文章编号:1000-5404(2010)24-2659-02

短篇论著

高氟对人成釉细胞的凋亡作用及相关基因表达的影响

陈黎明,冯 莉,杨 威,田茂能,王颖莉 (550002 贵阳,贵阳市口腔医院内科)

【摘要】 **目的** 观察高氟区和非高氟区人牙胚成釉细胞形态变化及凋亡相关基因bcl-2及bax的表达。**方法** 经知情同意在高氟区及非高氟区分别取引产胎儿牙胚设为试验组与对照组,组织学观察,免疫组化技术检测成釉细胞中bcl-2及bax的表达,测定母体尿氟。**结果** 试验组母体尿氟含量高于正常范围($P<0.01$),成釉细胞排列不规则,高度变矮,少量细胞发生扭曲,并在细胞质内有空泡产生,TUNEL检测显示有较多凋亡细胞,与对照组相比bcl-2表达减弱,bax表达增强。**结论** 高氟导致人牙胚成釉细胞损伤及凋亡。高氟对成釉细胞的凋亡作用可能是通过调节Bcl-2和Bax表达机制诱导细胞凋亡发生。

【关键词】 氟牙症;成釉细胞;bcl-2基因;bax基因
【中图法分类号】 R322.41;R329.28;R345.8 **【文献标志码】** A

细胞凋亡在胚胎发育、器官形成,以及器官维持自身平衡的过程中发挥着至关重要的作用[1-2]。以往研究证实,牙齿发育的蕾状期、帽状期、钟状期均有细胞凋亡现象[2-3]。本试验研究高氟对人牙胚成釉细胞毒性作用及bcl-2和bax表达的影响,并与对照组比较,探讨氟斑牙的形成机制。

1 资料与方法

1.1 试剂

bcl-2、bax多克隆抗体,SABC试剂盒,DAB显色液(北京中杉),原位细胞凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannhiem)。

1.2 切片制备

2007年1月至2008年1月分别在贵州省地氟病重病区织金县及非地氟病区遵义县经知情同意取合法引产胎儿10例设为试验组和对照组,据母亲停经史及胎儿顶臀长测定胎龄为14~28周,不分性别。试验组母亲常年居住当地,患不同程度氟牙症,对照组母亲均无氟牙症。引产30 min后仔细解剖分离胎儿下颌骨,去净软组织,40 g/L多聚甲醛固定24 h,100 g/L EDTA 4 ℃脱钙4周,常规脱水,石蜡包埋,作颊舌向连续切片,切片厚4 μm,4 ℃下保存。

1.3 母体尿氟测定

采用氟离子选择性电极法分别测试验组与对照组母体晨尿尿氟。

1.4 免疫组化染色

采用SABC法。切片常规脱蜡至水,新鲜配置3%双氧水室温封闭10 min;0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液微波抗原修复10 min;滴加正常山羊血清37 ℃封闭20 min,弃去多余血清,不洗;滴加适当稀释的一抗,4 ℃湿盒过夜;37 ℃复温1 h,滴加生物素化二抗37 ℃ 20 min;滴加SABC复合物37 ℃ 20 min。上述各步完成之后均用0.02 mol/L PBS洗2次,每次5 min。DAB室温下显色5~30 min,显微镜下终止显色,充分水洗;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5 图像及统计学分析

应用Image-Pro-Plus5.1图像分析系统对免疫组化染色结果进行图像分析,以平均灰度值代表蛋白表达水平。数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 11.5统计软件对2组数据进行配对资料的t检验。

2 结果

母体尿氟含量:试验组(3.341±0.092) mg/L,对照组(0.925±0.071) mg/L。试验组尿氟含量高于正常范围($P<0.01$),说明该组母体氟负荷较重,机体处于高氟水平。

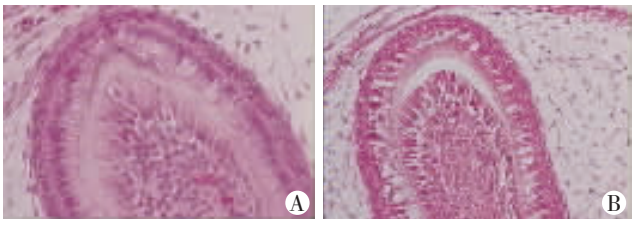
光镜下对照组钟状期成釉细胞伸长极化呈单层柱状沿基底膜整齐排列,核远离基底膜,有成釉细胞突起即Tome's突深入釉基质。试验组钟状期成釉细胞排列极不规则,高度变矮,细胞扭曲,且成釉细胞之间多见空泡性变,Tome's突极不规则或消失。见图1。

TUNEL检测显示,对照组钟状期阳性细胞较少见(0.13±0.02),试验组钟状期可见到较多阳性凋亡细胞(0.51±0.04)($P<0.01$),细胞核呈深棕褐色。

对照组bcl-2在钟状期成釉细胞生长增殖中心部位:成釉器内釉上皮凹面中心区域、未来牙尖形成部位、颈环处及周围的牙乳头、牙囊中阳性表达。试验组与对照组相比阳性表达明显减弱,见图2。对照组与试验组结果有显著性差异($P<0.01$);Bax在对照组钟状期成釉细胞生长增殖中心部位表达较

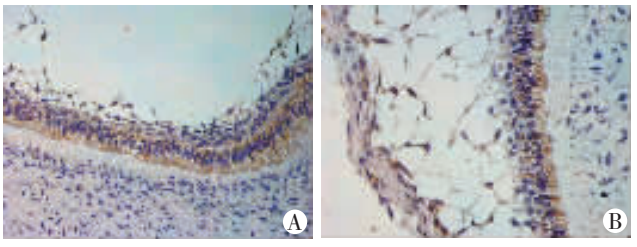
【基金项目】 贵州省优秀科技教育人才省长专项基金(黔省专合字[2005]380号);贵阳市科技三项费[(2006)第25号]
【通信作者】 陈黎明,电话:(0851)5572796,E-mail:lmchen06242004@yahoo.com.cn

弱。试验组与对照组相比阳性表达明显增强，见图3。对照组与试验组结果有显著性差异（$P<0.01$）。



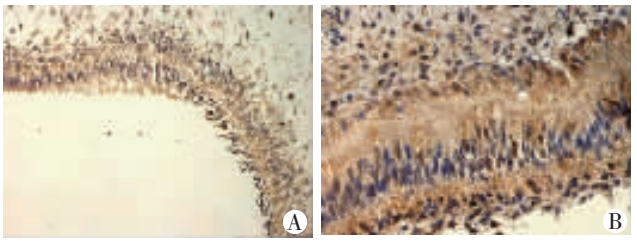
A：对照组；B：试验组

图1 2组人牙胚切片病理观察结果（HE ×400）



A：对照组；B：试验组

图2 免疫组化观察2组人牙胚钟状期bcl-2的表达（SABC ×400）



A：对照组；B：试验组

图3 免疫组化观察2组人牙胚钟状期bax的表达（SABC ×400）

3 讨论

氟牙症是牙齿发育过程中，机体摄入过量氟导致釉质发育、矿化障碍而形成的。以往对氟牙症发病机制的研究多是通过建立动物氟牙症模型或体外培养人牙胚的方式进行的[4]，本试验分别取合法引产胎儿乳牙胚做标本设为试验组和对照组，研究结果为氟牙症形成机制的研究提供了更直接的实验室依据。

研究发现，试验组母体尿氟，高于正常范围[5]，说明该组母体摄氟负荷较重，机体处于高氟水平。光镜、细胞凋亡TUNEL检测结果表明高氟导致人牙胚成釉细胞损伤及凋亡。bcl-2家族是细胞凋亡过程中的一类调节因子，其包含2类功能相反的基因：一类是抑制细胞凋亡的基因如bcl-2、bcl-X；另一类是促进细胞凋亡的基因如bax、bad等，他们具有不同的结构、功能和分布[6-8]。bcl-2与bax可形成同二聚体，也可相互作用形成异二聚体，以决定是否接受凋亡信号或凋亡抑制信号。bcl-2增高，抑制细胞凋亡，bax增高，促进细胞凋亡[9-11]。免疫组化结果显示对照组bcl-2高表达。试验组bcl-2表达较对照组明显减弱，而bax表达较对照组明显增强，推断过量氟对成釉细胞的毒性作用可能是通过抑制bcl-2/bax的表达而诱导细胞凋亡的发生。在此机制下，某些正常分泌前期和分泌期成釉细胞可能过早地凋亡，从而造成功能性成釉细胞数量减少，进而成釉细胞分泌釉质基质以及清除釉质蛋白的能力下降，于是导致了釉质发育及矿化不全的发生。

参考文献：

[1] Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development[J]. Annu Rev Genet, 2009, 43：493－523.

[2] Tamura M, Nemoto E, Sato M M, *et al*. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2010, 2：1405－1413.

[3] 赵书芳，金岩，李松，等. 细胞增殖与凋亡在牙齿发育中的作用[J]. 华西口腔医学杂志，1999，17(2)：99－101.

[4] 杨威，柴松宏，陈黎明，等. 氟化物作用下成釉细胞凋亡及c-myc表达变化[J]. 第三军医大学学报，2007，29(22)：2199－2200.

[5] 贵阳医学院，贵州省环境保护监测站，毕节县卫生局. 贵州地方性食物性氟中毒病[J]. 中华预防医学杂志，1979，13(3)：148－151.

[6] Patel M P, Masood A, Patel P S, *et al*. Targeting the Bcl-2[J]. Curr Opin Oncol, 2009, 21(6)：516－523.

[7] LeBrun D P, Warnke R A, Cleary M L. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis[J]. Am J Pathol, 1993, 14(3)：743－753.

[8] Soria-González J E, Orea-Solano M. Apoptosis[J]. Rev Alerg Mex, 2002, 49(4)：121－128.

[9] Escandell J M, Recio M C, Giner R M, *et al*. Bcl-2 is a negative regulator of interleukin-1beta secretion in murine macrophages in pharmacological-induced apoptosis[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(7)：1844－1856.

[10] Bouaziz C, Sharaf-El-Dein O, Martel C, *et al*. Molecular events involved in ochratoxin A induced mitochondrial pathway of apoptosis, modulation by Bcl-2 family members[J]. Environ Toxicol, 2010 Apr 12. [Epub ahead of print]

[11] Esposito F, Tornincasa M, Chieffi P, *et al*. High-mobility group A1 proteins regulate p53-mediated transcription of Bcl-2 gene[J]. Cancer Res, 2010, 70(13)：5379－5388.

（收稿 2010-06-30 修回 2010-08-31）

（编辑 王 红）