

[文章编号] 1000-1182(2008)05-0563-04

尼莫地平对人牙本质形成的影响

朱晓茹¹, 张 蓉¹, 李玉成¹, 唐荣银¹, 赵守亮²

(1.第四军医大学口腔医院 牙体牙髓病科, 陕西 西安 710032; 2.同济大学口腔医院 口腔内科, 上海 200072)

[摘要] 目的 采用人牙齿切片体外器官培养的方法研究尼莫地平对牙本质形成的影响。方法 收集年轻人健康前磨牙,用慢速切锯制备2 mm厚的牙齿横切片,将在尼莫地平溶液中浸泡过的琼脂糖微球与在PBS液中浸泡过的琼脂糖微球对称放置在牙片上,将切片用含琼脂糖的半固体培养基包被后采用器官培养方法培养1周,观察其对牙本质形成的影响。结果 尼莫地平处理后四环素线状荧光带较对照组变细、变淡,Von-Kossa染色前期牙本质处球状矿化也较对照组减少,透射电镜显示实验组成牙本质细胞内的分泌小泡与对照组相比略有增多,但是 型胶原免疫组化染色显示实验组和对照组无明显区别。结论 尼莫地平能够影响牙本质的矿化形成,但对牙本质基质的合成和分泌无明显影响。

[关键词] 器官培养; 尼莫地平; 矿化; 牙本质形成

[中图分类号] R781.1 **[文献标识码]** A

Effects of nimodipine on human dentinogenesis ZHU Xiao-ru¹, ZHANG Rong¹, LI Yu-cheng¹, TANG Rong-yin¹, ZHAO Shou-liang². (1. Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Dept. of Conservative Dentistry, College of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[Abstract] **Objective** Studies have showed that L type calcium channel plays an important role in dentin calcification and affects tooth development and tooth reparation after injury. The objective of this article is to study the effects of nimodipine, blocking agent of L type calcium channel, on human dentinogenesis using human tooth slice organ culture *in vitro*. **Methods** Young healthy human premolars were collected, and cut into 2 mm-thick transverse slices by low speed diamond saw. Agarose beads dipped in nimodipine solution and PBS were symmetrically placed on tooth slices, and the slices were then embedded in a semisolid agarose-based medium and cultured with organ culture method for 1 week. Fluorescent band of tetracycline, Von-Kossa staining, immunohistochemical staining of the slices and transmission electron microscopy(TEM) of odontoblasts were observed to evaluate dentinogenesis changes of the slices. **Results** Tooth slices were successfully cultured *in vitro* for 1 week and the odontoblasts could maintain their original morphology. After treatment with nimodipine, the fluorescent band of tetracycline was narrow and weak, and globular calcification in predentine was decreased compared with the control. TEM showed that secretory vesicles in odontoblast were somewhat increased, but immunohistochemical staining for collagen showed no difference between the two groups. **Conclusion** Nimodipine can influence the calcification of dentine, but has no obvious influence on the synthesis and secretion of dentine matrix. The results show that L type calcium channel is important in dentin calcification.

[Key words] organ culture; nimodipine; calcification; dentinogenesis

牙本质的矿化是一个受高度调控的复杂过程,包括成牙本质细胞将牙髓组织中钙离子转运至牙本质矿化前沿和钙离子在牙本质基质上的沉积。许多分子参与了这一过程,目前已知有钙离子通道、钠钙离子交换泵和钙结合蛋白等,其中L型钙离子通

道起着主要作用^[1]。牙本质形成过程中,基质形成与矿化是有序进行并相互影响的,成牙本质细胞分泌的大分子多肽类物质如牙本质磷蛋白、蛋白多糖等对矿化过程中羟磷灰石的形成也有重要作用^[2-3]。牙齿切片器官培养的方法保持了培养过程中细胞与基质、细胞与牙齿硬组织的三维关系,使得培养状态与体内情况更具有相似性。本实验旨在采用已建立的牙齿切片器官培养的方法研究L型钙离子通道

[收稿日期] 2008-03-12; [修回日期] 2008-05-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471889)

[作者简介] 朱晓茹(1982-),女,河北人,硕士

[通讯作者] 赵守亮, Tel: 021-66136713

阻断剂尼莫地平对人牙本质矿化形成的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM细胞培养基(Gibco BRL公司, 美国), 胎牛血清(杭州四季青公司), 低熔点琼脂糖和L-抗坏血酸(Sigma公司, 美国), 琼脂糖微球(由英国卡迪夫大学Sloan馈赠), 尼莫地平(天津金耀氨基酸有限公司), 四环素(Sigma公司, 美国), 牛血清白蛋白(Gibco公司, 美国), 兔抗人型胶原抗体(武汉博士德有限公司), 免疫组化染色试剂盒(北京中杉有限公司), JEM-2000EX型透射电镜(Jeol公司, 日本), Buehler慢速切锯(Emerson公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 标本选择 收集第四军医大学口腔医院因正畸原因拔除的年轻健康前磨牙或第三磨牙(患者年龄在12~25岁之间)作为实验用牙, 所有实验用牙均经过患者知情同意。

1.2.2 培养基成分 常规DMEM培养基中加入体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素、0.15 mg/mL L-抗坏血酸。

1.2.3 包被尼莫地平的琼脂糖微球的制备 琼脂糖微球每50个为1组放入EP管中, 加入PBS溶液。EP管在转速为400 r/min的离心机上离心3 min, 吸去PBS液, 再在EP管中加入含体积分数为0.1%牛血清白蛋白的PBS液, 400 r/min离心3 min后吸去PBS液, 在实验组EP管中加入质量浓度为0.05 mg/mL的尼莫地平溶液0.5 mL, 对照组EP管中加入0.5 mL PBS液。实验组和对照组微球均在4℃保存。

1.2.4 牙齿切片制备 新鲜拔除的前磨牙或第三磨牙8颗, 拔除后立即浸泡入DMEM培养液中。牙齿用无菌PBS液反复冲洗后, 用慢速切锯制备2 mm厚的牙齿横切片, 共制备16片。切好的牙齿切片在无菌PBS液中反复漂洗后浸泡入DMEM培养液中。

1.2.5 含琼脂糖微球的牙齿切片的培养 参考Sloan等^[4]培养方法, 将切好的牙片放入培养皿中, 用小吸管吸取实验组微球2粒放在牙片的成牙本质细胞和牙本质交界处, 再吸取对照组微球2粒放在同一牙片与实验组对称位置的成牙本质细胞和牙本质交界处。然后将牙片用37℃含1%低熔点琼脂糖的DMEM培养基包被, 待培养基凝固成半固体状态后, 将包被半固体培养基的牙齿切片转移到位于自制的不锈钢支架上的醋酸纤维滤膜(孔径为0.45 μm)上。将支架放入直径为40 mm的培养皿中培养。牙片培养第1天采用含质量浓度为10 mg/L四环素的DMEM培养基进行培养, 第2天后改用常规DMEM培养基进

行培养, 每隔1 d换液1次, 培养7 d后结束。

1.3 结果检测

1.3.1 对牙本质矿化的影响(硬组织切片观察) 取培养7 d的牙齿切片6片在80%乙醇溶液中固定48 h后, 依次脱水, 树脂包埋, 制作硬组织切片, 观察四环素荧光的情况, Von-Kossa染色观察钙质沉积情况。将四环素荧光图像输入Image-Pro图像分析系统对荧光面积及荧光强度进行定量分析。

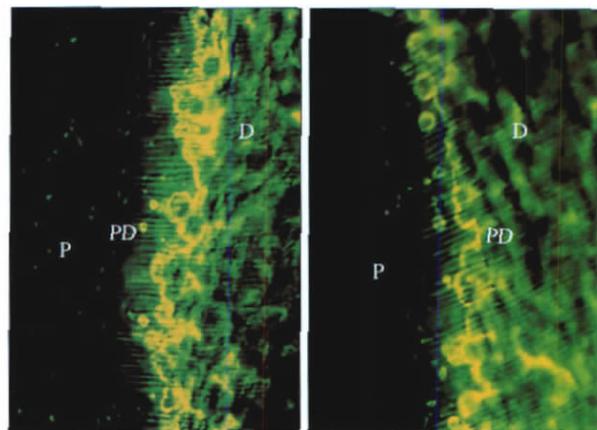
1.3.2 对牙本质基质分泌的影响 透射电镜观察: 取培养7 d的牙齿切片4片在戊二醛固定液中固定48 h后, 在10%EDTA溶液中脱矿, 然后在钨酸(二甲砷酸盐缓冲液配制, pH为7.4)中固定, 乙醇脱水, 树脂包埋, 用玻璃刀制备超薄切片(厚50 nm), 醋酸铀和枸橼酸铅染色, 在透射电镜下观察成牙本质细胞内超微结构的变化。

型胶原免疫组化染色: 取培养7 d的牙齿切片6片在4%多聚甲醛中固定24 h, 甲酸钠混合脱矿液脱矿, 脱水, 石蜡包埋, 制备5 μm厚的组织切片。参照试剂盒说明书, 采用SP法染色型胶原观察其表达的变化情况。阴性对照由PBS替代一抗。

2 结果

2.1 四环素荧光检测结果

四环素荧光呈强的金黄色条带位于前期牙本质与牙本质交界处, 在强的荧光条带下方的前期牙本质处亦可见到一些圆形的荧光小圈。实验组四环素荧光条带较对照组窄细, 且荧光较弱(图1)。对同等长度的荧光条带的总的荧光面积及平均荧光强度进行定量分析, 结果如表1所示, 采用配对t检验进行统计分析, 实验组与对照组相比, 荧光面积减小, 荧光强度减弱, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



D: 牙本质; PD: 前期牙本质; P: 牙髓; 左: 对照组; 右: 实验组

图1 四环素荧光条带位于前期牙本质与牙本质交界处 荧光显微镜 ×64

Fig 1 Tetracycline fluorescent band in the interface of pre-dentin and dentin fluorescence microscope ×64

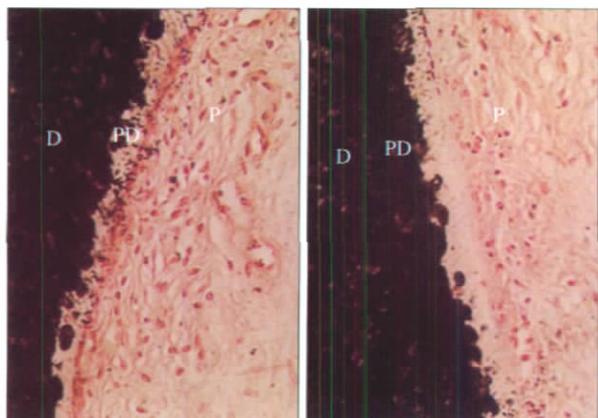
表 1 实验组与对照组四环素荧光面积和荧光强度对比($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of tetracycline fluorescent area and intensity in control group and experimental group($n=6, \bar{x} \pm s$)

测量指标	实验组	对照组	P值
荧光面积	33 237±4 763	60 866±13 695	0.002
荧光强度	184±26	201±29	0.014

2.2 Von-Kossa染色结果

牙本质钙质沉积矿化区均呈棕黑色, 细胞核呈红色。对照组前期牙本质有许多球形钙化点, 实验组球形钙化点与对照组相比明显减少(图2)。



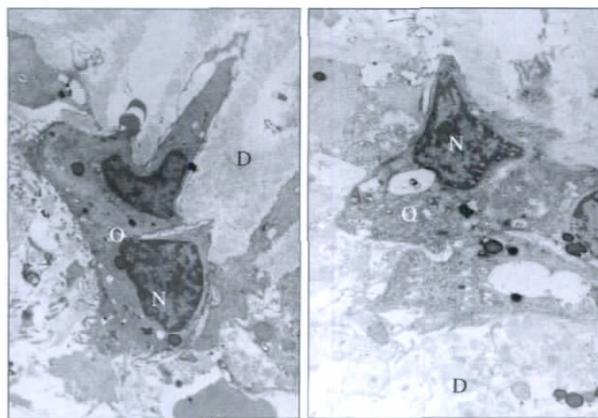
D: 牙本质; PD: 前期牙本质; P: 牙髓; 左: 对照组; 右: 实验组

图 2 实验组前期牙本质处的球形钙化较对照组少 Von-Kossa 染色 $\times 40$

Fig 2 Globular calcification in pre-dentin in experimental group was less compared with that in control group Von-Kossa staining $\times 40$

2.3 透射电镜观察结果

实验组和对照组成牙本质细胞呈扁平状, 胞浆内细胞器少, 粗面内质网不发达。实验组成牙本质细胞胞浆内的分泌小泡较对照组略有增多(图3)。



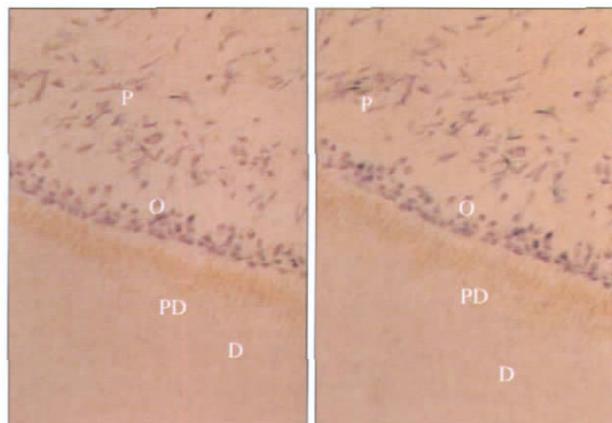
D: 牙本质; O: 成牙本质细胞; N: 细胞核; 左: 对照组; 右: 实验组

图 3 成牙本质细胞的超微结构 SEM 对照组 $\times 4 000$; 实验组 $\times 5 000$

Fig 3 Ultrastructure of odontoblast SEM control group $\times 4 000$; experimental group $\times 5 000$

2.4 型胶原免疫组化染色结果

牙本质及成牙本质细胞内 I 型胶原呈阴性, 前期牙本质及牙髓中央部分 I 型胶原表达呈阳性。实验组和对照组 I 型胶原表达未见明显区别(图4)。



D: 牙本质; PD: 前期牙本质; P: 牙髓; O: 成牙本质细胞; 左: 对照组; 右: 实验组

图 4 牙髓牙本质复合体 I 型胶原的表达 SP $\times 40$

Fig 4 Expression of collagen I in dentin-pulp complex SP $\times 40$

3 讨论

研究^[5]表明, 大鼠的成牙本质细胞上有大量的L型钙离子通道, 并且不同发育时期的成牙本质细胞膜上L型钙离子通道的分布和数量不同。以尼莫地平或二羟吡啶特异性阻断L型钙离子通道后, 成牙本质细胞膜结合钙离子的水平明显降低^[6], 说明成牙本质细胞膜上L型钙离子通道的构型变化可以明显影响牙本质的矿化过程。本课题组的前期研究^[7]显示, 发育小鼠磨牙牙胚成牙本质细胞主要表达L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基D亚型, 并且具有时空特异性, 以反义核酸阻断L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基可对小鼠磨牙牙胚发育及牙本质矿化产生明显影响。吕海鹏等^[8-9]成功从人成牙本质细胞系中克隆出L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基D亚型的特异性基因, 并建立了原核表达、纯化体系, 制备了纯化的人成牙本质细胞L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基D亚型特异性蛋白。

用慢速切锯制备牙齿切片的技术是目前国际上应用比较多的牙齿切片制备技术, 该技术对切片组织损伤小, 成牙本质细胞能够维持柱状形态, 未与前期牙本质层分离^[10]。

在静止期的髓周牙本质内, 矿化形态主要是线形矿化和球形矿化, 在前期牙本质中可见钙化小球^[11]。本实验中在四环素荧光条带下方的前期牙本质处的圆形荧光小圈, 可能是前期牙本质中以钙化小球形式钙化时沉积的钙质。实验组四环素荧光条带较对照组窄细, 且荧光较弱, 说明经尼莫地平阻

断后牙本质矿化区矿化减弱,前期牙本质处钙的分泌和沉积受到影响。

Von-Kossa染色法不直接显示钙质,但它能与磷酸根和碳酸根离子形成银盐,在还原剂的作用下将金属银还原而将钙质沉淀呈现棕黑色。本实验中实验组前期牙本质中球形钙化点明显较对照组中少,说明经尼莫地平阻断后牙本质的球形矿化亦受到影响。

成牙本质细胞有2种功能状态,即分泌型成牙本质细胞和静止型成牙本质细胞。已萌出的牙齿成牙本质细胞大多为静止型成牙本质细胞,该型细胞呈扁平状,胞浆少,粗面内质网也较少,无高尔基器,缺少细胞器和分泌颗粒,但有大的含脂类的泡、微管及微丝。本实验中将年轻人恒牙进行体外器官培养后透射电镜观察成牙本质细胞的形态与静止型成牙本质细胞的形态一致,说明成牙本质细胞的合成功能并不发达。实验组成牙本质细胞胞浆内的分泌小泡较对照组略有增多,考虑其可能原因之一是钙离子通道阻断后成牙本质细胞的分泌功能受到影响,另外可能是钙离子通道阻断后成牙本质细胞的合成功能增强。牙本质的基质形成和矿化作用是有序进行并相互影响的,有研究^[12]表明,成牙本质细胞分泌的非胶原大分子多肽类物质如牙本质磷蛋白、涎蛋白、蛋白多糖等当固定在固体载体上时可诱导矿化,而在溶液中时则抑制矿化晶体的形成。当基质的矿化受到影响时也有可能引起基质合成与分泌的变化,但还未见有这方面的报道。

成牙本质细胞合成和分泌的蛋白质主要是Ⅰ型胶原,成熟牙本质的有机基质主要为Ⅰ型胶原。由于前期牙本质是没有钙化的牙本质,胶原直接暴露于基质中,免疫反应一般不会受到矿化物的太大影响,而成熟牙本质为完全钙化的结构,样品尽管进行了脱钙处理,但绝非完全脱尽,因此免疫反应将会受到矿化物的一定影响^[13]。本实验Ⅰ型胶原免疫组化的染色结果为牙本质及成牙本质细胞阴性,前期牙本质及牙髓中央部分阳性,这与其他学者^[13]的研究结果比较一致,且实验组和对照组Ⅰ型胶原表达未见明显差别。成牙本质细胞内Ⅰ型胶原阴性表达表明,成牙本质细胞的合成功能较弱,这也与透射电镜观察的结果一致。

[参考文献]

[1] Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport[J]. Connect Tissue Res, 1995, 33(1/3):163-170.
[2] Linde A, Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role

of the odontoblast in calcium transport and mineral formation[J]. Int J Dev Biol, 1995, 39(1):213-222.
[3] 张蓉,肖明振,赵守亮,等.牙本质涎磷蛋白反义核酸对牙胚超微结构的影响[J].华西口腔医学杂志,2003,21(4):281-283.
ZHANG Rong, XIAO Ming-zhen, ZHAO Shou-liang, et al. Effect of dentin sialophosphoprotein antisense oligodeoxynucleotide on ultrastructure of mouse tooth germ[J]. West China J Stomatol, 2003, 21(4):281-283.
[4] Sloan AJ, Shelton RM, Hamm AC, et al. An *in vitro* approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine-pulp complex from rat incisor teeth[J]. Arch Oral Biol, 1998, 43(6):421-430.
[5] Senx D, Joffre A, Fosset M, et al. Immunohistochemical localization of L-type calcium channels in the developing first molar of the rat during odontoblast differentiation[J]. Arch Oral Biol, 1994, 39(2):167-170.
[6] Lundgren T, Linde A. Calcium ion transport kinetics during dentinogenesis: Effects of disrupting odontoblast cellular transport systems[J]. Bone Miner, 1992, 19(1):31-44.
[7] 李玉成,赵守亮,张蓉,等.L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基D亚型在发育小鼠磨牙牙胚成牙本质细胞中的表达[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2002,12(4):175-177.
LI Yu-cheng, ZHAO Shou-liang, ZHANG Rong, et al. Immunohistochemical localization of the $\alpha 1$ D subunit of L-type calcium channel in the developing first molar of mouse during odontoblast differentiation[J]. Chin J Conserv Dent, 2002, 12(4):175-177.
[8] 吕海鹏,史俊南,赵守亮,等.人成牙本质细胞L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基D亚型特异性基因的克隆[J].实用口腔医学杂志,2006,22(3):347-349.
LÜ Hai-peng, SHI Jun-nan, ZHAO Shou-liang, et al. Cloning of L type calcium channel $\alpha 1$ D subunit specific gene of human odontoblasts[J]. J Pract Stomatol, 2006, 22(3):347-349.
[9] 吕海鹏,史俊南,赵守亮,等.人成牙本质细胞L型钙离子通道 $\alpha 1$ 亚基D亚型特异性基因的克隆、原核表达和纯化[J].临床口腔医学杂志,2006,22(6):333-335.
LÜ Hai-peng, SHI Jun-nan, ZHAO Shou-liang, et al. Cloning, expression and purification of L type calcium channel $\alpha 1$ D subunit specific gene of human odontoblast[J]. J Clin Stomatol, 2006, 22(6):333-335.
[10] 朱晓茹,赵守亮,唐荣银,等.人牙齿切片器官培养模型的建立[J].现代口腔医学杂志,2007,21(6):600-602.
ZHU Xiao-ru, ZHAO Shou-liang, TANG Rong-yin, et al. Establishment of human tooth slice organ culture model *in vitro*[J]. J Modern Stomatol, 2007, 21(6):600-602.
[11] Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1993, 4(5):679-728.
[12] Lussi A, Linde A. Mineral induction *in vivo* by dentine proteins[J]. Caries Res, 1993, 27(4):241-248.
[13] Takita K, Ohsaki Y, Nakata M, et al. Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption[J]. Arch Oral Biol, 1987, 32(4):273-279.