

· 基础研究 ·

细胞增殖与凋亡在牙齿发育中的作用

赵书芳 金岩 李松 赵皿 杨宪刚

摘要 目的: 阐明细胞增殖与凋亡在牙齿发生、发育过程中的机制, 探讨牙齿发育的机理。方法: 选用纯系 SD 大鼠建立牙齿发育模型, 采用原位末端标记法(TUNEL 法)及免疫组织化学增殖细胞核抗原(PCNA)染色技术, 观察分析纯系 SD 大鼠牙胚发育不同阶段细胞增殖及凋亡情况。结果: 在牙齿发育的蕾状期、帽状期、钟状期增殖及凋亡的阳性细胞均出现在细胞增殖生长中心处。钟状晚期及牙体组织形成后, 已分化的外釉上皮细胞、成釉细胞、成牙本质细胞中也可见, 但以牙乳头及星网层细胞中多见。结论: 牙齿发育过程中的细胞增殖与凋亡同时出现在生长中心部位, 说明二者在牙齿发育中相互协调, 共同控制牙齿的形态形成。

关键词 增殖细胞核抗原 细胞凋亡 发育 原位末端标记法

人体从胚胎开始到发育成熟不只是细胞增殖的过程。近年的许多研究发现细胞凋亡(apoptosis)又称为程序性细胞死亡(programmed cell death, 简称PCD)在机体的胚胎发育、器官形成过程中发挥着重要的作用¹⁻³。如果这对矛盾不能协调进行, 将可能发生畸形甚至导致肿瘤的发生。关于这一点在肿瘤方面已有许多研究, 但在发育中尤其是牙齿发育所知甚少^{2,3}。因此, 本实验拟采用原位末端标记法(TUNEL 法)及增殖细胞核抗原免疫组化技术较系统地观察和分析 SD 大鼠牙齿发育过程中的细胞增殖和凋亡的作用, 以期揭示牙齿发育的机理。

1 材料和方法

1.1 动物模型建立

选用纯系 SD (Sprague Dawley, SD) 大鼠 20 只, 3 月龄, 体重 220~250 g, 上海实验动物中心提供。每日随机按 4:1 雌雄比例同笼, 次日早 8:00 观察雌鼠阴栓情况, 有阴栓者为妊娠 0 天, 标记后隔离饲养, 记录生长情况。

1.2 标本制备

取妊娠 SD 雌鼠分别于胚胎 13、15、17、19 天及生后 1、3、5、7 天宰杀, 剖腹取其胎鼠头部, 固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 系列酒精脱水, 石蜡定向包埋, 行冠状和矢状面 5 μm 切片。

1.3 免疫组织化学检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, 简称 PCNA)

免疫组织化学染色采用 ABC 法, 石蜡切片脱蜡至水, 经 3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶及枸橼酸缓冲液微波修复抗原 10 分后, 用正常羊血清封闭 30 分; 加 PCNA 单抗

(鼠抗大鼠, 美国 Santa Cruz 公司产品)置于 4℃ 过夜, 室温下复温 1 小时后滴加生物素化二抗 37℃ 反应 30 分; 再加 ABC 复合物 37℃ 孵育 30 分, 二氨基联苯氨(DAB)显色后, 二甲苯透明, 封片。

1.4 原位末端标记法(TUNEL 法)标记 PCD 细胞

TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labelling) 法(试剂盒购自美国 Oncor 公司): 切片常规脱蜡至水, 室温下 20 mg/L 的蛋白酶 K 消化 15 分; 3% H₂O₂ 的 PBS 溶液中处理 5 分后, 加 5 μl 的平衡液(TUNEL 试剂盒原配) 1 分; 再加含 TDT 酶反应液 15 μl, 37℃ 反应 1.5 小时后用预热的中止反应液中止反应(TUNEL 试剂盒原配); 缓冲液 1 漂洗 2 次(15 min/次)后加 2% 的正常羊血清孵育 30 分; 滴加抗地高辛碱性磷酸酶抗体置于湿盒中孵育 2 小时; 经缓冲液 1、缓冲液 3 漂洗后, 加新配制的显色液 5-溴-4-氯-3-吡啶盐加硝基蓝四唑盐(NBT 加 BCIP)显色系统, 用缓冲液 3 配制, NBT 4.5 μl, BCIP 3.5 μl, 0.24 mg/ml 左旋咪唑 20 μl, 暗处显色。中止显色后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。

2 结果

2.1 PCNA 免疫组化观察

胚胎 13 天蕾状期, PCNA 阳性细胞集中在蕾状突起中央部分, 周围的上皮细胞及间充质细胞增生活跃, 也散在可见阳性细胞(图 1)。胚胎 15 天帽状期, 细胞增生活跃, 成釉器及牙乳头和牙囊已形成。PCNA 阳性细胞主要集中在内釉上皮中心区域(原发性釉结节)及内外釉上皮细胞增殖形成颈环

处, 牙乳头中的间充质细胞中散在(图2)。胚胎17天钟状早期及19天钟状期, PCNA 阳性细胞主要集中在成釉器的未来牙尖形成部位(继发性釉结节)及颈环处, 间充质细胞中散在可见(图3)。出生后, 牙本质牙釉质基质均已开始形成, 成釉器逐渐退化, PCNA 阳性细胞在星网层细胞多见, 间充质细胞散在可见。随着牙本质、牙釉质基质逐渐分泌增加, 成釉器不断退化, PCNA 阳性细胞在成釉器的成釉细胞及成牙本质、间充质细胞中可见, 其余部位逐渐少见。

2.2 TUNEL 法观察

胚胎13天, 口腔上皮细胞增生内陷呈蕾状突起, PCD 阳性细胞集中在上皮细胞形成的蕾状头部, 邻近间充质细胞增生活跃, 偶见PCD 阳性细胞(图4)。胚胎15天帽状期, 细胞增生活跃, 成釉器及牙乳头和牙囊已形成。PCD 阳性细胞主要集中在内釉上皮中心区域(原发性釉结节)及内外釉上皮细胞增殖形成颈环处, 其中已分化的内釉上皮细胞约占30%, 星网层细胞约40%, 牙乳头中的间充质细胞约占30%, 余者偶见(图5)。胚胎17天钟状早期, PCD 阳性细胞明显增多, 主要集中在成釉器的未来牙尖形成部位(继发性釉结节)及颈环处, 内釉上皮细胞中约40%, 其邻接的星网层细胞约30%, 间充质细胞约25%, 其余部位散在(图6)。胚胎19天钟状期, 成牙本质细胞已分化, 开始分泌牙本质基质, 在成牙本质细胞中PCD 阳性细胞约有20%, 在成釉器的星网层细胞约占30%, 牙乳头中的间充质细胞约占20%, 其它部位散在。生后1天牙本质、牙釉质基质均已开始形成, 成釉器逐渐退化, PCD 阳性细胞在星网层细胞多见约30%, 间充质细胞约20%, 其余偶见。生后3天牙体组织形成期, 牙本质、牙釉质基质逐渐分泌增加, 成釉器不断退化, PCD 阳性细胞在成釉器的星网层细胞约25%, 间充质细胞约15%, 其余部位少见。生后5天牙本质、牙釉质基质进一步钙化形成, 成釉器进一步退化, PCD 阳性细胞逐渐较少。生后7天随着基质钙化形成, 牙胚各部分细胞成分明显减少, PCD 阳性细胞也少见。

3 讨 论

发生于发育过程中的细胞凋亡是一些生物性因子或激素通过细胞膜或细胞内受体介导的细胞

自然死亡现象。多用于揭示在胚胎发育、个体成熟等复杂的生理及病理过程中, 在特定的时间、空间所发生的一种主动接受基因调控的程序性细胞死亡。目前已知细胞凋亡在组织、器官发育形成过程中具有组织塑形, 消除不必要结构, 控制细胞数量, 清除多余、衰老、异常的细胞的作用。因此, 本研究采用细胞凋亡特异性原位末端标记法, 可以特异显示细胞凋亡在牙齿发育过程中的变化规律^{4,5}。

PCNA 是一种DNA 多聚酶 δ 的辅助因子, 是细胞增殖分裂所必须的成分之一, 是一种只出现在细胞增殖状态细胞核内的酸性蛋白质。它在细胞增生分裂的S 期达到高峰, 因此, PCNA 阳性着色细胞主要反映处于S 期增殖状态的细胞。本实验通过免疫组化染色观察不同时期牙齿发育过程中PCNA 的情况, 揭示PCNA 与细胞凋亡在牙齿发育中的关系。

结果表明: 在牙胚发育的蕾状期, 蕾状突起头部的星形细胞及周围上皮细胞、间充质细胞中PCNA 阳性细胞广泛分布, 这时PCD 活跃在生长中心蕾状突起的头部, 说明从牙蕾开始形成到蕾状期发育完成, 上皮细胞增殖极其活跃, 此时的PCD 调控着细胞增殖数量, 可能是上皮性成釉器不断向下生长的需要, 也可能是牙蕾形态形成所必需的一种主动塑形现象。帽状期PCNA 阳性细胞主要集中在内釉上皮中心区域(原发性釉结节)及内外釉上皮细胞增殖形成颈环处, 此时, PCD 也出现在帽状成釉器中以内釉上皮为中心的生长中心(原发性釉结节、颈环)处, 提示原发性釉结节及颈环是牙齿发育的中心。这些部位通过上皮间充质相互诱导作用, 细胞不断分裂、增殖的同时PCD 在调控着细胞的增殖和分化, 调控着牙尖、牙颈、牙根部的形成, 使牙胚得以不断发育及塑形。这可能是牙胚不断向外生长扩大及不断塑形的需要。牙齿发育进入钟状期, PCNA 及PCD 阳性细胞集中在成釉器未来牙尖形成部位(继发性釉结节)及颈环处, 说明继发性釉结节是钟状期的牙齿生长中心。已有研究表明继发性釉结节是控制牙尖形成的信号中心, 同期同样通过PCNA 的表达及PCD 出现发挥着调控牙齿发育及塑形。进入牙体组织形成期随着成釉细胞、成牙本质细胞的分化成熟, 牙本质、牙釉质基质的分泌形成, 成釉细胞、成牙本质细胞及星网层、牙乳头细胞均有PCNA 的表达及PCD 阳性细胞 说明成

釉细胞、成牙本质细胞增殖旺盛分泌基质的同时,通过 PCD 清除已经结束生命周期的、衰老的、多余的上皮及间充质细胞,控制着细胞数量,消除继发性釉结节、星网层等暂时性结构。可见,在牙齿发育过程中,PCNA 和 PCD 相互协调作用,及时调控着细胞的增殖和分化,及时清除异常、衰老的细胞,在牙齿形态形成过程中,发挥重要的塑形作用。

由此得知:牙齿胚胎发育过程中 PCNA 和 PCD 有着密切的关系,它们都集中出现在生长中心的细胞中,由于生长中心的细胞多处于增殖期,在细胞增殖旺盛的同时,通过细胞凋亡可清除过多增殖的细胞,控制着细胞的数量;也及时消除异常、衰老的细胞及暂时性结构,即在细胞增殖高峰之后是细胞凋亡高峰,二者在牙齿形态形成过程中,相互协调、互相制约共同发挥着重要的塑形作用。

(本文图见中心插页 5)

4 参考文献

- 1 Michael D, Weil JM, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, 88: 347~ 354
- 2 Sanders EJ, Wride MA. Programmed cell death in development. *Int Rev Cytol*, 1995, 163: 105~ 173
- 3 木崎治俊. アポトシスと疾患. *医学のあゆみ*, 1996, 178(10): 712~ 716
- 4 Taniguchi K, Sato N, Uchiyama Y. Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion. *Arch Histol Cytol*, 1995, 58(2): 191~ 203
- 5 松田秀司, 三岛宏一, 尾原清司, 等. 顎関節の発生におけるアポトシスの意义. 第十回日本顎関節学会总会, 1997: 65, 252

(1998-07-30 收稿)

Cell Proliferation and Programmed Cell Death in Tooth Development

Zhao Shufang, Jin Yan, Li Song, et al

College of Stomatology, the Fourth Military Medical University

Yang Xiangang

Jilin Employee Medical University

Abstract

Objective: To evaluate the role of cell proliferation and programmed cell death (PCD) in the tooth development by detecting programmed cell death and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Methods:** Expression of PCNA and PCD were detected by immunohistochemical staining and Tdt-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) in different stages of the tooth development of Sprague-Dawley rats. **Results:** The positive cells of PCNA and PCD predominantly appeared at the proliferating growth center in the bud, the cap and the earlier bell stages of tooth development. PCNA and PCD were also observed in ameloblasts and odontoblasts, especially in the stellate reticulum cells of enamel organ and dental papilla during the period of dentin formation. **Conclusion:** Cell proliferation and programmed cell death are interrelated and interact on each other in the development of teeth, and they both involve in sculpturing the shape of teeth.

Key words: proliferating cell nuclear antigen programmed cell death development Tdt-mediated dUTP nick end labelling