

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0316-04

跨膜蛋白Syndecan-1在不同发育时期 小鼠磨牙组织中的表达

高洁¹, Lesot H²

(1.中国医科大学口腔医院 儿童牙科, 辽宁 沈阳 110002;

2.Faculte de Chirurgie Dentaire, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France)

[摘要] 目的 以小鼠磨牙为发育模型, 研究其不同发育时期跨膜蛋白Syndecan-1的表达特点, 进而分析Syndecan-1在牙齿发育中的作用。方法 取不同胎龄的胎鼠, 制作其下颌第一磨牙的切片, 进行免疫荧光染色, 并在荧光显微镜下观察Syndecan-1的表达情况。结果 Syndecan-1的表达随牙胚发育的时期不同而变化: 蕾状期时在牙源性上皮和间充质中有弱的阳性分布, 帽状期时成釉器上皮阳性表达减弱, 而牙乳头及周围的间充质的阳性反应明显增强, 钟状期时成釉器上皮又呈阳性表达, 并以在中间细胞层的反应更为强烈, 而牙乳头间充质的染色则很弱, 同时前成釉细胞以及下方的成牙本质细胞的顶端也呈Syndecan-1的阳性表达。结论 Syndecan-1参与了成釉器和牙乳头的发育和分化过程的调节, 并与牙胚细胞的增殖以及成釉细胞和成牙本质细胞的分化相关。

[关键词] 跨膜蛋白Syndecan-1; 牙胚; 牙发育

[中图分类号] R780.1 [文献标识码] A

Study of the expression pattern of Syndecan-1 in different developing molar stage of mouse GAO Jie¹, Lesot H². (1. Dept. of Pediatric Dentistry, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Faculte de Chirurgie Dentaire, Universite Louis Pasteur, Strasbourg, France)

[Abstract] Objective Developing mouse molar was used as a model for the study of Syndecan-1, a transmembrane heparan sulfate proteoglycans, in order to approach the possible mechanism and function of this macromolecule during tooth development. Methods Mouse embryos were removed at different days of gestation. The frozen sections of the first lower molar were made from the embryonic mouse heads and then indirect immunofluorescence was performed on these sections. The altered distribution pattern of Syndecan-1 in embryonic mouse first lower molars at different stages of development from the bud to the late bell stage was observed under a conventional fluorescence microscope. Results There was a ubiquitous staining in the dental tissues at bud stage: Both the epithelium and mesenchyme were weakly positive for Syndecan-1. From the bud to the cap stage, there was a strong decrease of the staining for Syndecan-1 in the epithelial compartment, while an intense staining in dental mesenchyme was observed at cap stage. At bell stage, Syndecan-1 was again detected in dental epithelium including the stratum intermedium and the outer enamel epithelium, and it was found having some intense signal in the stratum intermedium. However, the staining for Syndecan-1 in dental mesenchyme of this stage became weaker and finally disappeared. Furthermore, a positive expression for Syndecan-1 was also found at the top of pre-ameloblasts as well as odontoblasts. Conclusion These changes in the patterning of Syndecan-1 during tooth development might be related with cell proliferation during morphogenesis and later be involved in the differentiation of ameloblast and odontoblast.

[Key words] transmembrane protein Syndecan-1; tooth germ; tooth development

Syndecans是一组跨膜蛋白分子, 属于蛋白多糖HSPG(heparan sulfate proteoglycan)家族, 能够结合HS(heparan sulfate)和CS(chondroitin sulfate)链^[1],

在细胞活动中具有多重作用, 是一类重要的HSPG分子。Syndecan-1是Syndecans的4个成员中最早被发现的。研究^[2]表明, Syndecan-1与组织器官的生长发育以及损伤的修复密切相关。

与机体其他器官的发育一样, 牙齿的发育经历了由组织发生、细胞分化到组织形成的复杂变化过程, 是口腔上皮组织与下方的间充质不断相互作用

[收稿日期] 2007-06-08; [修回日期] 2007-10-17

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(20052086)

[作者简介] 高洁(1966-), 女, 辽宁人, 副教授, 博士

[通讯作者] 高洁, Tel: 024-22891925

用、相互诱导的结果^[3-4]。众多的信号分子都参与了
这个发育过程的调节^[5]。小鼠磨牙的发育过程，作
为哺乳类动物牙齿发育的模型，已经被广泛用于牙
胚发育及信号调节方面的研究。

Thesleff等^[6]1988年曾经报道细胞表面糖蛋白在
牙胚组织中的分布与上皮-间充质之间的相互作用
紧密相关，提示这些生物大分子参与了牙齿发生
过程的调节。Bai等^[7]和Vainio等^[8]分别对牙齿发育早期
Syndecan-1和Syndecan-2的分布进行了研究，结果
也表明，Syndecans跨膜蛋白分子参与了牙齿的早期
发育过程。本研究运用免疫荧光显微技术对不同
发育阶段的小鼠磨牙进行研究，观察其中Syndecan-1
的分布和表达的变化，探讨其在牙齿发育过程中的
作用。

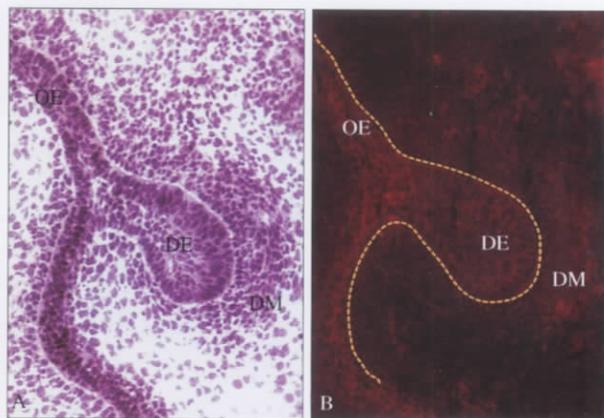
1 材料和方法

选取妊娠13、14、15、17、19 d的小鼠母鼠(所
用动物均来自于中国医科大学实验动物部)，处死
母鼠，取其胎鼠的头部冻存备用。沿冠状位制作胎
鼠下颌第一磨牙的冰冻切片(7 μm)，并在室温下
自然干燥，准备染色。染色过程如下：切片先置入
丙酮中于4℃下固定10 min，PBS洗净，每个时间
的标本预留一张切片做苏木精-伊红染色，以观察牙
胚的发育情况，其余切片于1%BSA中室温下封闭1 h
以阻断非特异性结合位点，再次PBS洗后，在兔抗
Syndecan-1多克隆抗体(Santa Cruz公司，美国)
(1:150)中4℃下孵育过夜，次日停止孵育，以PBS
洗后加第二抗体(Santa Cruz公司，美国)(1:500)，
于室温下孵育2 h，再经PBS洗净(15 min×3次)后，
DAPI复染，PBS充分洗净后封片，在荧光显微镜下
观察Syndecan-1的分布和表达。以省略第一抗体、
用PBS代替进行染色作为阴性对照。

2 结果

在鼠胚发育的第13天(图1)，随着口腔上皮来

源的牙蕾的形成和周围间充质密集的出现，下颌第
一磨牙牙胚开始发育并进入到蕾状期，上皮性牙蕾
将发育成为成釉器，下方和周围密集的间充质将发
育成牙乳头和牙囊(图1A)。在这个时期的Synde-
can-1免疫染色标本中见到，无论是牙蕾还是其周围
的密集的间充质都呈Syndecan-1的弱阳性表达，而
且两者之间阳性反应的强度没有明显的差异，与周
围组织的差异也不甚明显(图1B)。

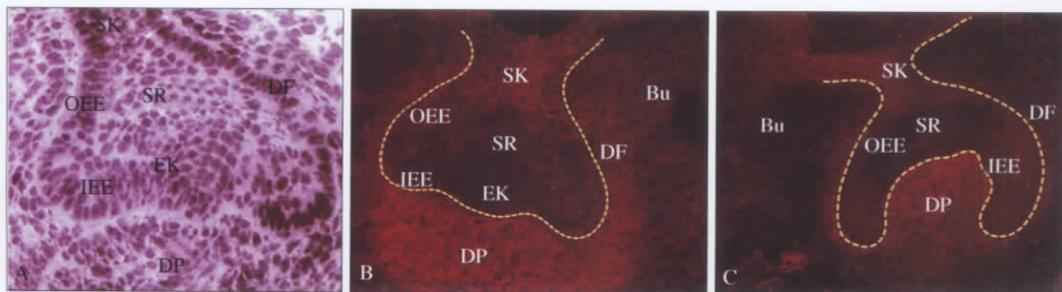


DE: 牙源性上皮; DM: 间充质; OE: 口腔上皮; A: HE × 200; B: 荧光显微镜 × 200

图1 处于蕾状期(鼠胚发育的第13天)的小鼠下颌第一磨牙的
Syndecan-1表达

Fig 1 Syndecan-1 expression of mouse first lower molar at the
bud stage (embryo 13 d)

在鼠胚第14天(图2)，牙胚发育进入帽状期，
此时成釉器中有外釉上皮、内釉上皮和星网状层形
成，并有釉结出现(图2A)。在这些组织中Syn-
decan-1的表达明显较弱，而位于下方的牙乳头间充
质以及外周的牙囊则呈现较强的阳性表达(图2B)。
到帽状晚期，成釉器中的Syndecan-1的阳性表达进
一步减弱，牙乳头中的反应则进一步增强，牙囊的
染色强度无明显变化(图2C)。然而，在口腔上皮与
牙源性上皮相连接的蒂部仍然有Syndecan-1的表达，
不过这里的阳性分布不均匀，表现为偏颊侧的特
性(图2B、2C)。



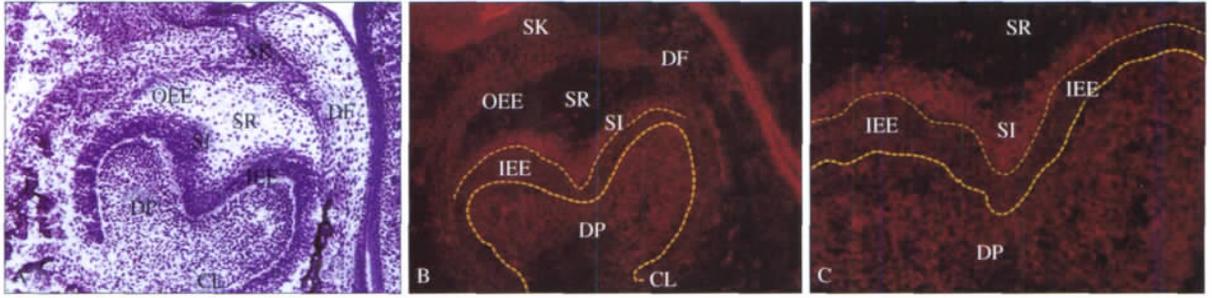
Bu: 颊侧; DF: 牙囊; DP: 牙乳头; EK: 釉结; IEE: 内釉上皮; OEE: 外釉上皮; SK: 蒂部; SR: 星网状层; A: HE(第14天) × 200;
B: 荧光显微镜(第14天) × 200; C: 荧光显微镜(第15天) × 100

图2 处于帽状期(鼠胚发育的第14和15天)的小鼠下颌第一磨牙的Syndecan-1表达

Fig 2 Syndecan-1 expression of mouse first lower molar at the cap stage(embryo 14 d and 15 d)

在鼠胚第17天(图3),成釉器呈钟状,中间细胞层出现,并有颈环形成,牙胚进入钟状期(图3A)。此期的标本中, Syndecan-1在牙乳头中的阳性反应有所减弱,而在成釉器的阳性表达又略增强

(图3B),但在不同的细胞层次中的表达各不一致,以中间细胞层最为明显,外釉上皮和蒂部也呈阳性,星网状层反应较弱,而内釉上皮层则几乎为阴性(图3C)。



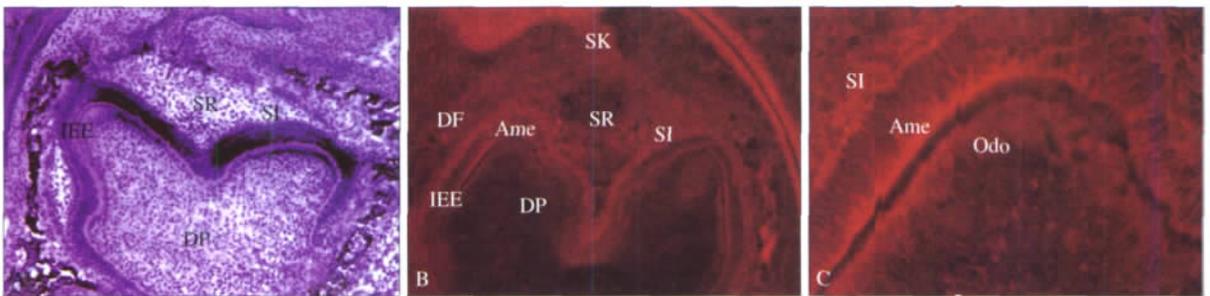
CL: 颈环; DF: 牙囊; DP: 牙乳头; IEE: 内釉上皮; OEE: 外釉上皮; SI: 中间细胞层; SK: 蒂部; SR: 星网状层; A: HE ×100; B: 荧光显微镜 ×100; C: 荧光显微镜 ×400

图3 处于钟状期(鼠胚发育的第17天)的小鼠下颌第一磨牙的Syndecan-1表达

Fig 3 Syndecan-1 expression of mouse first lower molar at the bell stage(embryo 17 d)

到鼠胚第19天(图4),即牙胚的钟状晚期,随着成釉器和牙乳头进一步发育,内釉上皮逐渐发育为前成釉细胞,与其相邻的牙乳头间充质细胞经过一系列的变化逐渐发育为成牙本质细胞(图4A);此时Syndecan-1在牙乳头中的反应逐渐转为阴性,成

釉器中的中间细胞层继续呈强阳性表达,前成釉细胞以及下方的成牙本质细胞的顶端出现Syndecan-1的阳性表达(图4B、4C)。在高放大倍率镜下可见Syndecan-1的阳性反应颗粒分布于细胞膜表面。



Ame: 前成釉细胞; DF: 牙囊; DP: 牙乳头; IEE: 内釉上皮; Odo: 成牙本质细胞; SI: 中间细胞层; SK: 蒂部; SR: 星网状层; A: HE ×100; B: 荧光显微镜 ×100; C: 荧光显微镜 ×200

图4 处于钟状晚期(鼠胚发育的第19天)的小鼠下颌第一磨牙的Syndecan-1表达

Fig 4 Syndecan-1 expression of mouse first lower molar at the late bell stage(embryo 19 d)

3 讨论

哺乳动物的牙齿是在牙源性上皮和下方的间充质相互诱导下发育而成的,许多信号分子都参与了这一发育过程的调节机制^[9]。在这些信号分子当中, Syndecans作为一类跨膜的蛋白多糖分子,能够提供CS和HS^[1],并具有协同受体(co-receptor)的作用^[9-10]。曾经有研究^[7-8]提示, Syndecans分子参与了牙齿的早期发育过程。Syndecan-1是Syndecans分子的4个成员之一。本实验运用免疫荧光染色方法对不同发育阶段的小鼠下颌第一磨牙进行了观察研究,结果显示,在牙胚发育的不同时期, Syndecan-1有不同形式的阳性表达:蕾状期时不论是牙源性的上皮还是其周围密集的间充质中都有Syndecan-1的弱阳性分布,并且在这些部位的反应强度没有明显的差别;进入帽状期后, Syndecan-1的阳性反应部位逐渐集

中到了间充质来源的牙乳头中,而成釉器上皮中Syndecan-1的阳性表达明显减弱甚至消失;到了钟状期, Syndecan-1的分布由牙乳头逐渐转移到了成釉器上皮中,并且染色的强度也因细胞层次的不同而有不同。根据Syndecan-1这种随发育阶段的不同而不断变化的分布方式,笔者认为Syndecan-1参与了成釉器和牙乳头的发育和分化过程的调节。

以往的大量研究已经证明,来自于4大家族的多种调节因子都在成釉器的釉结部位有阳性表达^[9],并因而把釉结认作为牙齿发育的调控中心。在本研究结果中,没有见到Syndecan-1在釉结处的特殊表达。笔者分析认为, Syndecan-1虽然参与了牙齿发育过程的调节,但它并不在调节中心起作用,而是在某个或者某些调节通路中发挥作用。

根据文献报道,在牙胚发育的钟状期,在成釉器的中间细胞层中,成纤维细胞生长因子-4、Wnt

蛋白10 b、骨形态发生蛋白-2^[11]、骨形态发生蛋白受体- A和- AB^[12]等都有明显表达。同时,也在同一时期的中间细胞层中观察到Syndecan- 1的强阳性分布;不仅如此,在处于分化中的前成釉细胞和成牙本质细胞的顶端,也有Syndecan- 1的阳性表达。有文献报道, Syndecan- 1表达的下调能够导致上皮细胞极化的丢失,而Syndecan- 1的过度表达又能抑制成纤维细胞生长因子- 2诱导的细胞增殖^[13]。Syndecans可能通过与生长因子的结合,作为细胞增殖和分化的基本调节因素起作用,从而调节发育过程^[1,14]。推测Syndecan- 1可能与其他信号分子合作,共同调节牙胚细胞的增殖和牙体形成细胞的分化,进而影响牙齿的发育与形成。

此外,在牙胚成釉器与口腔上皮相联系的部位(笔者称其为蒂部)也发现有Syndecan- 1的阳性分布,并且在帽状期时呈现偏于颊侧的特点。Syndecan- 1的这种不对称分布是否与牙齿形态的不对称性有关?这个被称作蒂部的部位在牙胚发育过程中的地位如何?有关这些问题尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Bernfield M, Gotte M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans[J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68(1):729-777.
[2] Zimmermann P, David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling[J]. *FASEB J*, 1999, 13(Suppl):S91-S100.
[3] Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1997, 8(1):4-39.
[4] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental dev-

elopment[J]. *Mech Dev*, 1997, 67(2):111-123.
[5] Thesleff I, Keranen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation[J]. *Adv Dent Res*, 2001, 15(1):14-18.
[6] Thesleff I, Jalkanen M, Vainio S, et al. Cell surface proteoglycan expression correlates with epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 1988, 129(2):565-572.
[7] Bai XM, Van der Schueren B, Cassiman JJ, et al. Differential expression of multiple cell-surface heparan sulfate proteoglycans during embryonic tooth development[J]. *J Histochem Cytochem*, 1994, 42(8):1043-1054.
[8] Vainio S, Jalkanen M, Vaahtokari A, et al. Expression of syndecan gene is induced early, is transient, and correlates with changes in mesenchymal cell proliferation during tooth organogenesis[J]. *Dev Biol*, 1991, 147(2):322-333.
[9] Elenius K, Jalkanen M. Function of the syndecans—a family of cell surface proteoglycans[J]. *J Cell Sci*, 1994, 107(Pt 11):2975-2982.
[10] Schlessinger J, Lax I, Lemmon M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors[J]. *Cell*, 1995, 83(3):357-360.
[11] Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Haikel Y, et al. Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(1):103-112.
[12] Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, et al. Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 324(1):33-40.
[13] Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: New kids on the signaling block[J]. *Circ Res*, 2005, 96(5):488-500.
[14] Rapraeger AC. Molecular interactions of syndecans during development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2001, 12(2):107-116.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第315页)

华西口腔医学杂志, 2005, 23(1):86-87.
LIU Feng, MA Min, ZHANG Zuo, et al. The relationship of P16, the expression of PCNA and the types of pathology, clinical staging and distant metastasis on salivary adenoid cystic carcinoma cells[J]. *West China J Stomatol*, 2005, 23(1):86-87.
[4] Kim KH, Chung PS, Rhee CS, et al. The manifestation of proliferating cell nuclear antigen in adenoid cystic carcinoma[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1994, 120(11):1221-1225.
[5] 赵文, 蒋东生, 边庆荣, 等. 蔷薇红景天对小鼠免疫功能的影响及抑瘤作用[J]. *营养学报*, 2000, 22(1):90-91.
ZHAO Wen, JIANG Dong-sheng, BIAN Qing-rong, et al. Effects of rhodiola rosea on immune function and its antitumor action in mice[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2000, 22(1):90-91.
[6] 马杰, 宗志红, 王兆元, 等. Genistein对涎腺腺样囊性癌细胞生长及Survivin表达的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(1):97-99.
MA Jie, ZONG Zhi-hong, WANG Zhao-yuan, et al. Effects of Genistein on the proliferation and expression of Survivin in salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83[J]. *West China J Stomatol*, 2007, 25(1):97-99.

[7] Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold [J]. *Cell*, 1994, 78(4):539-542.
[8] 计春燕, 谭诗云, 刘长青, 等. 丹皮酚对人大肠癌细胞凋亡和细胞周期以及患者预后的影响[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(6):1222-1241.
JI Chun-yan, TAN Shi-yun, LIU Chang-qing, et al. Effect of paeonol on apoptosis and cell cycle of human colorectal cancer cells as well as prognosis of patients[J]. *Chinese J Clinical Rehabilitation*, 2005, 9(6):1222-1241.
[9] Mignotte B, Vayssie JL. Mitochondria and apoptosis[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 252(1):1-15.
[10] Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c [J]. *Cell*, 1996, 86(1):147-157.
[11] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. *Science*, 1995, 267(5203):1449-1456.
[12] Sato I, Sunohara M, Mikami A, et al. Immunocytochemical study of the maxilla and maxillary sinus during human fetal development[J]. *Okajimas Folia Anat Jpn*, 1998, 75(4):205-216.

(本文编辑 汤亚玲)