

[文章编号 1000-1182(2004)04-0328-03

人乳牙牙根吸收过程中根面破骨细胞的观察

包向军¹, 梁星², 陈明², 王航², 谢志刚², 杨晓喻²

(1. 上海市口腔病防治院 修复科, 上海 200001; 2. 四川大学华西口腔医院 修复科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 观察人乳牙根吸收面的破骨细胞形态特点。方法 收集和固定人滞留乳牙, 制备硬组织切片, 经苏木精-伊红、抗酒石酸酸性磷酸酶染色, 在光镜和扫描电镜下观察破骨细胞。结果 在人乳牙根吸收面有多个破骨细胞, 呈重叠状态, 细胞形态不规则, 体积大, 细胞周缘可见丝状突起, 多核, 被吸收的牙本质表面高低不平。结论 人滞留乳牙牙根吸收面存在大量的破骨细胞, 是研究人破骨细胞的一个来源。

[关键词] 乳牙; 破骨细胞; 形态学

[中图分类号] R 780.2 [文献标识码] A

Observation of Osteoclasts on the Root Surface during Human Deciduous Teeth Resorption BAO Xiang-jun¹, LIANG Xing², CHEN Ming², WANG Hang², XIE Zhi-gang², YANG Xiao-yu². (1. Dept. of Prosthetics, Shanghai Preventive Hospital of Oral Diseases, Shanghai 200001, China; 2. Dept. of Prosthetics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To observe osteoclasts on the resorbing surface of human deciduous teeth. **Methods** After fixing the collected deciduous teeth, we prepared the tooth slices without decalcification, treated them with HE and TRAP dyestuff, and observed the osteoclasts under light and scanning electron microscope. **Results** There were large quantity of various forms of overlapping and huge osteoclasts with many nuclei and silk-like protuberances on the resorbing surface of deciduous teeth. The multinucleated osteoclasts align on the surface of coarse dentin. **Conclusion** On the resorbing surface of human deciduous teeth there are large amount of osteoclasts which can be used as a source of studying human osteoclast.

[Key words] deciduous teeth; osteoclasts; morphology

对破骨细胞的研究, 目前大多数是在体外培养的基础上进行的, 直接研究在生理状态下产生的牙槽骨内破骨细胞的报道甚少^{1,2}。研究生理状态下产生的破骨细胞, 有助于对应力作用下牙槽骨吸收机制进行探讨。恒牙萌出过程中, 可能对乳牙牙根施以生理压力, 表现为乳牙牙根吸收, 吸收面呈蚕食状, 说明乳牙吸收面在生理状态下存在破骨细胞。但是, 乳牙吸收面的破骨细胞的数量、形态及结构特点尚不清楚。本实验采用光学显微镜及扫描电镜观察拔除的乳牙根面形态, 为下一步进行牙槽骨破骨细胞吸收机制的探讨奠定基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

1600SP 打磨机 (Leica 公司, 德国), SP2600 切片机 (Leica 公司, 德国), Amray-1000B 型扫描电镜 (Amray 公司, 美国)。

[收稿日期 2004-02-15; 修回日期 2004-05-17]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30271428); 教育部“优秀青年教师资助计划”项目 (教人司 2002 40 号); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (B1200058)

[作者简介] 包向军 (1970-), 男, 辽宁人, 主治医师, 博士

1.2 方法

经患者及其家长的同意, 收集拔除的 8 颗乳牙, 分别作以下研究。

1.2.1 离体乳牙硬组织切片的制备 用 4% 多聚甲醛固定离体乳牙 5 min 后, 流水冲洗标本 24 h, 标本依次经 70% ~ 100% 的乙醇梯度脱水; 树脂包埋; 硬组织切片机制备厚度为 5 μm 的切片, 裱片; 置于 50 ~ 60 °C 的恒温箱干燥 72 h; 浸于乙二醇乙醚乙酸酯中 30 min 2 次, 去除树脂。

1.2.2 苏木精-伊红染色观察 乳牙硬组织切片经梯度乙醇水化, 蒸馏水冲洗。依次将切片浸于 0.5% 苏木精染色液中 10 min, 1% 盐酸和 80% 乙醇混合液中 1 min, 蒸馏水中浸 2 次, 0.25% 氨水中浸 1 min, 1% 伊红染色液中 10 min, 80% ~ 100% 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明 30 min 后, 加拿大树胶封片。

1.2.3 离体乳牙的抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色观察 用 4% 多聚甲醛固定离体乳牙 5 min, 置于湿润的环境中; 然后将其浸入 TRAP 染色孵育液 37 °C, 50 min; 最后, 将经 TRAP 染色的离体乳牙按硬组织切片方法制片。

1.2.4 光镜及扫描电镜观察 用光镜观察上述切片。将硬组织切片 2.5% 戊二醛固定, 梯度乙醇脱

水,临界点干燥,镀金,扫描电镜观察乳牙根表面破骨细胞的形态、大小及与相邻细胞之间关系。

2 结果

2.1 离体乳牙的苏木精-伊红染色观察

在每颗滞留乳牙吸收面,可见多个典型的破骨细胞,呈分散或重叠状态,边界清晰,细胞核呈圆形或卵圆形,染色较深,数目多(5~20个),细胞与牙本质紧密接触或者有一定距离,每个核可见深染的1~2个核仁,染色质淡红色,颗粒细小,分布均匀。牙本质因被吸收,可见其表面高低不平(图1)。



图1 左边的深色部分是牙本质,其上可见多核破骨细胞 HE ×400

Fig 1 The left deep-stained part showed dentin and there were multinucleated osteoclasts on its surface HE ×400

2.2 离体乳牙的 TRAP 染色及其硬组织切片观察

牙根吸收面可见红色染色,散在,呈点状或片状,或者呈广泛弥散的红色染色(图2),说明在乳牙吸收面有大量破骨细胞。近牙本质区有大量多核巨细胞,可见细胞酶活性部位呈红橙色,分布于胞质内,细胞质内可见大小不等、形状不规则的空泡(图3)。



图2 离体乳牙根吸收面的 TRAP 染色,散在分布的红染区域(左);全部呈阳性染色(右)

Fig 2 In TRAP stain of deciduous tooth *in vitro*, there were scattered red regions (left) and wholly positive-stained (right) on the resorbing surface of the root



图3 离体乳牙的硬组织切片,图中蓝色部分为牙本质,其表面可见阳性染色的破骨细胞 TRAP 染色 ×100

Fig 3 Among hard tissue slice of deciduous tooth *in vitro* the blue part showed dentin and on its surface there were many positive-stained osteoclasts TRAP ×100

2.3 离体乳牙的扫描电镜观察

扫描电镜下可见多个破骨细胞,呈重叠状态,细胞的形态不规则,细胞体积大,伪足形态多样且不规则,细胞周缘可见丝状突起(图4)。



图4 乳牙根吸收面有许多带有突起的破骨细胞 SEM ×1 990

Fig 4 On the resorbing surface of deciduous tooth were many osteoclasts with protuberances SEM ×1 990

3 讨论

破骨细胞的研究热点之一是获得数量多、纯度高、具有骨吸收功能的破骨细胞。Chambers等³首先报道了破骨细胞的体外培养,其方法为经典的方法,即机械分离肱骨、股骨和胫骨的骨细胞和骨髓细胞进行培养。目前已对大鼠、小鼠、兔、鸡、鸟等多种动物的破骨细胞进行了培养。其他体外培养的方法还有机械加酶法、骨髓或脾组织诱导法、加细胞因子等方法。这些方法培养的破骨细胞可表现骨吸收,对刺激因素有反应,但有学者⁴认为,这些细胞也不能表现出破骨细胞的全部特性,因此使破骨细胞的研究受到一定影响。

学者们正从事从人体直接获得破骨细胞的研究。有报道^{2,5}表明从破骨细胞瘤获得的多核巨细胞,与从长骨中分离的破骨细胞有很多相同之处,但是也存在区别。也有学者⁶⁻⁸采用人外科手术刚分离的骨标本,进行破骨细胞的研究。Weidema等¹首先报道了对滞留乳牙破骨细胞的获取。目前研究认为^{2,9,10},人乳牙上的破骨细胞在很多方面与典型的破骨细胞一样,TRAP染色阳性,表达整合素,存在皱襞缘,吸收矿物质及两种细胞在微观方面也有很多相近之处。

本实验对替牙期的人滞留乳牙根吸收面的破骨细胞研究的结果表明,在乳牙的任意一个切片平面内至少含有8个典型的多核细胞,分布于牙本质吸收陷窝的内表面;在苏木精—伊红染色的切片上,可见多于10个细胞核的巨细胞多与牙本质相邻,吸收区牙本质染色深;多核细胞TRAP染色阳性(胞质红色,核无染色,多核,可见伪足);在扫描电镜下观察到乳牙破骨细胞成重叠状态进行吸收,细胞胞体大,含有多个细胞核。本实验观察到的乳牙根吸收面破骨细胞特征明显,且数量多。在方法学方面,如果采用脱钙法制备组织切片,周期长,组织容易丧失,不利于进一步的研究。由于乳牙破骨细胞位置表浅,本实验对位于乳牙牙根表面的破骨细胞先进行酶组织化学染色,再制备硬组织切片,减少脱钙和制备硬组织切片过程中对细胞的损伤及细胞内酶活性丧失,且周期短,树脂包埋材料不易与细胞和组织内的成分发生反应,组织不易脱落,保存时间长。

[参考文献]

- 1] Weidema AF. Electrophysiological characterization of ion channels in osteoclasts isolated from human deciduous teeth J. Bone, 2000, 27(1):5-11.
- 2] Domon T. Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts J. Anat Rec, 1997, 249(4):449-457.
- 3] Chambers TJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts J. J Pathol, 1982, 136(1):27-39.
- 4] Grano MA. New model for bone resorption study *in vitro*: human osteoclast-like cells from giant cell tumors of bone J. J Bone Miner Res, 1994, 9(7):1013-1020.
- 5] Bowler WB. P2Y2 receptors are expressed by human osteoclasts of giant cell tumor but do not mediate ATP-induced bone resorption J. Bone, 1998, 22(3):195-200.
- 6] Edwards M. Macrophage colony-stimulating factor increases bone resorption by osteoclasts disaggregated from human fetal long bones J. Bone, 1998, 22(4):325-329.
- 7] Lambrecht JT. Human osteoclast-like cells in primary culture J. Clin Anat, 1996, 9(1):41-45.
- 8] Murrills RJ. Bone resorption by isolated human osteoclasts *in vitro*: effects of calcitonin J. J Bone Miner Res, 1989, 4(2):259-268.
- 9] Sahara N. Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth: an ultrastructural and cytochemical study J. Anat Rec, 1996, 244(1):33-49.
- 10] Shigeyama Y. Expression of adhesion molecules during tooth resorption in feline teeth: a model system for aggressive osteoclastic activity J. J Dent Res, 1996, 75(9):1650-1657.

(本文编辑 汤亚玲)

第六次全国青年口腔医师学术研讨会征文通知

经中华口腔医学会批准,由广东省口腔医院承办的第六次全国中青年口腔医师学术研讨会将于2004年11月19日至22日在广州召开。此次会议将突出年轻人思想活跃的特点,针对口腔医学领域的热点课题安排专题讨论;会议将设英文报告专场,为年轻医师走向国际学术舞台提供训练机会。真诚欢迎全国中青年口腔医师踊跃参加。

征文要求:论文必须是未正式发表的原始论文,内容可涉及口腔医学领域的各个学科,来稿须论文全文,500字以内的中英文摘要打印稿及含全文、摘要的软盘(Word文档格式),研究性论文摘要应为结构式,包括:目的、材料和方法、结果和结论。

截稿日期:2004年8月30日(以邮戳为准),投稿地址:广州市江南大道南366号(510280),广东省口腔医院第六次全国中青年口腔医师学术研讨会筹备组收,电话:020-84427043,84233792,13902259129(叶先生),13903008733(江小姐),传真:020-84433177,E-mail:Liak@yeah.net。

广东省口腔医院
第六次全国中青年口腔医师学术研讨会筹备组