

# 转化生长因子 $\beta 3$ 在小鼠牙胚钟状晚期以后发育中的表达和分布

阙国鹰<sup>1</sup>, 李恒<sup>2</sup>, 张磊<sup>2</sup>, 邹莉<sup>2</sup>, 吴英<sup>1</sup>

(中南大学 1. 湘雅医院口腔科; 2. 口腔医学院, 长沙 410008)

**[摘要]** 目的:观察转化生长因子  $\beta 3$ (transforming growth factor  $\beta 3$ , TGF- $\beta 3$ )在小鼠牙胚钟状晚期以后发育中的表达分布,探讨其在小鼠牙胚钟状晚期以后发育中的作用。方法:取近交系 BALB/C 小鼠出生后 4 d (4 days postnatal, 4dpn)、11 d (11dpn)及 18 d (18dpn)的牙胚,常规固定、脱钙、包埋、切片,用 SP 法免疫组织化学染色技术检测 TGF- $\beta 3$  在各牙胚中的表达。结果:4dpn 牙胚成釉细胞层、成牙本质细胞层呈强阳性表达,牙乳头周边区域细胞呈阳性表达,中间区域呈弱阳性表达;11dpn 牙胚成釉细胞层呈弱阳性表达,成牙本质细胞层、牙乳头细胞呈阴性表达;18dpn 牙胚牙周膜中的血管壁及周围呈强阳性表达,牙本质、牙骨质、牙周膜成纤维细胞呈阴性表达。结论:TGF- $\beta 3$  在小鼠牙胚钟状晚期以后发育过程中的表达具有一定的时空分布性,可能在牙胚发育中有一定的调控作用,这种作用可能随着牙胚的发育而逐渐减弱。

**[关键词]** 牙胚; 转化生长因子  $\beta 3$ ; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.03.011

## Expression and distribution of transforming growth factor $\beta 3$ in the mouse tooth germ during development after advanced bell stage

QUE Guoying<sup>1</sup>, LI Heng<sup>2</sup>, ZHANG Lei<sup>2</sup>, ZOU Li<sup>2</sup>, WU Ying<sup>1</sup>

(1. Department of Stomatology, Xiangya Hospital;

2. School of Stomatology, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the expression and distribution of transforming growth factor  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ) in the mouse tooth germ after advanced bell stage, and to discuss the role of TGF- $\beta 3$  during the development of tooth germs. **Methods** BALB/C's mouse tooth germs at 4, 11, and 18 days postnatal (4dpn, 11dpn, and 18dpn) were collected and processed for routine fixation, decalcification, embedding, and slicing. The expression of TGF- $\beta 3$  was detected by immunohistochemistry. **Results** As to 4dpn tooth germ: Positive expression of TGF- $\beta 3$  was found in enameloblasts, odontoblasts, ambitus of dental pupilla, with weak positive expression in the intermedial of dental papilla. As to 11dpn tooth germ: Positive expression was seen in enameloblasts, with negative expression in odontoblasts and dental papilla. As to 18dpn tooth, positive expression of TGF- $\beta 3$  was showed in the vessel wall and its surrounding, with negative expression in other areas. **Conclusion** The distribution of TGF- $\beta 3$  expression showed a time-space characteristic during the mouse tooth germ development after advanced bell stage, which may exert a regulatory effect on tooth develop-

收稿日期 (Date of reception) 2010-03-10

作者简介 (Biography) 阙国鹰, 硕士, 教授, 主要从事儿童牙病和口腔预防研究。

通信作者 (Corresponding author) 李恒, E-mail: liheng\_8421\_student@sina.com

基金项目 (Foundation item) 中南大学大学生创新性试验计划 (YA07053)。 This work was supported by Innovative Trial Program for students of Central South University, P. R. China (YA07053).

ment and this effect is gradually getting weak with the development of tooth germs.

**Key words:** tooth germ; transforming growth factor  $\beta 3$ ; immunohistochemistry

由基质介导的上皮-间充质间的相互作用,控制了牙胚形态发生、成牙本质细胞和成釉细胞的分化以及牙本质和牙釉质基质的形成,但细胞与基质相互作用调控牙胚发育的确切分子机制仍不清楚。生长因子在上皮-间充质相互作用中转导细胞与基质之间信号联系方面起重要作用<sup>[1]</sup>,其中转化因子  $\beta 3$  (transforming growth factor  $\beta 3$ , TGF- $\beta 3$ ) 在间充质细胞系中表达最为明显<sup>[2]</sup>,其生物学功能主要包括诱导间质细胞的增殖和分化、促进细胞外基质的形成<sup>[1]</sup>、抑制上皮细胞的增殖与分化、抑制免疫反应等<sup>[3-4]</sup>,现已成为细胞因子家族中的研究热点之一。

以往关于 TGF- $\beta 3$  在牙胚中分布的报道,不论是研究鼠牙胚还是人牙胚,都仅限于钟状晚期之前<sup>[5-6]</sup>,本实验取钟状晚期之后不同时期的小鼠牙胚,连续观察 TGF- $\beta 3$  的表达和分布,探讨 TGF- $\beta 3$  在小鼠牙胚钟状晚期以后发育中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及取材

出生后 4 d (4 days postnatal, 4dpn) 的近交系 BALB/C 小鼠 6 只(中南大学动物学部提供)。分别取 4dpn, 11 d (11dpn) 及 18 d (18dpn) 小鼠的下颌第 1 磨牙牙胚各 2 个,置于 10% 多聚甲醛中固定。

### 1.2 实验设备和材料

兔抗小鼠 TGF- $\beta 3$  抗体(bs-0099R)系北京博奥森生物技术有限公司产品、PBS 缓冲液、0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液、DAB 显色剂、二甲苯、无水乙醇、过氧化物酶阻断剂、苏木精复染液等均为北京鼎国昌盛生物技术公司提供。

### 1.3 切片制作方法和步骤

标本在 10% 多聚甲醛液中充分固定,低温脱钙,常规石蜡包埋,4~5  $\mu\text{m}$  连续切片。将多聚赖氨酸脱载玻片即刻置于 60  $^{\circ}\text{C}$  烤箱烤片 4 h 以上,脱蜡,透明;加 50  $\mu\text{L}$  过氧化物酶阻断剂,室温下孵育 10 min;热修复抗原,每张切片加 50  $\mu\text{L}$  正常山羊血清,室温下孵育 30 min;加 50  $\mu\text{L}$  的第 1 抗体(TGF- $\beta 3$  1:600 倍稀释),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min;加 50  $\mu\text{L}$  生物素标记的第 2 抗体(生物素标记山羊抗兔 IgG),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;加 50  $\mu\text{L}$  辣根过氧化物酶标记的链亲和素

溶液(1:1 000 倍稀释),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。以上每两步间用 PBS 液洗 3 min 共 3 次,DAB 显色,自来水充分冲洗 10 min,苏木精复染,自来水冲洗 10~15 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,显微镜下检查。

### 1.4 结果判读

用 PBS 代替一抗作为染色的阴性对照,请两位经验丰富的阅片者进行审阅。TGF- $\beta 3$  阳性表达呈黄色至棕黄色颗粒状,主要位于细胞浆、细胞膜及胞外基质,阴性对照无表达。将 HE 切片与免疫组织化学(免疫组织化学)染色切片对照观察,判定免疫组织化学阳性表达的部位和细胞种类,按有无表达和表达的细胞多少及染色深浅程度,分为阴性、弱阳性、阳性、强阳性;阴性无表达;弱阳性的阳性细胞很少,染色呈浅黄色;阳性的阳性细胞较多,染色呈黄色;强阳性的阳性细胞很多,连成条带状或者片状,染色呈深黄色至棕黄色。

## 2 结 果

### 2.1 4dpn 牙胚

处于钟状晚期,内釉上皮细胞分化为成釉细胞,呈高柱状,并开始分泌釉质基质;牙乳头周边的成牙本质细胞极化,开始分泌前期牙本质基质;主要牙尖区牙本质基质较厚,极化的成釉细胞、分泌型成牙本质细胞及基底膜全层染成棕色,TGF- $\beta 3$  呈强阳性表达;牙乳头临近周边区域的阳性细胞染成黄色,呈阳性表达,中间区域的阳性细胞分散排列,呈弱阳性表达(图 1)。

### 2.2 11dpn 牙胚

成釉细胞及成牙本质细胞分化成熟,已分泌一定厚度的牙釉质及牙本质层,基底膜已断裂消失,成釉细胞层染成黄色,TGF- $\beta 3$  表达为阳性,成牙本质细胞、牙乳头细胞染成淡黄色,均表达为弱阳性(图 2)。

### 2.3 18dpn 牙胚

牙冠部分发育完成,牙周膜中的血管壁及周围染成黄色,TGF- $\beta 3$  表达为阳性;牙本质、牙骨质、牙周膜成纤维细胞无染色,表达为阴性(图 3)。

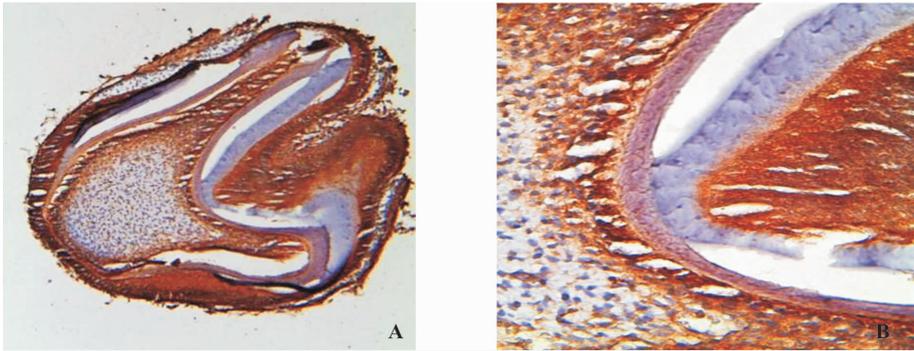


图 1 4dpm 牙胚的免疫组化染色。极化的成釉细胞、分泌型成牙本质细胞及基底膜全层染成棕色,牙乳头临近周边区域的阳性细胞染成黄色,中间区域的阳性细胞分散排列。A:HE,  $\times 100$ ; B:HE,  $\times 400$ 。

Fig. 1 Immunohistochemical staining results of 4dpm tooth germ. Strong positive expression in enameloblasts and odontoblasts, positive expression in ambitus of dental papilla, and weak positive expression in the intermedial area of dental papilla are seen. A:HE,  $\times 100$ ; B:HE,  $\times 400$ .

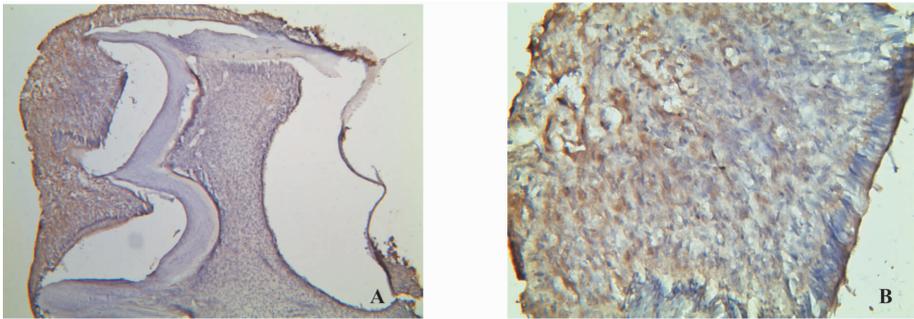


图 2 11dpm 牙胚的免疫组化染色。成釉细胞层染成淡黄色,成牙本质细胞、牙乳头细胞无染色。A:HE,  $\times 100$ ; B:HE,  $\times 400$ 。

Fig. 2 Immunohistochemical staining results of 11dpm tooth germ. Weak positive expression in enameloblasts, and negative expression in odontoblasts and dental papilla are showed. A:HE,  $\times 100$ ; B:HE,  $\times 400$ .

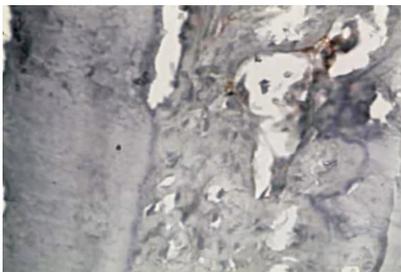


图 3 18dpm 牙胚的免疫组化染色 (HE,  $\times 400$ )。牙本质、牙骨质、牙周膜成纤维细胞无染色,牙周膜中的血管壁及周围染成黄色。

Fig. 3 Immunohistochemical staining results of 18dpm tooth germ (HE,  $\times 400$ ). Positive expression in the vessel wall and its surrounding, and negative expression in other areas are revealed.

### 3 讨 论

TGF- $\beta_3$  通过与靶细胞上的受体结合后进行一系列信号转导,从而发挥其调控作用。以往的研究<sup>[5-6]</sup>表明 TGF- $\beta_3$  在牙胚发育过程中均呈时间-空间特异

性模式表达,说明其在调控上皮-间充质相互作用及成牙本质细胞和成釉细胞的分化中起了重要作用。

本实验结果显示:4, 11 及 18dpm 小鼠牙胚 TGF- $\beta_3$  的表达分布不断变化,其变化规律在不同的组织中各有特点。4dpm 小鼠牙胚处于钟状晚期,成釉细胞和成牙本质细胞的分化接近完成,并已开始分泌釉质基质和牙本质基质。成釉细胞层、成牙本质细胞层、基底膜中 TGF- $\beta_3$  均呈强阳性表达,牙乳头细胞呈阳性表达,这一结果与朱奇等<sup>[5]</sup>检测的结果基本一致,11dpm 小鼠牙胚成釉细胞和成牙本质细胞已分化成熟,已有矿化的牙釉质和牙本质层,此时的牙乳头虽可以称为牙髓,但牙乳头细胞尚未全部分化为牙髓细胞;TGF- $\beta_3$  在成釉细胞层表达为弱阳性,成牙本质细胞、牙乳头细胞都表达为阴性。18dpm 小鼠牙胚冠部发育已结束,牙釉质及冠部牙本质已发育完成,牙根正在发育中;TGF- $\beta_3$  在牙周膜中的血管壁及周围表达为阳性,牙本质、牙骨质、牙周膜成纤维细胞中表达阴性。TGF- $\beta_3$  在成釉细胞中的表达随着牙胚的发育而逐渐减弱。提示

TGF- $\beta$ 3 对成釉细胞的调控作用可能随着时间的增加而逐渐衰减。

4dpm 小鼠牙胚的成牙本质细胞层表达为强阳性,表明 TGF- $\beta$ 3 对此期成牙本质细胞的分化可能有重要的调控作用,而在 11dpm 及 18dpm 则为阴性,提示调控作用可能只发生在牙本质发育的早期——成牙本质细胞分化和分泌开始的阶段。许多研究证实 TGF- $\beta$ 3 对多种间充质细胞的分化有促进作用<sup>[7-8]</sup>,同时具有刺激 I 型胶原合成与成熟的作用<sup>[9]</sup>,牙本质基质的主要有机成分为 I 型胶原<sup>[10]</sup>,推测 TGF- $\beta$ 3 可能通过刺激成牙本质细胞 I 型胶原的合成与分泌从而促进早期牙本质基质的分泌和沉积。在晚期成牙本质细胞分化完成、牙本质进入矿化阶段,TGF- $\beta$ 3 的表达为阴性,提示此时 TGF- $\beta$ 3 可能已失去了对牙本质形成的调控作用。结合 TGF- $\beta$ 3 在牙釉质、牙本质发育过程中的表达变化,笔者认为其对牙体硬组织发育的调控可能仅在早期起作用,后期牙体硬组织的发育可能主要由其他细胞因子调控。

在牙胚的发育过程中,上皮-间充质的相互诱导作用非常重要,上皮来源的 TGF- $\beta$ 3 可能主要以自分泌方式调控间充质细胞的生长和分化,以旁分泌方式调控上皮-间充质相互作用。研究<sup>[11-12]</sup>证明,内釉上皮对成牙本质细胞的调控作用是通过基底膜实现的。在成牙本质细胞开始分化前,基底膜是完整连续的,其主要成分为各种细胞外基质蛋白,内釉上皮诱导成牙本质细胞分化时,一些细胞因子从内釉上皮中分泌出来,透过基底膜扩散,导致基底膜逐渐变为不连续直到最终消失。4dpm 的牙胚基底膜 TGF- $\beta$ 3 表达呈强阳性,表明在成牙本质细胞分化过程中 TGF- $\beta$ 3 可能作为一种从内釉细胞分泌出的细胞因子参与诱导成牙本质细胞的分化,从而调控上皮-间充质的相互诱导。11dpm 及 18dpm 时牙胚的基底膜已断裂消失,其介导上皮间充质相互作用的功能随着结构的改变而减退,导致未检测到 TGF- $\beta$ 3 的表达。

另外,在 18dpm 小鼠牙胚的牙周膜中血管壁及管周可见 TGF- $\beta$ 3 表达阳性,说明 TGF- $\beta$ 3 对牙周膜血管的发生可能具有一定作用,具体机制有待进一步研究。本实验表明:TGF- $\beta$ 3 在小鼠牙胚钟状晚期以后发育过程中的表达具有一定的时空分布性,可能在牙胚的发育中有一定作用,这种作用可能随着牙胚的发育而逐渐减弱。

## 参考文献:

[1] Chai Y, Ito Y, Han J. TGF-beta signaling and its func-

tional significance in regulating the fate of cranial neural crest cells[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2003, 14(2): 78-88.

- [2] Garcia-Molina J A, Vallespi-Miro G. The role of fibroblast growth factor (FGF) and type beta transforming growth factor (TGF-beta 1-beta 2-beta 3) during rat craniofacial development[J]. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol, 2003, 45(2/3):66-78.
- [3] Schultze S, Wehrhan F, Amann K, et al. in vivo TGF-beta 3 expression during woundhealing In irradiated tissue[J]. Strahlenther Onkol, 2003, 179(6):410-416.
- [4] Befagna G, Occhi G, Nava A, et al. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type1[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(2):366-371.
- [5] 朱奇,樊明文. 转化生长因子  $\beta$ 3 mRNA 在小鼠磨牙牙胚发育过程中的表达[J]. 武汉大学学报:医学版, 2007, 28(4): 504-506.  
ZHU Qi, FAN Mingwen. Expression of transforming growth factor-beta3 mRNA during mouse molar development[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2007, 28(4):504-506.
- [6] Moriguchi M, Yamada M, Miake Y, et al. Transforming growth factor beta inducible apoptotic cascade in epithelial cells during rat molar tooth eruptions[J]. Anat Sci Int, 2010, 85(2):92-101.
- [7] 郑东,杨述华. 工程化生长转化因子  $\beta$ 3 促进软骨前体细胞向软骨分化的实验研究[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007, 27(6):558-561.  
ZHENG Dong, YANG Shuhua. The engineered TGF- $\beta$ 3 promoted the differentiation of chondrogenic progenitor cells into chondrocytes in vitro[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing, 2007, 27(6):558-561.
- [8] 赵基栋,祝建中. TGF- $\beta$ 3 诱导骨髓间充质干细胞表达软骨细胞表型的实验研究[J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(11): 45-48.  
ZHAO Jidong, ZHU Jianzhong. The experiment study of the differentiation of bone marrow mesenchmal stem cells to express the phenotype of chondrocyte lineage by transforming growth factor- $\beta$ 3 in vitro[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2005, 9(11):45-48.
- [9] 张世平,卢日峰. 人转化生长因子  $\beta$ 3 的构建[J]. 吉林大学学报:医学版, 2006, 32(4):565-567.  
ZHANG Shiping, LU Rifeng. Construction of human transforming growth factor-beta3[J]. Journal of Jilin University. Medicine Edition, 2006, 32(4):565-567.
- [10] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:55.  
YU Shifeng. Oral histology and pathology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007:55.
- [11] Huojia M, Muraoka N, Yoshizaki K, et al. TGF-beta3 induces ectopic mineralization in fetal mouse dental pulp during tooth germ development[J]. Dev Growth Differ, 2005, 47(3): 141-

152.

- [12] Iohara K, Nakashima M, Ito M, et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2[J]. J Dent Res, 2004, 83 (8): 590-595.

(本文编辑 陈丽文)