胞处理、涂片及 H.E 染色

舌脱落细胞样本离心 1000rpm、持续 5min，去上层 PBS。加入 PBS 1.5mL，吹打 3~4 次，使细胞悬浮，滤膜过滤后离心 500rpm、持续 5min。PBS 洗涤 3 次，最后一次吸去上清后加入 PBS 0.5mL，吹打 3~4 次，用移液器取 0.2mL 细胞悬液均匀涂片，凉干，乙醚乙醇固定液固定后行常规 H.E 染色、封片。

1.3 图像分析

以计算机图像分析系统(Motic Images Advanced 3.2)对染色涂片进行舌脱落细胞形态计量学参数的测量和分类计数。①形态计量学参数的测量 涂片在 10× 40 倍视野下，每例分别选择 10 个中层细胞、角化前细胞、不完全角化细胞及完全角化细胞(如图 1 所示)，将 40 例实验对象的同种细胞(每种细胞 400 个，其中高 VSCs 组和低 VSCs 组各 200 个)输入图像分析系统，测定其细胞面积、周长、等效直径、核面积、圆形成度和复杂度 6 项形态计量学参数。②分类计数 涂片在 10× 20 倍视野下，每例选择不同的 5 个视野，将该 5 个视野的图像输入图像分析系统。对每个视野中的中层细胞、角化前细胞、不完全角化细胞、完全角化细胞进行手工分类计数，计算 5 个视野中各层细胞的数量。高 VSCs 组和低 VSCs 组各 100 个视野，共 200 个视野。

1.4 统计分析

对所有数据采用医用 SAS 统计分析软件包(6.12 版)处理，用两样本均数差别 t 检验和行× 列表资料的卡方检验作统计分析(P<0.01 差别有高度统计学意义)。

2 结果

2.1 两组间各类型舌脱落细胞形态计量学参数的比较

如图 1 所示，中层细胞的周长和复杂度、不全角化细胞的周长及完全角化细胞的周长在两组间无差别，中层细胞、不全角化细胞和完全角化细胞的其余各项形态计量学参数在两组间有差别，这可能与细胞的圆形成度在两组间也存在差异有关。而角化前细胞的各个形态计量学参数在两组间均有差别。高 VSCs 值幼儿的舌脱落细胞较小，细胞核也更小，见表 1、表 2、表 3、表 4。

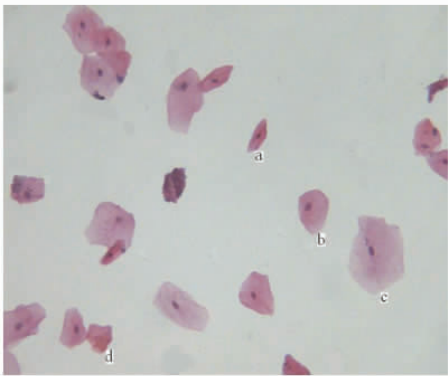


图 1 舌脱落细胞(× 200)：中层细胞(a)、角化前细胞(b)、不全角化细胞(c)、完全角化细胞(d)

Fig.1 H.E. staining of exfoliated cells (× 200) (a) middle-layer cells; (b) pre-keratinized cell; (c) partially-keratinized cell; (d) fully-keratinized cell.

表 1 中层细胞形态计量学参数在两组间的比较( $\bar{x} \pm s$  n=细胞数)

Table1 Statistical analysis of middle-layer cells between the high VSCs and low VSCs groups ( $\bar{x} \pm s$  n=cell number)

Group	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Same effect Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Nuclear area( $\mu\text{m}^2$ )	Round index	Complexity
High VSCs (n=200)	817.17± 143.63	136.12± 17.64	32.13± 2.88	29.61± 6.32	0.564± 0.101	23.08± 4.54
Low VSCs (n=200)	880.43± 187.35	135.92± 21.03	33.29± 3.59	39.74± 6.23	0.607± 0.093	21.69± 9.61
t	3.7901	0.1029	3.5719	16.1376	4.4751	1.8540
P value	0.0002	0.9181	0.0004	0.0001	0.0001	0.0648

表 2 角化前细胞形态计量学参数在两组间的比较( $\bar{x} \pm s$  n=细胞数)

Table2 Statistical analysis of pre-keratinized cells between the high VSCs and low VSCs groups ( $\bar{x} \pm s$  n=cell number)

Group	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Same effect Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Nuclear area( $\mu\text{m}^2$ )	Round index	Complexity
High VSCs (n=200)	1799.44± 360.85	192.01± 23.52	47.63± 4.76	43.55± 9.00	0.616± 0.080	20.79± 3.00
Low VSCs (n=200)	2128.90± 380.00	201.95± 23.76	51.86± 4.62	53.99± 9.57	0.660± 0.084	19.38± 2.74
t	8.8909	4.2049	9.0091	11.2375	5.4002	4.9294
P value	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

表 3 不全角化细胞形态计量学参数在两组间的比较( $\bar{x} \pm s$  n=细胞数)

Table 3 Statistical analysis of partially-keratinized cells between the high VSCs and low VSCs groups ( $\bar{x} \pm s$  n=cell number) fully-keratinized cell.

Group	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Same effect Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Nuclear area( $\mu\text{m}^2$ )	Round index	Complexity
High VSCs (n=200)	2209.26± 406.15	222.38± 34.35	52.81± 4.94	44.32± 10.44	0.574± 0.102	22.72± 4.94
Low VSCs (n=200)	2641.03± 530.08	228.97± 33.57	57.70± 5.82	56.20± 12.59	0.641± 0.092	20.16± 4.23
t	9.1439	1.9405	9.0622	10.2672	6.8536	5.5673
P value	0.0001	0.053	0.0001	0.0085	0.0001	0.0001

表 4 完全角化细胞形态计量学参数在两组间的比较( $\bar{x} \pm s$  n= 细胞数)

Table 4 Statistical analysis of fully-keratinized cells between the high VSCs and low VSCs groups ( $\bar{x} \pm s$  n=cell number)

Group	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Same effect Perimeter ( $\mu\text{m}$ )	Round index	Complexity
High VSCs (n=200)	1118.17± 288.55	159.28± 28.97	37.40± 5.00	0.560± 0.094	23.16± 4.58
Low VSCs (n=200)	1265.47± 369.51	164.59± 30.46	39.71± 5.86	0.589± 0.091	21.98± 4.34
t	4.4434	1.7853	4.2445	3.0786	2.6646
P value	0.0001	0.075	0.0001	0.0022	0.0080

2.2 两组间不同类型舌脱落细胞分类计数比较 ( $\chi^2=15.059, P<0.01$ ) ,各组 100 个视野统计分析结果见表 5。  
两组幼儿间不同类型脱落细胞组成之百分比有差别

表 5 高 VSCs 组和低 VSCs 组各 100 个视野不同类型舌脱落细胞组成比较 (n= 细胞数)

Table 5 Comparison of lingual exfoliated cells between the high VSCs group and low VSCs group in 100 observation areas (n= cell number)

Group	Different types of lingual exfoliated cells				Summary
	Middle-layer n(%)	Pre-keratinized n(%)	Partially- keratinized n(%)	Fully- keratinized n(%)	
High VSCs	170(11.32)	511(34.02)	538(35.82)	283(18.84)	1502
Low VSCs	142(10.16)	396(28.32)	581(41.56)	279(19.96)	1398
Total	312	907	1119	562	2900

高 VSCs 组幼儿的中层细胞、完全角化细胞所占百分比与 幼儿 , 高 VSCs 组幼儿的不全角化细胞所占百分比小于低 VSCs 组幼儿 , 见 表 6。  
低 VSCs 组幼儿的中层细胞、完全角化细胞所占百分比无差别 ; 高 VSCs 组幼儿的角化前细胞所占百分比大于低 VSCs 组

表 6 两组间不同类型舌脱落细胞所占百分比的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Percentage rate comparison of lingual exfoliated cells from the groups of high VSCs and low VSCs

Group	Different types of lingual exfoliated cells			
	Middle-layer	Pre-keratinized	Partially- keratinized	Fully- keratinized
High VSCs (n=20)	11.63± 4.15	33.80± 3.38	35.13± 5.49	19.44± 4.36
Low VSCs (n=20)	10.46± 2.53	28.22± 4.46	40.82± 6.68	20.50± 4.98
t	1.0752	4.4646	2.9431	0.7164
P value	0.2905	0.0001	0.0056	0.4782

3 讨论

VSCs 在低浓度时即对口腔粘膜组织存在细胞毒性作用<sup>[7]</sup>。Ng W 和 Tonzetich J 曾对口腔粘膜做过体外实验 ,发现在一定浓度的 H2S 和 CH3SH 下 ,口腔粘膜细胞对离子、前列腺素 E2 和细菌内毒素的渗透性增加 增加的程度与 H2S 和 CH3SH 作用时间的长短及其浓度的高低有关 ,证明 VSCs 能破坏口腔粘膜细胞屏障 ,引起炎症反应<sup>[8]</sup>。另外 ,VSCs 对口腔粘膜的成纤维细胞、牙周韧带细胞的蛋白代谢、细胞内 pH 值及细胞的生长也有一定的作用 ,影响细胞的形态和功能。Johnson PW 等<sup>[9,10]</sup>发现 ,H2S 和 CH3SH 均能减少人牙龈成纤维细胞内的总蛋白的合成 ,它们能抑制 型胶原蛋白的合成并加速其降解 ,其中 CH3SH 的作用较为明显 ,它不仅能抑制成纤维细胞的蛋白合成而且能抑制细胞的 DNA 合成、脯氨酸转运等。Lancero H 等<sup>[11]</sup>的体外研究表明 ,CH3SH 能降低人牙周韧带细胞的细胞内 pH

值 ,抑制细胞的生长、迁移。  
舌粘膜上皮属于复层扁平上皮组织 ,正常舌脱落细胞主要有中层细胞、角化前细胞、不全角化细胞和完全角化细胞四类 ,其角化程度依次增高。在正常情况下 ,舌上皮细胞新老交替 ,是自然发生的细胞凋亡。由本研究可见 :口气对舌脱落细胞的形态和分类计数均有一定的影响 ,高 VSCs 组幼儿的舌脱落细胞较小 ,细胞角化程度较低 ,凋亡速度较慢 ,推测机制如下 :①口腔内 G<sup>-</sup> 厌氧菌分解代谢舌脱落上皮细胞的含硫氨基酸所致 ,影响舌脱落上皮细胞的形态、角化过程。研究表明 ,正常舌脱落上皮细胞内含有丰富的巯基 (-SH),它是一种能与正常蛋白质结合的基团 ,与细胞代谢密切相关 ,是细胞正常角质化过程顺利进行的物质基础之一<sup>[12]</sup>。舌脱落上皮细胞能为 G<sup>-</sup> 厌氧菌提供含硫氨基酸代谢底物 <sup>[13]</sup> ,致使舌脱落上皮细胞内的 -SH 减少 ,影响细胞的正常角质化。②由 VSCs 能使口腔粘膜细胞的细胞膜的渗透性增加推测 ,VSCs 也可能使舌脱落细胞的细胞

膜的渗透性增加,破坏其细胞膜屏障,影响细胞的代谢。③ VSCs 可能影响舌脱落细胞的角蛋白的合成、代谢。细胞角蛋白(Cytokeratin,CK)是口腔上皮细胞细胞骨架的主要组成成分之一,是上皮细胞中含量丰富的蛋白质<sup>[14]</sup>。舌脱落细胞中的CK在维持细胞整个结构的完整性上起着关键的作用,VSCs 可能会影响其合成和转运速度,减缓上皮细胞角化死亡过程。④ VSCs 可能抑制舌上皮细胞的细胞生化水平,影响细胞代谢。正常人的舌上皮细胞内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)等生化指标均较活跃<sup>[12]</sup>,高VSCs 者的这些酶活性可能会降低。⑤ 细菌毒素可能对舌脱落上皮细胞直接产生毒性作用。很多研究表明口腔中高VSCs 者其舌苔中细菌的种类、数量均较低VSCs 者多<sup>[15,16]</sup>。细菌在引起口臭的同时可能对舌脱落上皮细胞也产生直接毒性作用,影响舌脱落细胞的代谢、形态等。

本研究采用计算机图像分析系统,从舌脱落细胞形态计量学角度对幼儿口气进行初步研究分析,反映出口气对幼儿舌粘膜细胞有一定的影响。但本研究取的是实验对象的舌表层脱落细胞,涉及的上皮细胞层比较浅表,因此后续的研究应考虑建立动物模型或组织培养后进行研究。且口气对幼儿舌脱落细胞的影响机制尚待深入全面的研究。

#### 参考文献(References)

- [1] Yaegaki K, Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease [J]. J Periodontal Res, 1992 Jul,27(4 Pt 1):233-238
- [2] Loesche WJ. The effects of antimicrobial mouthrinses on oral malodor and their status relative to US Food and Drug Administration regulations. Quintessence Int, 1999 May,30(5):311-318
- [3] Scully C, el-Maaytah M, Porter SR, et al. Breath odor: etiopathogenesis, assessment and management. Eur J Oral Sci, 1997, 105:287-293
- [4] Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, et al. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations[J]. J Periodontol, 1994, 65:37-46
- [5] Bosy A, Kulkarni GV, Rosenberg M, et al. Relationship of oral malodor to periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. J Periodontol, 1994, 65:37-46
- [6] Yaegaki K, Sanada K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. J Periodontal Res, 1992 Jul,27(4 Pt 1):233-238
- [7] Sanz M, Roldan S, Herrera D. Fundamentals of breath malodour. J Contemp Dent Pract[J]. 2001 Nov 15,2(4):1-17
- [8] Ng W, Tonzetich J. Effect of Hydrogen Sulfide and Methyl Mercaptan on the permeability of oral mucosa [J]. J Dent Res, 1984 July,63(7):994-997
- [9] Johnson PW, Ng W, Tonzetich J. Modulation of human gingival fibroblast cell metabolism by methyl mercaptan[J]. J Periodontal Res, 1992 Sep,27(5):476-483
- [10] Johnson PW, Yaegaki K, Tonzetich J. Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. J Periodontal Res, 1992,27:553-561
- [11] Lancero H, Niu J, Johnson PW. Exposure of periodontal ligament cells to methyl mercaptan reduces intracellular pH and inhibits cell migration [J]. J Dent Res, 1996,75(12):1994-2002
- [12] 吴正治,郭振球,李新华等.七种常见舌苔的细胞化学计量诊断研究[J].北京中医药大学学报,1996,19(3):57-59
- [13] Kleinberg I, Westbay G. Salivary and metabolic factors involved in oral malodor formation J Periodontol [J]. 1992 Sep,63(9):768-775
- [14] Dale BA, Salonen J, Jones AH. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia [J]. Oral Biol and Med, 1990, 1(3):167-190
- [15] Loesche WJ, Kazor C. Microbiology and treatment of halitosis[J]. Periodontol, 2000, 2002, 28:256-279
- [16] Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients[J]. J Clin Microbiol, 2003 Feb,41(2):558-563