

牙本质涎磷蛋白反义核酸对牙胚超微结构的影响

张 蓉 肖明振 赵守亮 徐平西 张春宝 汪 平

【摘要】 目的 探讨牙本质涎磷蛋白(DSPP)在牙胚发育和矿化中的作用及其机制。**方法** 胎龄为 17 d Balb/C 胎鼠上颌第一磨牙,分为 2 组,对照组牙胚置于无血清 BGJb 半固体培养基中培养;DSPP 反义核酸组牙胚置于含有 30 $\mu\text{mol/L}$ 、长 15 bp 的 DSPP 反义寡核苷酸的半固体培养基中培养。牙胚体外培养 10 d 后,进行透射电镜观察。**结果** 2 组牙胚牙尖处成牙本质细胞中均含有大量的细胞器,线粒体肿胀,粗面内质网扩张,且 DSPP 反义核酸组成牙本质细胞中粗面内质网扩张更为明显;胞外基质超微结构显示:对照组胶原纤维聚集成束,排列具有一定的方向,牙尖基质带平均厚度为 3 μm ;DSPP 反义核酸组胶原纤维粗细不等,排列紊乱,牙尖基质带平均厚度为 2.5 μm 。**结论** DSPP 可能通过控制成牙本质细胞正常的分泌功能、胶原纤维的正常形态和排列在牙胚生长、矿化中起重要作用。

【关键词】 牙本质涎磷蛋白; 反义核酸; 牙胚; 超微结构

Effects of Dentin Sialophosphoprotein Antisense Oligodeoxynucleotide on Ultrastructure of Mouse Tooth Germ

ZHANG Rong^{*}, XIAO Mingzhen, ZHAO Shouliang, et al. (^{*} Department of Conservative Dentistry, Stomatological Faculty, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To investigate more deeply the function and mechanism of DSPP during tooth development. **Methods** Explants of tooth germs from embryonic 17 th day mice were divided into two groups. In the control experiment, explants were cultured in agarose semi-solid medium under serum-free and chemically defined conditions, while explants in the other group were cultured with 30 $\mu\text{mol/L}$, 15 bp antisense oligodeoxynucleotide targeted to DSPP mRNA. After 10 ds, the explants were examined by transmission electron microscope. The width of dentin matrix at the tip of the cusps were then measured and statistically analyzed with Student *t*-test. **Results** Ultrastructure analyses showed that large cisternae of the rough endoplasmic reticulum (RER) existed in the odontoblasts at the tip of the cusps of antisense-treated explants and the average thickness of dentin matrix (2.5 μm) was thinner compared to the control ones (3 μm , $P < 0.001$). In addition, the collagen fibers in extracellular matrix were disorganized. **Conclusion** These findings indicated that DSPP played an important role in keeping tooth normal development, as well as in dentin mineralization by maintaining odontoblasts secreting ability and controlling fiber structure and orientation.

【Key words】 dentin sialophosphoprotein(DSPP); antisense oligodeoxynucleotide; tooth germ; ultrastructure

通过前期实验本课题组发现:牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)反义核酸可以减缓体外培养小鼠牙胚的生长并抑制牙本质的矿化。但是,它对牙胚生长、矿化的影响机制并不清楚。此外,以往的研究表明,牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)在前期牙本质向牙本质的转化过程中起重要作用¹,且它与 DSPP 来自于同一编码基因 dspp²。那么,在矿化中也起重要作用的 DSPP 是否也在矿化初始阶段即起作用呢?为了探讨这些问题,本实验在

已建立的小鼠牙胚发育无血清体外培养模型³,选择模型中开始出现矿化的时间 10 d 作为培养时间,在超微结构上对 DSPP 反义核酸处理的牙胚进行观察,为探讨 DSPP 的功能及作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

胎龄为 17 d Balb/C 胎鼠(第四军医大学实验动物中心提供),BGJb 培养液(Gibco 公司,美国),低熔点细胞培养用琼脂糖(FMC BioProducts 公司,美国),L-抗坏血酸(Sigma 公司,美国),维甲酸(Sigma 公司,美国),DSPP 反义寡核苷酸(大连宝生物工程有限公司),Karnovsky 固定液(第四军医大学电镜室提供),NOVA 型超薄切片机(LKB 公司,瑞典),JEM-100SX 型电子显微镜(日本电子公司)。

本课题为国家自然科学基金(编号 39800155)及全军“九五”重点课题(编号 98Z082)资助项目

作者单位:710032 第四军医大学口腔医院牙体病科(张 蓉,肖明振,赵守亮,张春宝,汪 平),第四军医大学神经生物教研室(徐平西)

1.2 DSPP 反义核酸的合成

根据 GeneBank 中登录的小鼠 DSPPmRNA 序列 (序列号 U67916) 及 Tabata 等⁴ 和 Diekwisch 等⁵ 文献报道,设计序列如下:DSPP 反义寡核苷酸 5'-GTTGCCCAAATGCAT-3',设计的探针经在 Advanced Blast 数据库查询证实具有良好的特异性。交由大连宝生物工程有限公司合成并进行硫代修饰。

1.3 牙胚培养

实验分为 2 组:DSPP 反义核酸组 (antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN) 和空白对照组。

空白对照组培养基为 BGJb 半固态培养基,含青霉素 10 万单位/升、链霉素 100 g/L、L-抗坏血酸 100 g/L、维甲酸 1×10^{-7} mol/L、琼脂糖 0.5%。实验组除在培养基中加入 30 μ mol/L、长 15 bp 的 DSPP 反义寡核苷酸外,其余同对照组。无菌条件下分离 Balb/C 胎鼠上颌第一磨牙后 96 孔板培养,每孔 4 枚牙胚,每组 3 孔。培养 10 d,每 2 天更换 1 次培养基。

1.4 标本制备及透射电镜观察

牙胚培养 10 d 后于 Karnovsky 固定液固定 2 h,1% 四氧化锇后固定 1 h。梯度乙醇脱水后入纯丙酮, Epon812 包埋。半薄切片,美兰染色定位后用超薄切片机制备超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅染色后透射电镜下观察成牙本质细胞和胞外间质的超微结构,并在电镜下测量牙尖处牙本质基质带厚度。两组的均数通过 Student *t* 检验进行统计学分析。

2 结 果

2.1 成牙本质细胞超微结构观察

对照组牙胚、牙尖及其周围成牙本质细胞呈高柱状单层排列,核远离基底膜。牙尖处成牙本质细胞内,可见大量的细胞器。粗面内质网丰富,位于胞体两侧,沿细胞长轴平行排列,并有不同程度的扩张;邻近细胞核上方可见大量肿胀的线粒体;在远离细胞体的突起中,还可见大量的髓样次级溶酶体 (图 1)。同对照组相比,AS-ODN 组牙胚、牙尖及其周围成牙本质细胞也呈高柱状,核远离基底膜。但是,在牙尖处成牙本质细胞内,成排的粗面内质网扩张极为明显,且多数已扩张为囊状或泡状,形成内质网池 (图 2)。大量的线粒体位于胞体和细胞突起之间。

2.2 胞外间质及牙本质基质超微结构观察

对照组牙胚、牙尖处成牙本质细胞间区有密度不等的基质,并有散在的基质小泡。位于细胞突周围的胶原纤维聚集成束,粗细大体一致 (图 3)。牙尖处牙本质基质带平均厚度为 3 μ m。与对照组相比,AS-ODN 组牙尖处成牙本质细胞间基质中也存在多个基质小泡,但其胞外基质中胶原纤维及原纤维粗细不等,排列极为紊乱 (图 4)。牙尖处牙本质基质带平均厚度为 2.5 μ m,明显小于对照组相应的厚度 ($P < 0.001$)。

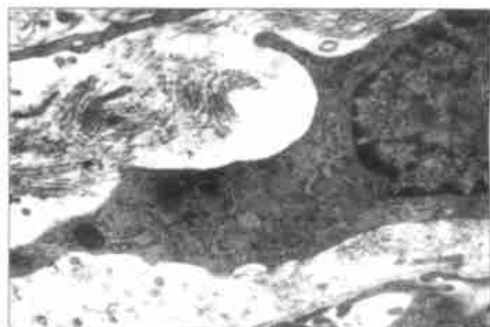


图 1 体外培养 10 d (对照组),成牙本质细胞顶端可见大量扩张的粗面内质网和线粒体 TEM $\times 15\ 000$

Fig 1 Cultured for 10 d (Control), large amount of enlarged RER and mitochondria occupied the above portion of the odontoblasts TEM $\times 15\ 000$

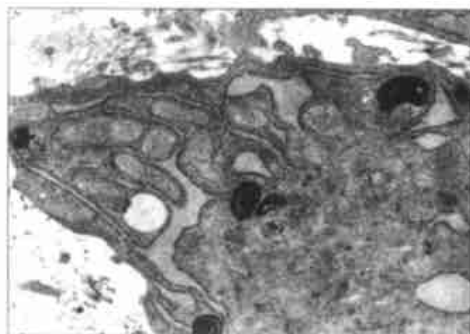


图 2 体外培养 10 d (AS-ODN 组),成牙本质细胞顶端多数粗面内质网扩张为池状 TEM $\times 15\ 000$

Fig 2 Cultured 10 d (AS-ODN), most enlarged RER above portion of the odontoblasts became cisternae TEM $\times 15\ 000$

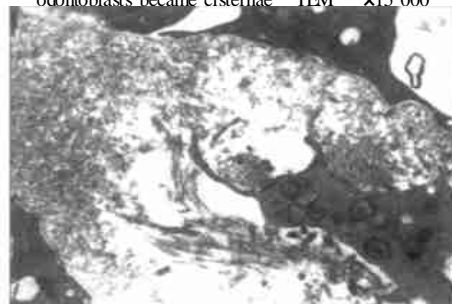


图 3 体外培养 10 d (对照组),成牙本质细胞胞外基质中胶原纤维聚集成束,粗细大体一致 TEM $\times 12\ 000$

Fig 3 Cultured for 10 d (Control), collagen fibers in extracellular matrix were gathered into bundles and identical in size TEM $\times 12\ 000$

3 讨 论

牙本质的形成是一受到高度调节和控制的过程,这一过程包括一系列不同机制,如细胞分化和相互作用,有机基质的分泌及矿化晶体的形成⁶。细胞与基质之间的相互作用是成牙本质细胞和成釉细胞终末分化的重要条件⁷,而细胞分泌基质成分的过程体现了它们的功能活性。以往研究表明,牙本质生成活跃

期的成牙本质细胞呈高柱状,细胞单层或假复层排列。胞浆内含大量扩张的粗面内质网和内质网池及丰富的线粒体⁸。本实验表明,2 组牙尖处成牙本质细胞均处于分泌期,且 AS-ODN 组成牙本质细胞的蛋白质合成及代谢功能更强。

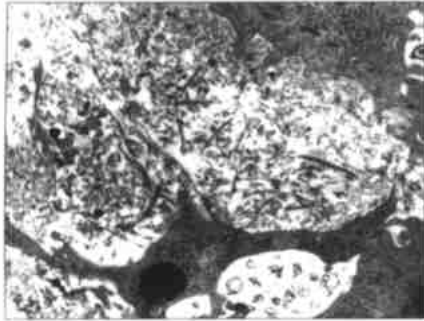


图 4 体外培养 10 d(AS-ODN 组),成牙本质细胞胞外基质中胶原纤维粗细不等,排列紊乱 TEM ×12 000

Fig 4 Cultured for 10 d(AS-ODN), collagen fibers were not identical in size and disorganized in orientation TEM ×12 000

牙本质的形成经历了两个连续的过程:胶原网在前期牙本质的形成,以及之后矿化晶体的沉积。作为矿化模板的胶原网在牙本质正常矿化中起着重要作用。已有研究表明,牙本质中的胶原成分主要是Ⅰ型胶原,Ⅰ型、Ⅱ型及Ⅲ型三聚体。其中,Ⅰ型胶原是构成牙本质基质的主要成分(约占基质 86%)⁷,它由成牙本质细胞合成并分泌,并且与成牙本质细胞的表达和细胞的分化程度相关,可反映成牙本质细胞的分泌活性。胶原蛋白通过其与细胞膜受体的相互作用而影响骨架蛋白,并与纤维粘连蛋白、蛋白多糖和氨基多糖等形成一种复合物而协同作用⁷。有研究显示,它在编码区的突变可导致遗传性骨生成缺陷等疾病⁹。而笔者在本实验中发现:经 DSPP AS-ODN 处理的牙胚,胶原纤维粗细不等,排列异常紊乱,说明 DSPP 可以在一定程度上控制胶原的形态和排列。笔者推测:可能正是因为胶原纤维的异常形态和排布导致了此阶段矿化的缺失。

以往的电镜结果提示,初始晶体的形成并非发生在胞外基质,而是发生在一种叫基质小泡的膜结构内。这一结构只存在于矿化早期而在髓周牙本质的形成中不再出现。基质小泡在牙本质矿化中的功能并不十分清楚。有学者提出它可能为晶体的形成提供保护性的微环境,并作为载体聚集大分子、酶和其他重要的分子。本实验中,笔者在细胞间质及胶原纤维间也见到了散在的基质小泡,说明所观察对象正处在矿化的初始阶段。

牙本质的组成从体积上来说矿化物和有机成分

分别占 50 %和 30 %,但是这些组份在组织中并不是平均分布的。同种质不同的是,不同部位牙本质的组成可以出现相当大的差异,而完全形成的釉质是高度晶体化的结构,只含有极少的有机成分⁶。因此,对牙本质矿化的研究,难以象 Diekwisch 等⁵那样,通过抑制体外培养牙胚釉原蛋白(amelogenin)的翻译,并通过观察初始矿化阶段羟基磷灰石晶体的结构和空间走向来明确釉原蛋白在釉质矿化中的具体作用。但是,结合细胞的超微结构、细胞间质中胶原纤维的排布及分泌的基质带的厚度提示:DSPP 反义核酸可能通过影响成牙本质细胞正常的分泌功能、胶原纤维的正常形态和排列而影响牙胚的生长及矿化。经反义核酸处理的成牙本质细胞显示出较对照组相同部位细胞更强的蛋白质合成和代谢功能,可能是成牙本质细胞反馈调节的结果;也可能是对照组成牙本质细胞已处于分泌后期,而 DSPP 反义核酸影响了成牙本质细胞的分化从而使细胞的分化状态较对照组滞后而造成。

参考文献

- 1 Nawrot CF, Campbell DJ, Schroeder JK, et al. Dental phosphoprotein-induced formation of hydroxyapatite during *in vitro* synthesis of amorphous calcium phosphate. *Biochemistry*, 1976, 15 (16) : 3445-3449
- 2 MacDougall M, Simmons T, Luan X, et al. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem*, 1997, 272(1) : 835-842
- 3 张蓉,肖明振,赵守亮,等.小鼠牙胚发育无血清体外培养模型的建立.牙体牙髓牙周病学杂志,2002,12(6):294-296
- 4 Tabata M, Kim K, Liu JG, et al. Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars. *Development*, 1996, 122 (4) : 1243-1251
- 5 Diekwisch T, David S, Bringas PR, et al. Antisense inhibition of AMEL translation demonstrates supramolecular controls for HAP crystal growth during embryonic mouse molar development. *Development*, 1993, 117(2) : 471-482
- 6 Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993, 4(5) : 679-728
- 7 Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res*, 1995, 33(1-3) : 59-65
- 8 Gouve E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*, 1986, 31(10) : 643-651
- 9 Chessler SD, Wallis GA, Byers PH. Mutations in the carboxyl-terminal propeptide of the pro-1(I) chain of type I collagen result in defective chain association and produce lethal osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem*, 1993, 268(24) : 18218-18225

(2001-08-31 收稿,2002-12-23 修回)

(本文编辑 王 晴)