DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.043

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1222-04

BMP_2在大鼠牙髓损伤修复中的表达及其对牙髓细胞的生物学效应

何 飞[1],谭颖徽[1],杨峥嵘[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院口腔科,重庆 400037;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 从体内体外两方面探讨BMP_2在牙髓损伤修复,尤其是牙髓细胞分化过程中的作用。方法 建立大鼠牙髓损伤修复模型和体外人牙髓细胞连续培养,采用免疫组织化学、MTT法和酶动力学等方法,检测BMP_2在体内牙髓组织损伤修复过程中的表达,并比较不同浓度$rhBMP_2$对体外人牙髓细胞连续培养各阶段细胞增殖活性及ALP活性的影响。结果 体内牙髓组织损伤修复过程中存在BMP_2的表达,牙髓组织损伤修复的不同阶段其表达部位和强度发生变化;$rhBMP_2$可提高体外培养人牙髓细胞的增殖活性,与其本身浓度有关,并可促进人牙髓细胞ALP活性,呈浓度依赖性;结论 BMP_2是参与牙髓损伤修复,尤其是牙髓细胞的增殖和分化的重要因子之一。

关键词:牙齿;损伤;骨形成蛋白;细胞培养
中图法分类号:R341;R781.31 文献标识码:A

Expression patterns of bone morphogenetic protein-2 during the healing of injured dental pulp *in vivo* and its biological effects on proliferation and differentiation of human dental pulp cells *in vitro*

HE Fei, TAN Ying-hui, YANG Zheng-rong (Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the roles of bone morphogenetic protein-2 (BMP_2) in the healing of injured dental pulp *in vivo* and *in vitro*. Methods The expression patterns of BMP_2 during the healing of injured dental pulp were studied with immunohistochemistry and the effects of recombinant human bone morphogenon-2 ($rhBMP_2$) on proliferation and differentiation of cultured human dental pulp cells were also studied in this experiment. Results The results clearly demonstrated that BMP_2 were expressed in the course of rat dental pulp healing, its expression sites and levels of their expression were changed with different phases; $rhBMP_2$ increased the proliferation of dental pulp cells and ALP activity in a dose-dependent manner. Conclusion BMP_2 plays an important role in the healing of injured dental pulp, which may be due to promote the differentiation of dental pulp cells to odontoblasts.

Key words: dental injury; odontoblast; bone morphogenetic protein-2; cell culture

牙髓组织具有自身修复潜能,当其受到创伤或感染时,牙髓细胞可分化为成牙本质细胞,分泌牙本质基质,形成修复性牙本质,这是临床保存活髓治疗的基础。骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)是一种广泛分布于动物骨组织中的酸性蛋白质,体内动物实验研究证明,$rhBMP_2$作为盖髓剂可促进修复性牙本质的形成[1,2],但对其作用机制的了解尚不全面。本实验拟通过建立大鼠牙髓损伤修复模型和体外人牙髓细胞连续培养,从体内体外两方面研究BMP_2在牙髓损伤修复,尤其是牙髓细胞分化过程中的作用,进一步为其应用于临床保存活髓治疗打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心);BMP_2单克隆抗体(第四军医大学金岩博士惠赠);$rhBMP_2$(中国军事医学科学院);牙科高速涡轮机(上海);石蜡切片机(上海);高糖DMEM培养液(Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibco);优等胎牛血清(Fetal bovine Serum, FBS, Hyclon);SABC试剂盒(博士德公司);碱性磷酸酶测定试剂盒(北京中生生物制品公司);1 g/L TritonX-100(华美生物工程公司);酶联免疫检测仪(Beckman, USA);胰蛋白酶(Gibco, USA);24孔细胞培养板(Gibco, USA);YMT-Z型倒置显微镜(Olympus, Janpan);CO_2孵箱(QUEUE, USA);YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂)。

1.2 大鼠牙髓损伤修复模型的制作及标本制备

18只Wistar大白鼠,体重200~250 g,0.4%苯巴比妥钠(Sodium pentobarbital)腹腔注射麻醉(10 ml/kg)。参照并改进Hu[3]的方法,碘酒口腔消毒后,用牙科高速涡轮机分别在上、下颌第一磨牙牙合面远中制备单面洞,窝洞直径约2 mm,深度为1.2~1.5 mm,可见一细小穿髓点,充分止血后用聚羧酸锌水门汀充填。每只动物左上第一磨牙未备洞,作为空白对照。分别在术后第12 h、24 h、72 h、7 d、14 d和21 d处死动物。动物处死后迅速分离上、下颌骨,立即置于新配制的4%多聚甲醛内,4 ℃下固定24~48 h。10% EDTA脱钙3周。系列乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,矢状方向制作5 μm切片。

1.3 牙髓损伤修复过程中BMP_2的表达检测(免疫组织化学SABC法)

选择通过穿髓孔的切片,脱蜡至水,3% H_2O_2室温下10 min以消除内源性过氧化物酶,1 g/L胰蛋白酶消化,正常兔血清孵育30 min,滴加BMP单克隆抗体(1∶60),4 ℃湿盒过夜,37 ℃复温1 h,滴加生物素化二抗(1∶100),37 ℃孵育30 min,酶结合物(1∶100)37 ℃孵育30 min,DAB显微镜下控制显色。上述各步之后均用

作者简介:何 飞(1972—),女,黑龙江省兰西县人,博士研究生,医师,主要从事牙髓损伤修复方面的研究。电话:(023)68753282
收稿日期:2001-07-09;修回日期:2002-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.01 mol/L PBS 振洗 3 次, 每次 5 min。阴性对照用 PBS 代替一抗, 苏木素复染, 常规脱水, 二甲苯透明, 封固。

1.4　细胞增殖活性检测(MTT 比色法)

选择生长良好的第 5~8 代人牙髓细胞以浓度 3×10^7/L 接种 96 孔培养板, 每孔 100 μl, 培养液为 DMEM+10% FBS, 在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培育 3 d, 无血清培养液洗 3 遍, 实验组换 10% FBS 的 DMEM 培养液, 稀释不同浓度的 rhBMP$_2$(μg/L): 12.5、25、50、100 的生长因子加入孔内, 阴性对照只加入 10% FBS 的培养液, 每组 4 孔, 继续培养 72 h, 每孔加入 MTT 溶液 20 μl, 37 ℃继续孵育 4 h 后终止培养, 弃上清, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min, 分光光度计测各孔吸光度值(λ= 490 nm)。

1.5　碱性磷酸酶活性测定

选择生长良好的第 5~8 代人牙髓细胞以浓度 3×10^7/L 接种 96 孔培养板, 每孔 100 μl, 培养液同上, 在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中分别培育 4、11、18、25 d, 弃孔内液体, 无血清培养液洗 3 遍, 实验组换 10% FBS 的 DMEM 培养液, 稀释不同浓度的 rhBMP$_2$(μg/L): 25、50、100 的生长因子加入孔内, 阴性对照只加入 10% FBS 的培养液, 每组 4 孔, 各 100 μl, 继续培养 72 h 后弃除各孔培养液, 用 pH7.4 的 PBS 洗 3 遍, 吸干, 每孔加入 1 g/L 的 TritonX-100 50 μl, 置 4 ℃冰箱过夜, 然后加入 ALP 底物, 每孔 100 μl, 37 ℃ 孵箱内置 30 min, 以每孔加入 0.2 mol/L NaOH 50 μl 终止反应, 在酶联免疫检测仪上选择 410 nm 波长测各孔 A 值, 按试剂盒方法计算 ALP 活性(nmol/mg protein/min), 采用 t 检验进行统计学分析。

2　结果

2.1　牙髓损伤修复过程中 BMP_2 的免疫组化染色

正常牙髓组织中 BMP_2 免疫组化反应为阴性; 牙髓损伤后 12 h, 主要病理变化为牙髓组织内毛细血管扩张、充血; 成牙本质细胞层可见 BMP_2 弱阳性表达, 见图 1。

牙髓损伤后 24 h, 牙髓组织内血管扩张明显, 出现以中性粒细胞为主的渗出。BMP_2 表达仍位于成牙本质细胞层, 呈强阳性, 见图 2。

牙髓损伤后 72 h 组织学变化及 BMP_2 表达与 24 h 相比无明显变化。

牙髓损伤后 7 d, 牙髓的组织变化可分为三层: 穿髓点下方的牙髓坏死层、中间的细胞增殖层和深部的正常牙髓层。BMP_2 的表达转位于靠近穿髓孔的细胞增殖层, 见图 3。

牙髓损伤后 14 d, 细胞增殖活跃, 胶原成分增多, BMP_2 的表达主要位于纤维性修复组织下的牙髓细胞内, 见图 4。

牙髓损伤后 21 d, 细胞增殖层及纤维性成分中有修复性牙本质团块形成, BMP_2 表达与 14 d 相似。

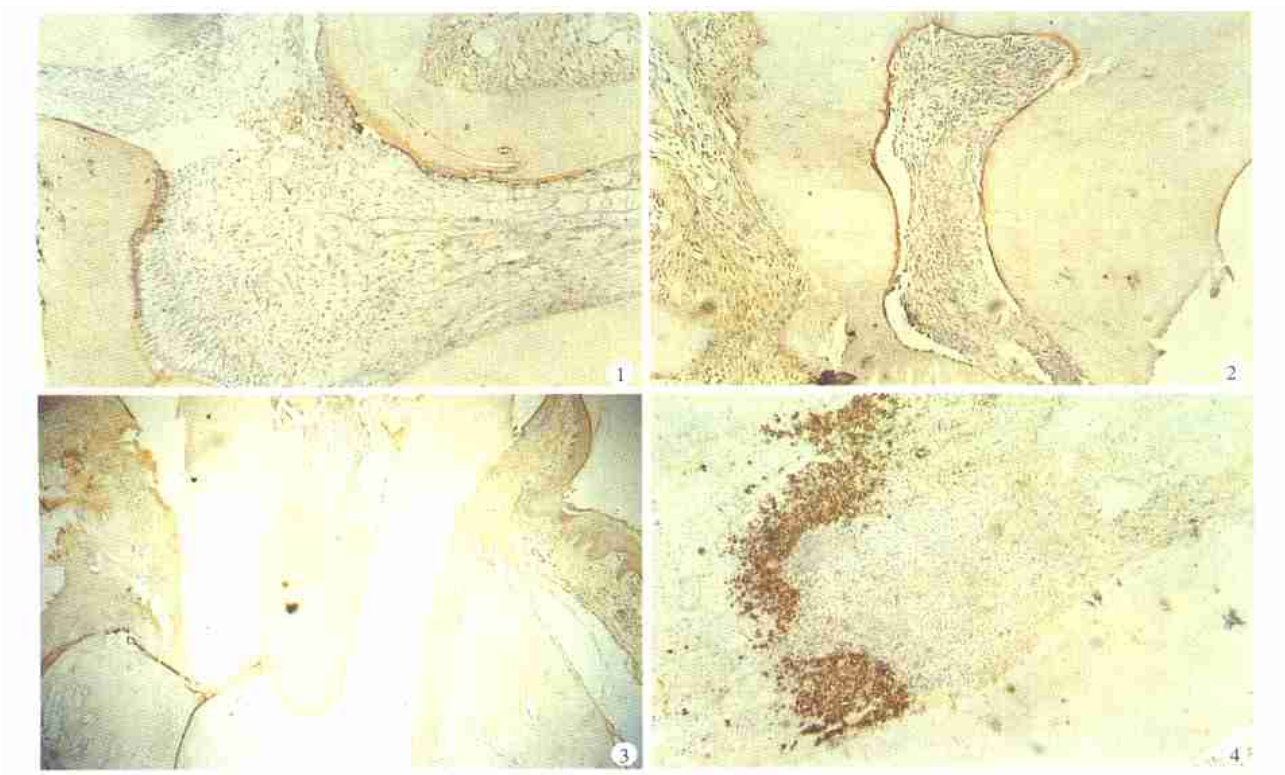


图 1　大鼠牙髓损伤后 **12 h**, 成牙本质细胞层 **BMP_2** 呈弱阳性表达　(SABC× 200)

Fig 1　Weak expression of BMP_2 in the odontoblasts 12 h after the injury　(SABC× 200)

图 2　牙髓损伤后 **24 h**, 成牙本质细胞层 **BMP_2** 呈强阳性表达　(SABC× 100)

Fig 2　Strong expression of BMP_2 in the odontoblasts 24 h after the injury　(SABC× 100)

图 3　牙髓损伤后 **7 d**, **BMP_2** 的表达转位于穿髓孔下方的细胞增殖层　(SABC× 100)

Fig 3　Expression of BMP_2 is found in the pulp cells inferior to the site of injury, 7 d after the injury　(SABC× 100)

图 4　牙髓损伤后 **14 d**, **BMP_2** 的表达位于纤维性修复组织下的牙髓细胞内　(SABC× 100)

Fig 4　BMP_2 expressed in pulp cells inferior to the fibrous repairing tissue, 14 d after the injury　(SABC× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 rhBMP$_2$ 对连续培养的人牙髓细胞的增殖、分化的影响

2.2.1 rhBMP$_2$ 对细胞增殖活性的影响，见表 1 从下表可以看出，与对照组相比，rhBMP$_2$ 在较低浓度(12.5 μg/L)时对细胞的增殖即有显著的促进作用($P<0.05$)，在一定范围内随浓度增加促进作用增强；但较高浓度(100 μg/L)时其促进作用反而下降。

表 1 不同浓度 rhBMP$_2$ 对细胞增殖活性的影响(A, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of rhBMP$_2$ at different doses on the proliferation of cultured human dental pulp cells(A, $\bar{x}\pm s$)

	rhBMP$_2$ (μg/L)				
	Control	12.5	25	50	100
A value	0.162±0.06	0.195±0.08 *	0.211±0.05 **	0.256±0.06 **	0.208±0.01 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control

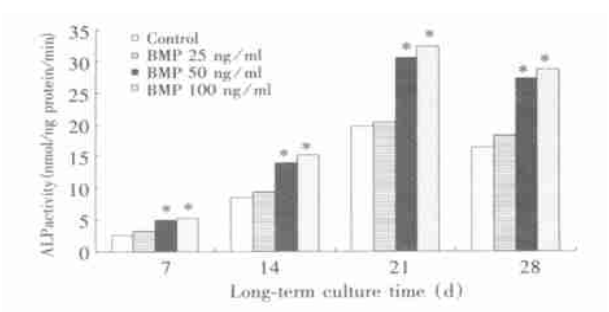
2.2.2 rhBMP$_2$ 对细胞 ALP 活性的影响，见表 2、图 5 牙髓细胞连续培养过程中，在无特殊外来因素的条件下，随培养时间的延长，ALP 活性增强，第 21 天达到峰值；加入不同浓度的 rhBMP$_2$ 后，细胞的 ALP 活性变化趋势未发生改变，但各阶段 ALP 活性均有所增加，且呈浓度依赖性。与对照组相比，50 和 100 μg/L rhBMP$_2$ 对牙髓细胞的 ALP 活性具有显著促进作用。结合上面 rhBMP$_2$ 对牙髓细胞增殖活性影响的研究结果，我们认为本实验所用的 rhBMP$_2$ 在浓度为 50 μg/L 时既有显著的促进细胞增殖作用，又可显著提高细胞的 ALP 活性。

表 2 不同浓度 rhBMP$_2$ 对连续培养不同阶段牙髓细胞 ALP 活性的影响(A, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of rhBMP$_2$ at different doses on the ALP activity of cultured human dental pulp cells(A, $\bar{x}\pm s$)

rhBMP$_2$ (μg/L)	Culture time (d)			
	7	14	21	28
Control	2.53±0.15	8.49±0.18	19.67±1.12	16.32±1.25
25	3.21±0.13	9.31±1.19	20.32±1.21	18.22±1.24
50	4.92±0.32 *	13.92±1.36 *	30.45±1.25 *	27.27±1.32 *
100	5.21±0.55 *	15.12±1.56 *	32.25±2.14 *	28.65±1.42 *

*: $P<0.05$ *vs* Control



*: $P<0.05$ *vs* Control

图 5 不同浓度 rhBMP$_2$ 对牙髓细胞 ALP 活性的影响

Fig 5 Effects of rhBMP$_2$ on the ALP activity of cultured human dental pulp cells

3 讨论

在牙髓损伤修复机制的研究中，具有骨诱导活性的生长因子——骨形成蛋白(BMP)的作用备受关注。骨形成蛋白是一种广泛分布于动物骨组织中的酸性蛋白质，最初被发现是由于其异位成骨作用，它可以在软骨及骨组织缺损中诱导未分化间充质细胞转化为软骨和骨母细胞，并进一步形成软骨及骨组织[4]，以后随着对 BMP 研究的不断深入，揭示了它在形态发生和细胞分化中发挥重要的作用[5]。研究表明，BMP 在牙齿形态发生的成牙本质细胞、造釉细胞分化中起重要作用，并和牙基质，特别是牙本质基质生成密切相关[6,7]。在牙胚发育中，BMP 主要表达于成釉上皮细胞、牙乳头细胞、牙囊细胞和牙胚周围的成骨细胞，推测 BMP 在牙胚发育过程中可能具有自分泌和旁分泌作用，即牙胚中上述细胞合成分泌的 BMP 不仅可以促进自身还可促进相邻细胞的分化。

本研究从体内体外两方面探讨了 BMP$_2$ 在牙髓损伤修复中的作用。体内实验结果表明：正常牙髓组织中 BMP$_2$ 的表达为阴性，而牙髓损伤后早期(12 h)即可检测到；损伤初期(12～72 h)其表达主要位于成牙本质细胞层，损伤后 1～3 周其表达则主要位于穿髓点下方的牙髓细胞及纤维性修复组织或修复性牙本质下方的牙髓细胞内。日本学者市川等将盖髓后牙本质桥的形成过程分为四个时期：①渗出期(术后 5 d)；②增殖期(术后 3～7 d)；③骨样牙本质形成期(术后 5～14 d)；④牙本质形成期(术后 14～28 d)；盖髓术后 3 d 即可见未分化细胞的增殖和间叶细胞的移行。结合本实验结果推测，在渗出期，BMP$_2$ 主要由成牙本质细胞分泌；到增殖期及牙本质形成期，牙髓细胞分化时，BMP$_2$ 则主要由穿髓孔下方的牙髓细胞分泌，也说明在成年牙髓组织损伤修复过程中，BMP$_2$ 与成牙本质细胞分化、修复性牙本质形成有关。另一方面，本研究体外结果显示，rhBMP$_2$ 不但可提高人牙髓细胞的增殖活性，还可使体外不同培养阶段牙髓细胞的 ALP 活性明显增加，而 ALP 又是牙髓细胞分化的标志酶，提示 rhBMP$_2$ 是通过促进牙髓细胞增殖和向成牙本质细胞分化而促进牙髓损伤修复的。

综上所述，本研究表明 BMP$_2$ 参与体内牙髓组织损伤修复过程，且在体外可通过调节细胞的增殖状态，促进牙髓细胞 ALP 合成等作用，诱导牙髓细胞向成牙本质细胞分化。但细胞的分化是一个复杂的过程，需要多种生长因子、细胞外基质以及细胞本身特性的综合作用[8]，BMP$_2$ 在这个复杂的调控网络中究竟起多大作用，它又是如何与其它因子协同作用诱导细胞分化的？还有许多值得我们继续探讨的问题。

参考文献：

[1] 高玉好. 骨形成蛋白(BMP)盖髓的临床病理学观察[J]. 华西口腔医学杂志，1992，(3)：155－157.

[2] 任卫红，杨连甲，董绍忠. rhBMP$_2$ 与纤维蛋白粘结剂复合物诱导修复性牙本质形成的动物实验[J]. 中华口腔医学杂志，2000，35(1)：

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

18—20.
[3] Hu C C, Zhang C, Qian Q, *et al*. Reparative dentin formation in rat moles after direct pulp capping with growth factors[J]. J Endod, 1998, 24(11): 744—751.
[4] Rickard D J, Sullivan T A, Shenker B J, *et al*. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultured by dexamethasone and BMP-2[J]. Dev Biol, 1994, 161(1): 218—228.
[5] Tucker A S, Matthews K L, Sharpe P T. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling[J]. Science, 1998, 282(5 391): 1 136—1 138.
[6] Takeda K, Oida S, Goseki M, *et al*. Expression of bone morphogenetic protein genes in the human dental pulp cells[J]. Bone, 1994, 15(5): 467—470.
[7] Toyono T, Nakashima M, Kuhara S, *et al*. Temporal changes in expression of transforming growth factor-beta superfamily members and their receptors during bovine preodontoblast differentiation *in vitro*[J]. Arch Oral Biol, 1997, 42(7): 481—488.
[8] Ruch J V, Lesot H, Bege-Kin C. Odontoblast differentiation[J]. Int J Dev Biol, 1995, 39(1): 51—68.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2002)10-1225-02

个案与短篇

胆管癌组织中 Gastrin/CCK 受体表达的研究

Studies on the expression of gastrin/CCK receptors in cholangiocarcinoma tissues

张丰深，马宽生，何振平，董家鸿 （第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院，重庆 400038）

胃泌素（Gastrin）和胆囊收缩素（Cholecystokinin, CCK）在进化上来源于单一祖先肽，在结构上具有等同的 C 端 5 肽酰胺活性片段，共同组成一激素家族（Gastrin/CCK 族）；而且两者的受体序列也具有同源性，其中胃泌素受体与 CCK-B 受体高度同源而统称为 Gastrin/CCK-B 受体。近 20 余年来，胃泌素和 CCK 作为单纯消化激素的概念发生了巨大变化。研究表明，通过 Gastrin/CCK-B 和（或）CCK-A 受体，Gastrin/CCK 对某些消化道肿瘤（包括胆管癌）的发生发展过程有确切的促进作用，已成为一类重要的肿瘤生长因子[1,2]。Gastrin/CCK 成为消化道肿瘤生长因子的细胞学机制除刺激细胞增殖外，其对细胞凋亡的影响正开始受到关注[3,4]。本研究对 40 例胆管癌组织标本中 Gastrin/CCK 受体的表达进行原位杂交检测，分析 Gastrin/CCK 受体表达的临床病理学意义及其与细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集我院 1995—1998 年肝外胆管癌手术切除标本 40 例，其中高分化癌 18 例（45.0%）、中分化癌 11 例（27.5%）、低分化癌 11 例（27.5%）。制备冰冻切片用于原位杂交，制备石蜡切片用于 TUNEL 染色和免疫组化。

1.2 原位杂交检测 Gastrin/CCK 受体表达

含有 Gastrin/CCK-B 受体 cDNA（2.0 kb）的质粒 FBRH 和含有 CCK-A 受体 cDNA（1.1 kb）的质粒 TA 分别由 Mitsuhiro Ito（Kobe University School of Medicine, JAPAN）和 Alan S. Kopin（New England Medical Center, The principal teaching hospital for Tufts University School of Medicine, AMERICAN）教授惠赠。探针制备与原位杂交按文献[5]的方法进行，设立 RNase 消化的空白对照、杂交液空白对照及先加未标记探针后加标记探针的封闭对照。

1.3 TUNEL 染色和免疫组化分别检测凋亡细胞及 bcl-2/bax 表达[4]

原位细胞凋亡检测试剂盒（*In situ* cell death detection kit, POD）购自 Boehringer Mannhiem，按试剂盒说明书进行 TUNEL 染色。光镜下观察切片显色反应、结合形态学变化确定凋亡细胞，随机选择 5 个以上癌区高倍视野，计数 500 个癌细胞中的凋亡细胞数，以百分数表示、即凋亡指数（Apoptotic index, AI）。bcl-2、bax 多抗及免疫组化试剂盒为 Santa Cruz 产品，抗原微波修复，抗体稀释度 1∶100，S-P 染色。光镜下观察切片显色反应，随机选择 5 个以上癌区高倍视野，计数 500 个癌细胞中的阳性细胞数，用百分率表示，阳性细胞数＜10%为阴性，≥10%为阳性。

1.4 统计学方法

组间 Gastrin/CCK 受体 mRNA 率和 bcl-2/bax 表达率的比较采用 χ^2 检验，组间 AI 比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 Gastrin/CCK 受体表达

胆管癌组织标本中，Gastrin/CCK-B、CCK-A 受体的阳性表达率分别为 82.5%（33/40）、45.0%（18/40），32.5%（13/40）的病例同时表达两种受体，Gastrin/CCK-B 受体表达率显著高于 CCK-A 受体表达率（$P<0.01$）。33 例 Gastrin/CCK-B 受体阳性的病例中，高/中分化腺癌占 78.8%（26/33），低分化癌占 21.2%（7/33），前者显著高于后者（$P<0.01$）；18 例 CCK-A 受体阳性病例中，高/中分化腺癌为 17 例（94.4%），低分化癌仅 1 例（5.6%），两者比较有显著差异（$P<0.01$）。

2.3 Gastrin/CCK 受体表达与 bcl-2 凋亡途径的关系

Gastrin/CCK-B 和 CCK-A 受体阳性标本的 AI 分别显著低于其阴性者（$P<0.01$），见表 1。Gastrin/CCK-B 受体阳性标本的 bcl-2 表达率显著高于其阴性者（$P<0.01$），CCK-A 受体阳性标本的 bcl-2 表达率高于其阴性者（$P>0.05$），Gastrin/CCK 受体表达与 bax 表达无明显关系，见表 2。

（下转 1228 页）

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39670711）
作者简介：张丰深（1968—），男，贵州省遵义市人，博士，主治医师，主要从事胆胰外科基础及肿瘤的研究，发表论文 10 篇，现在解放军第 324 医院普通外科工作，重庆 400020。电话：（023）68762059
收稿日期：2001-12-01；修回日期：2002-07-10

(C)1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net