文章编号:1000-5404(2008)01-0057-03

论著

大鼠第一腮弓细胞构建组织工程牙本质-牙髓复合体样结构

邓蔓菁,陈小红,刘鲁川,安建平,匡桂英 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察胚胎 12.5 d(E12.5 d)大鼠第一腮弓上皮及外胚间充质细胞离散后肾被膜下移植的成牙能力。**方法** 切取 E12.5 d 大鼠第一腮弓(下颌突),酶消化离心后与明胶海绵支架复合植入大鼠肾被膜下,4 周后收获移植物,对移植物进行组织学观察和免疫组化抗牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)检测。**结果** 种植 4 周,植入细胞在肾被膜下形成牙本质-牙髓复合体样结构。DSP 在新生的牙本质组织中呈阳性表达。Masson 三色法显示绿色矿化基质形成。**结论** E12.5 d 大鼠第一腮弓细胞部分保留了牙齿自然发育的遗传信号,在肾被膜下可以构建形成牙本质-牙髓复合体样结构。

关键词:第一腮弓细胞;牙本质-牙髓复合体;牙齿发育
中图法分类号:R318.08;R782;R783.1 **文献标识码:**A

Tissue engineering of dentin-pulp complex-like structures by rat first branchial arch cells

DENG Man-jing, CHEN Xiao-hong, LIU Lu-chuan, AN Jian-ping, KUANG Gui-ying (Department of Stomatology, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the odontogenetic ability of first branchial arch cells of E12.5 rats. Methods First branchial arch cells (mandibular process) of E12.5 SD rats were isolated enzymatically and collected. After combined with gelatin sponge, the cells were transplanted into the renal capsule of a rat. The specimen was taken out and evaluated by histological and immunohistochemical methods in 4 weeks after growth in renal capsule. Results The first branchial arch cells with gelatin sponge developed dentin-pulp complex-like structure. Dentin sialoprotein (DSP) was expressed in the newly formed dentin-like structure. The green mineralized matrix was further identified with Masson's trichrome staining. Conclusion Cells from first branchial arch of E12.5 rats can partially keep genetic signal of tooth growth and form dentin-pulp complex-like structure in renal capsule.

Key words: the first branchial arch cells; dentin-pulp complex; odontogenesis

新近的研究报道,牙胚细胞复合支架材料后能形成较为有序、甚至是完整的组织工程化牙齿[1,2]。说明牙胚细胞的规则排列破坏后,细胞可能重新识别并形成了有利于形成牙齿组织的细胞排列,细胞在重组的过程中没有丧失形态发生信息和位置信息。对于牙齿发育刚刚启动的胎胚 12.5 d(E12.5 d)的颌突,细胞离解后也能像出生后的牙胚细胞一样,模拟体内牙齿的发生过程,保留其携带的遗传信息,进而形成牙齿样结构吗?为此,我们解离了 E12.5 d 的大鼠下颌突,以观察细胞重组能否模拟体内的发生过程。

基金项目:第三军医大学科研创新基金(2004);重庆市自然科学基金(2005BB5307,2007BB5075)
Supported by Research Foundation for Sci & Tech Innovation of Third Military Medical University (2004) and Natural Science Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2005BB5307 and 2007BB5075)
作者简介:邓蔓菁,女,重庆市人,博士,副教授,主要从事口腔颌面部早期分化、发育方面的研究。电话:(023)68757575
收稿日期:2007-04-25;修回日期:2007-10-26

1 材料与方法

1.1 材料

孕 12.5 d SD 大鼠 4 只,8 周体质量 200 g 左右 SD 大鼠 4 只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

DMEM(低糖)培养基、胎牛血清(FBS)、抗 DSP 多抗(张莹博士惠赠);LSAB 免疫组化检测试剂盒(DAKO,USA)。

1.2 方法

1.2.1 E12.5 d 胎鼠第一腮弓下颌突细胞的获得 雌雄同笼的 SD 大鼠,第 2 日晨观察阴栓,以零点计时,12:00 为胚胎 0.5 d。取第 12.5 天孕鼠,脱颈处死,取出胚胎,切取下颌突,分切为 0.5 mm×0.5 mm 组织块,Ⅰ型胶原酶 37 ℃消化 0.5 h,反复吹打后 70 μm 筛网过滤形成单细胞悬液,将细胞悬液吸入 15 ml 聚丙烯离心管中,500×g 离心 5 min 后在细胞团块中加入含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37 ℃、50 ml/L

CO_2 培养箱中培养 4 ~ 6 h，准备移植前将细胞取出，置于明胶海绵表面。

1.2.2 下颌突细胞肾被膜下种植 SD 大鼠采用戊巴比妥钠按 30 mg/kg 肌注麻醉，常规脱毛、消毒铺巾，背部右肋下切口并暴露右肾，小心游离肾被膜形成囊袋，显微操作下将含细胞团块的明胶海绵接种到 SD 大鼠肾被膜下，10-0 尼龙线缝合被膜，逐层关闭创面。术后常规护理，观察大鼠存活情况。

1.2.3 组织学观察 术后 4 周取材。脱颈处死接种大鼠，暴露肾脏，分离种植体，并立刻将其浸入 4% 多聚甲醛中固定 24 h，然后在混合酸中脱钙 1 周，流水冲洗过夜，梯度酒精脱水，浸蜡后石蜡包埋，制成 5 μm 厚组织切片，行 HE 染色及 Masson 三色法染色，显微镜观察移植物的组织形态及矿化情况。

1.2.4 免疫组化检测 接种 4 周切片，按试剂盒所示程序进行抗大鼠牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein，DSP)免疫组化染色。

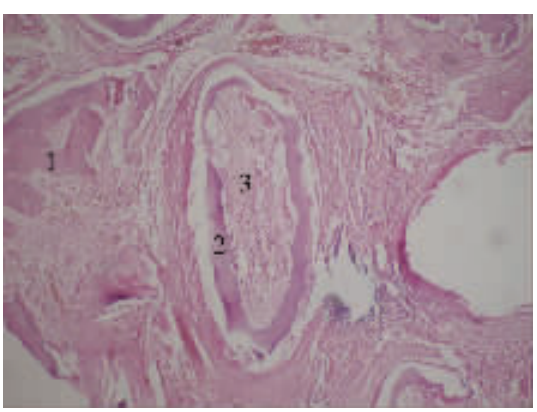
2 结果

2.1 移植前后组织大体观察

离心后细胞聚合为球状或片状，质地较脆，组织学观察离心后细胞为均一圆形，存在大量细胞间质，但无任何该时期颌突发育相似的细胞排列，上皮和间充质细胞也无明显区别。移植 4 周，肉眼观察移植物为乳白色，与移植前相比，体积变大，质地变硬，有硬组织样结构形成。

2.2 移植物组织学检测

4 周取材，组织学检测可见细胞团块消失，细胞游走并重新排列，可见明显的牙本质-牙髓复合体样结构形成。形成的牙本质样结构有明显的牙本质小管样结构，并可见成牙本质细胞单侧细长的细胞质突起被埋入新沉积的牙本质基质中。在牙本质-牙髓复合体样结构的表面，未见极化的成牙本质样细胞。在牙本质-牙髓复合体样结构的周围，可见骨样结构形成，未见牙釉质样结构形成(图 1)。



1：骨样结构；2：牙本质样结构；3：牙髓样结构

图 1 牙本质-牙髓复合体样结构 (HE ×40)

2.3 移植物免疫组化染色

4 周切片，可见牙本质小管样结构，在牙本质样结构中可见牙本质涎蛋白(DSP)呈阳性表达(图 2)。

2.4 Masson 三色法染色

移植物 Masson 三色法显示绿色矿化基质形成，围绕牙髓样组织。绿色矿化基质可见明显的牙本质小管样结构(图 3)。

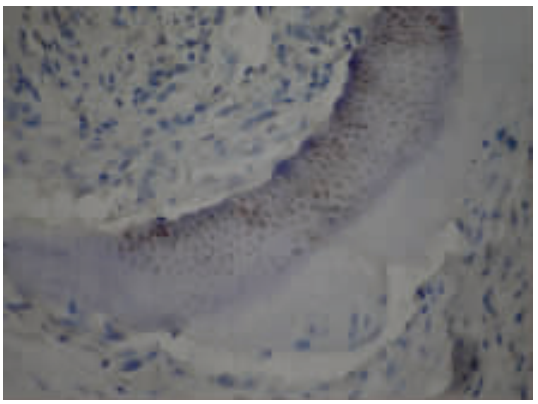


图 2 新生的牙本质样结构表达牙本质涎蛋白 (LSAB ×200)

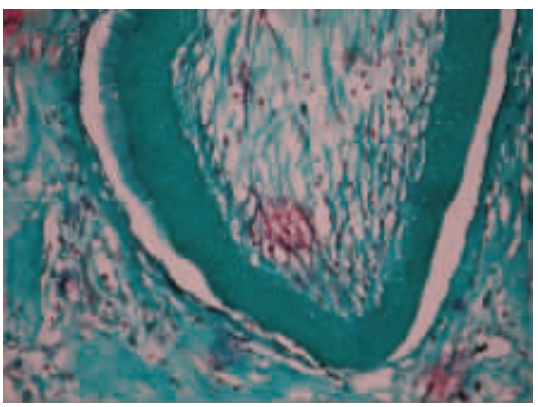


图 3 Masson 三色法显示绿色矿化基质 (Masson 三色法 ×200)

3 讨论

牙齿的发生、发育是来自外胚层的口腔上皮和来自颅神经嵴的外胚间充质细胞相互诱导、相互作用的复杂生物学过程。在牙胚发育的早期，局部的口腔上皮增厚形成上皮板，上皮板上特定部位增生并向深层结缔组织内延伸，在固定区域提供成牙信息，指导其周围的外胚间充质细胞分化。在牙源性上皮的诱导下，牙源性间充质进一步分化形成牙本质和牙髓，而上皮在间充质的诱导下形成成釉器，进而形成牙釉质。在这个过程中，上皮和间充质相互、反复作用，最终形成牙齿。

研究表明，分离后的小鼠牙胚组织，上皮和间充质都不能经历细胞分化形成牙齿组织。小鼠 E11 d 的牙上皮与非牙源性间充质重组能发育形成牙齿结构，但 E12 d 后，将牙上皮与非牙源性间充质重组则不能形成牙齿结构。表明 E11 d 牙的发育潜能在上皮，而 E12 d 牙的发育潜能在间充质。诱导成牙能力和成牙能力在这两种组织间相互转化[3]。

对牙胚细胞的重聚实验显示[1,2]，将牙胚胚层分离，各自解离为单细胞，然后重聚，仍然形成了有序的牙齿组织，牙胚细胞的位置信息并没有丢失。2004 年，Duailibi 等[4]将大鼠牙胚细胞体外培养 6 d 后复合

支架材料培育出完整的组织工程化牙齿结构,在细胞扩增的时候,他们所携带的遗传信息似乎并没有过多的丢失。陈小红等[5]研究结果显示,出生后的牙胚即使分离为单细胞状态,在大鼠肾被膜下很短的时间内也能发育为牙胚样形态,形成牙本质、牙釉质及牙乳头样结构,进一步证实了出生后牙胚细胞也存在牙胚形态发生信息。这些结果证实了牙胚发育过程中牙胚细胞保留了形态发生信息。

对牙齿组织工程研究最多的是牙胚细胞,研究结果令人振奋。但对牙齿刚刚发生时(如 E12.5 d,蕾状早期)的口腔上皮和外胚间充质细胞的成牙能力却少见研究报道。对同时期颌突组织的体内培育结果显示,组织块在体内可以继续发育形成牙齿样结构,其形成过程与正常牙齿发育过程相似。而离散的颌突细胞是否仍然保留了牙齿的发育信号和位置信号,它们在体内培育是否可以形成牙齿样结构?在本研究中,种植在肾被膜下的颌突细胞形成了牙本质-牙髓复合体样结构,但形成的牙本质-牙髓复合体样结构没有牙尖的形态,牙本质下的牙髓样细胞表面中也没有细胞核极化的成牙本质样细胞形成。在牙本质的外层,没有发现牙釉质样结构。牙釉质的形成与牙源性上皮的存在密切相关,这可能与取材时口腔上皮所蕴含的成牙信息的程度相关。在牙齿发育的初期,细胞所蕴藏的成牙信息可能还不够完善,在上皮和外胚间充质被离解重组后,牙齿的初始发生被打断,估计成牙信息还未完全发生或成熟。此时的细胞重组,部分丧失了牙齿形态发生信息和位置信息,使形成的牙齿样结构不完整。与牙胚细胞的成牙能力及保留的位置信息相比较,此时牙齿的形成能力还相当不完善。本研究结果没有显示细胞重新获得完整的成牙信息和位置信息,估计这与取材的时间有关。下一步我们将通过扩大取材时间范围,延长体内种植时间来研究牙齿发育初始期细胞成牙能力,为获取牙齿早期发育的规律提供实验依据。

参考文献:

[1] Yamamoto H, Kim E J, Cho S W, *et al*. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo[J]. J Electron Microsc (Tokyo), 2003, 52(6):559 – 566.

[2] Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, *et al*. Dental epithelial histo-morphogenesis in the mouse:positional information versus cell history[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(2):131 – 136.

[3] Cobourne M T, Sharpe P T. Tooth and jaw:molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch[J]. Arch Oral Biol, 2003, 48(1):1 – 14.

[4] Duailibi M T, Duailibi S E, Young C S, *et al*. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells[J]. J Dent Res, 2004, 83(7):523 – 528.

[5] 陈小红,金　岩,刘鲁川, 等. 出生后牙胚细胞肾被膜移植的成牙能力研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(7):363 – 366.

(编辑　吴培红)

(上接 52 页)

表 1　总 IgE 和特异性 IgE 阳性率[%(阳性例数)]

组别	n	总 IgE	食入组特异性 IgE	吸入组特异性 IgE
急性荨麻疹	109	100%(109)	65.1%(71)	11.0%(12)
慢性荨麻疹	211	97.6%(206)	15.2%(32)[a]	55.0%(116)[a]

a:$P<0.01$,与急性荨麻疹组比较

2.2　过敏原检出情况

过敏原检出结果:屋尘 75 例(23.4%);尘螨、粉螨 98 例(30.6%);霉菌 63 例(19.7%);豚草 5 例(1.6%);蒿属植物 14 例(4.4%);桑树、榆树 37 例(11.6%);鱼类 24 例(7.5%);虾蟹类 43 例(12.5%);牛奶 11 例(3.4%);蛋类 21 例(6.6%);豆类 15 例(4.7%)。可以得出:①由于慢性荨麻疹以吸入过敏原为主,急性荨麻疹以食入过敏原为主,而在同一时期内慢性荨麻疹患者例数明显大于急性荨麻疹,所以吸入过敏原阳性例数占全部患者的比例明显高于食入组。②通过对 320 例急慢荨麻疹过敏原检测分析,吸入组中致荨麻疹的过敏原最高的是尘螨、粉螨和屋尘;食入组中以虾蟹类和鱼类为主。

3　讨论

根据总 IgE 和特异性 IgE 检测结果,两组总 IgE 阳性率高,总 IgE 升高可以反映出患者普遍存在高敏状态,而特异性 IgE 检出阳性率不同,这与实验中特异 IgE 检测种类有限有关,因此在临床中,找出部分患者的致病因素是很困难的。另外,急性荨麻疹组以食入性特异 IgE 这主,而慢性荨麻疹以吸入性特异 IgE 为主,也说明两者在致病因素上是有明显差异的,了解这种差异有助于致病因素的寻找及控制病情。

引起荨麻疹的病因复杂,特别是慢性荨麻疹过敏原的寻找非常困难。通过对 320 例荨麻疹过敏原检测分析,吸入组中致荨麻疹的主要过敏原尘螨、粉螨、屋尘和霉菌;食入组中以虾蟹类和鱼类为主。因此以上结果提示螨类、霉菌类、虾蟹类、鱼类这些物质为本地区荨麻疹患者的主要过敏原。这与其他地区报道的结果不尽相同[2],表明引起过敏性疾病的过敏原种类较广泛,且有地区差异性。因此对患者过敏原的诊断应结合病史和实验室特异性过敏原的检测结果来综合分析。

关键词:荨麻疹;特异性 IgE;过敏原
中图法分类号:R758.24　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 王侠生,廖康煌. 杨国亮皮肤病学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2005:406 – 411.

[2] 朱向荣, 辛崇美, 王彬彬, 等. 2436 例慢性荨麻疹过敏原检测[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(6):482 – 483.

[3] 周　辉, 龚志军, 唐发清, 等. 过敏患者血清总 IgE 及特异性 IgE 分析[J]. 实用预防医学, 2005, 12(2):266 – 267.

(编辑　郭建秀)