

小鼠成牙关键调控基因的筛选与功能验证实验研究*

张凡柯^{1,2}, 杜雅晶^{1,2}, 周陈晨^{1,2}, 张家玮^{1,2,3}, 邹淑娟^{1,3}, 李小兵^{1,2,Δ}

1. 四川大学华西口腔医院 口腔疾病研究国家重点实验室(成都 610041); 2. 四川大学华西口腔医院 儿童口腔科(成都 610041);
3. 四川大学华西口腔医院 正畸科(成都 610041)

【摘要】目的 筛选小鼠成牙关键基因,并验证关键基因对羊膜上皮细胞(WISH)成牙诱导分化的能力。**方法** 通过免疫组化染色、实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测骨形成蛋白4(BMP4)、成纤维细胞生长因子8(FGF8)、音猬因子(SHH)、淋巴增强因子(LEF1)4种分子蛋白和基因在小鼠早期牙胚发育过程[小鼠胚胎发育第10.5天(E10.5)、E11.5、E14.5]中的时空差异化表达,筛选可能的成牙关键基因;非牙源性上皮WISH成骨诱导培养3周,采用茜素红(ALZ)染色与RT-qPCR检测碱性磷酸酶(ALP)观察骨向分化能力;通过胚层重组实验进行组织重组,将BMP4蛋白加入重组组织块,并移植于小鼠肾被膜下,观察验证关键基因的蛋白能否诱导非牙源性上皮成牙分化。**结果** 免疫组化染色和RT-qPCR结果证实E10.5胎鼠BMP4蛋白和基因在第一、第二腮弓上皮存在差异性表达,且从E10.5~E14.5其表达与成牙能力从上皮向间充质的转移一致;FGF8蛋白和基因虽在第一、第二腮弓上皮存在差异性表达,但其表达与成牙能力的转移不一致;LEF1、SHH蛋白和基因在第一、二腮弓上皮不存在差异表达,且与成牙能力的转移不一致,因此,筛选出BMP4基因为可能的成牙关键基因。WISH成骨诱导3周,ALZ染色阳性,并形成钙结节,RT-qPCR检测ALP mRNA表达升高;胚层重组实验结果显示,加入外源性的BMP4蛋白可使第二腮弓间充质分别与第二腮弓上皮及WISH均有牙齿样结构形成。**结论** BMP4、FGF8、SHH、LEF1的蛋白和基因在小鼠牙胚早期发育过程中呈时空特异性表达;BMP4的蛋白和基因在第一、二腮弓上皮差异表达,且其蛋白可使与第二腮弓间充质重组的非牙源性上皮获得成牙能力。BMP4为可能的成牙关键基因。

【关键词】 牙发育 胚层重组 腮弓 BMP4

Screen and Function Study of the Key Regulative Odontogenic Genes in Mice ZHANG Fan-ke^{1,2}, DU Ya-jing^{1,2}, ZHOU Chen-chen^{1,2}, ZHANG Jia-wei^{1,2,3}, ZOU Shu-juan^{1,3}, LI Xiao-bing^{1,2,Δ}. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Pediatric Dentistry, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Orthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: lxb_30@qq.com

【Abstract】Objective To screen the key odontogenic genes in mice and verify the odontogenic inducing effect on amniotic epithelial cells (WISH). **Methods** The spatially and temporally different expression of bone morphogenetic proteins 4 (BMP4), fibroblast growth factor 8 (FGF8), sonic hedgehog (SHH), lymphoid enhancer factor 1 (LEF1) proteins and their genes expression in the early odontogenesis stage (embryo day 10.5 (E10.5), E11.5, E14.5) in fetal mice were detected by immunohistochemistry staining and quantitative real-time PCR (RT-qPCR). According to the results, we screened the probable key odontogenic genes. Then adding osteogenic inducing solution to induce non-odontogenic epithelium cells, WISH. After 3 weeks culture of non-odontogenic epithelial WISH for osteogenic induction, the epithelial-mesenchymal transformation capability was evaluated by using Alizarin (ALZ) red staining and RT-qPCR on the alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression level. Using germ layer recombination experiment to observe and verify whether the screened genes can induce non-odontogenic epithelium cells acquire odontogenesis ability. The recombined tissue grafts containing key genes were transplanted beneath the renal capsule of mice. **Results** The results of immunohistochemistry staining and RT-qPCR showed that on E10.5 BMP4 protein and gene were differently expressed in the first and second branchial arch epithelium, which synchronized the odontogenic capability transferring from epithelium to mesenchyme from E10.5-E14.5. Though the expression of FGF8 protein and gene existed such difference in the first and second branchial arch epithelium, there was no synchronization in transfer. The expression of LEF1 and SHH proteins and genes had neither difference nor synchronization. So far, we considered the BMP4 was the probable key odontogenic gene. Through 3 weeks' osteogenic induction, ALZ red stained positively and calcium nodules were observed in WISH, and the expression level of ALP mRNA increased. In the germ layer recombination experiment, exogenous

* 国家自然科学基金青年基金项目(No. 81901040)资助

Δ 通信作者, E-mail: lxb_30@qq.com

BMP4 protein enabled the second branchial arch mesenchyme forming tooth-like structures after recombined with the second branchial arch epithelium or WISH. **Conclusions** The proteins and genes of BMP4, FGF8, SHH and LEF1 are spatially and temporally differently expressed in the early tooth development stage in mice. The protein and gene of BMP4 are differently expressed between the first and second branchial arch epithelium and enables the non-odontogenic epithelium acquiring odontogenic ability. *BMP4* is the possible key odontogenic gene.

【Key words】 Tooth development Recombination Branchial arch *BMP4*

牙发育是口腔生物学中颅颌面发育、牙列发育的重要内容,与儿童错殆畸形的发生有密切关系,研究牙发育的分子机制对儿童错殆畸形早期防治技术的研发具有重要的科学及临床意义。牙齿作为外胚层附属器官,由上皮和间充质相互作用发育而来。牙发育各个阶段受细胞间信号传递形成的复杂网络所调控^[1-4]。在小鼠胚胎发育第10.5天(E10.5),第一腮弓尚未出现牙发育的形态学变化,但此时第一腮弓已经具有成牙能力,而且牙齿形成的部位和类型已经确定^[5-6]。牙胚最早的形态学表现为牙板的出现,在E11.5上、下颌弓的未来牙齿萌出部的上皮增厚形成牙板。E12.5~13.5增厚的上皮继续增生,形成卵圆形花蕾状的上皮芽,间充质围绕牙蕾增殖聚集(蕾状期)。E14.5上皮基底部内陷形成帽子样结构(帽状期),E16.5牙胚进入钟状期^[7]。口腔上皮和间充质的相互作用在早期牙胚形成中有重要的意义。研究^[8-10]显示,E12以前胎鼠的口腔上皮与第一腮弓间充质、第二腮弓间充质、形成躯干的神经嵴细胞、鸡的外胚间充质重组均可成牙,但牙源性间充质细胞与非牙源性上皮重组则不能成牙。小鼠E12后的牙源性间充质与非牙源性上皮重组也均可形成牙齿。以上实验结果表明:牙胚发生的起始信号位于口腔上皮,随着牙胚发育,上皮和间充质相互作用,上皮中的成牙信号传递至间充质中。牙发育过程中的上皮、间充质相互作用涉及各种信号组成的网络系统,包括信号分子及其受体分子、各种转录因子等。骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、音猬因子(sonic hedgehog, SHH)、淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor, LEF)四大家族在牙齿发育的信号调控中起重要作用^[11]。牙胚早期发育上皮的增厚过程就涉及许多信号分子,其中起重要作用的有BMP4、FGF8、SHH、LEF1等因子^[11-15],这些表达于上皮的信号分子又作用于间充质,使间充质细胞聚集促使牙发育的完成^[16]。

尽管已知上述基因在早期牙胚发育过程中起重要作用,但是所有已知的调控牙齿发育的信号同样在其他发育的器官中表达,暂未发现可标志牙源性组织的特异性信号基因,且没有任何一种信号基因的突变会导致牙板的消失^[17],因此牙板的形成机制仍未有定论,早期口腔上

皮以及后来聚集的牙源性间充质如何获得成牙能力仍需查证。非牙源性羊膜上皮细胞(WISH)起源于外胚层,有多向分化能力,经过诱导可分化为三个胚层不同类型的细胞,如心肌样细胞、神经样细胞^[18-19],也有文献报道经成骨诱导后上皮-间充质转化^[20],但国内外文献少见经诱导后牙向分化的报道。因此,本研究以胎鼠第一、二腮弓成牙潜能为切入点,通过分析胎鼠不同胚龄期BMP4、FGF8、SHH和LEF1四种发育信号的基因和蛋白的时空差异化表达,初步筛选牙胚发育过程中可能的成牙关键基因,并运用胚层重组实验验证成牙关键基因蛋白能否诱导WISH获得成牙能力。

1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞

8~10周龄性成熟C57雄鼠40只,雌鼠30只,由四川大学实验动物中心提供。本实验研究获得了四川大学华西口腔医学院伦理委员会批准(编号:WCCSIRB-D-2014-040)。WISH细胞购于上海生命科学院细胞库。

1.2 主要试剂和仪器

抗BMP4(兔抗小鼠)、抗SHH(兔抗小鼠)购自美国Millipore公司;抗FGF8(兔抗小鼠)、抗LEF1(兔抗小鼠)、抗CK14(兔抗小鼠)、抗波形蛋白(vimentin,兔抗小鼠)、FITC标记山羊抗兔IgG购自英国Abcam公司;免疫组化检测试剂盒购自上海基因科技公司;RNAiso Plus Total RNA提取试剂、DEPC处理水、PrimeScript[®] RT reagent Kit反转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Perfect Real Time购自日本TaKaRa公司;胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液(100×)、 α -MEM培养基、胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司;Dispase酶购自英国Gibco公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI),成骨诱导液(100 nmol/L地塞米松、50 mg/L抗坏血酸、5 mmol/L β -甘油磷酸)购自美国Sigma公司;凝胶珠购自美国Bio Rad公司;BMP4重组蛋白购自英国R&D systems公司;伊红-苏木素染色液(hematoxylin-eosin, HE)购自碧云天生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)粉剂购自武汉博士德生物工程公司;光谱扫描多功能酶标仪购自美国Thermo公司。7300 Real Time PCR仪购自美国ABI公司。

1.3 牙胚发育早期关键基因的筛选

通过检测胎鼠不同胚龄期BMP4、FGF8、SHH、LEF1蛋白和基因的时空差异化表达,筛选出小鼠早期牙胚发育过程中的关键基因。

1.3.1 胎鼠不同胚龄期的取材 取8~10周龄性成熟C57小鼠40只按雌雄比3:1合笼交配,每天早晨检查,以见到阴道栓后的正午定为胚胎发育E0.5。本研究根据文献^[5-7]选择牙胚发育早期E10.5、E11.5、E14.5胎鼠用于实验研究。断颈处死E10.5、E11.5、E14.5孕鼠,超净台体视显微镜下小心取出胚胎观察,取部分胚胎PBS冲洗干净,立即放入体积分数为4%多聚甲醛,4℃固定过夜。固定后流水冲洗2 h;胚胎组织常规乙醇梯度脱水及透明,浸蜡及包埋,5 μm连续切片(E10.5、E11.5沿矢状方向切片, E14.5沿冠状方向切片),60℃烘箱烤片过夜备用。部分胚胎立即液氮保存。

1.3.2 免疫组化染色检测胎鼠BMP4、FGF8、SHH、LEF1蛋白的时空表达 切片脱蜡脱水,3% H_2O_2 避光静置处理30 min, PBS清洗5 min×3次;采用热修复法,2%枸盐酸溶液放入微波中加热至沸腾后放入切片,低火修复30 min;甩干,滴加山羊血清封闭,37℃避光孵育1 h;吸去山羊血清,不漂洗,直接滴加一抗:抗BMP4(兔抗小鼠, 1:200)、抗FGF8(兔抗小鼠, 1:200)、抗LEF1(兔抗小鼠, 1:200)、抗SHH(兔抗小鼠, 1:200),湿盒中4℃冰箱过夜, PBS漂洗5 min×3次;滴加二抗,37℃孵育30 min, PBS清洗5 min×3次。以PBS代替一抗作为阴性对照。显色后中性树胶封片。阳性表达呈棕黄色。

1.3.3 实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 检测胎鼠E10.5第一、二腮弓上皮和间充质组织BMP4、FGF8、SHH、LEF1基因的表达 胎鼠E10.5第一、二腮弓上皮及间充质的分离:将E10.5胚胎放入100 mm含有α-MEM的培养皿中,培养皿置于冰上,于体视显微镜下,完整分离出第一腮弓和第二腮弓;分别将第一、二腮弓放入2 U/mL的Dispase酶中37℃消化10~15 min后放入α-MEM终止消化,用显微镊小心分离上皮和间充质。

采用TRIzol法提取分离的胎鼠E10.5第一、二腮弓上皮和间充质总RNA(按试剂盒说明操作)。获得的总RNA经紫外分光光度计检测吸光度 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.2之间的RNA,为合格RNA。然后采用ABI 7900 Real-time PCR仪进行基因片段扩增。按照PrimeScript® RT reagent Kit说明书进行反转录,将反转录后的cDNA置于-20℃保存。按照SYBR® Premix Ex Taq™ Perfect Real Time操作说明进行实时定量PCR,本实验中所涉及的引物序列均由TaKaRa公司设计合成,具体引物序列见表1。采用20 μL

反应体系,冰浴条件下在PCR管内加入预混溶液:SYBR®Premix Ex Taq™ II (2×) 10 μL; 10 μmol/L PCR前引物0.8 μL; 10 μmol/L PCR后引物0.8 μL; Rox Reference Dye II (50×), 0.4 μL; DNA模板2.0 μL;加入ddH₂O至总体积为20 μL。将混有上述反应液的溶液震荡混匀,瞬时离心。然后采用ABI PRISM® 7300 Real Time PCR仪进行基因片段扩增。反应条件:各基因反应条件均一样,95℃预变性30 s;然后95℃ 5 s, 60℃ 31 s,共40次循环;95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s退火延伸一步完成。反应结束后作溶解曲线。以β-actin为内参照,以目的基因Ct值减去内参照Ct值为ΔCt,最终以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算目的基因表达量。

表 1 待测引物序列
Table 1 Primer sequence to be used

Gene		Primer sequence (5'-3')	Length/bp
BMP4	F	TCTTCAACCTCAGCAGCATC	103
	R	AAGCCCTGTTCCCGAGTCAG	
LEF1	F	GTCCCTTTCTCCACCCATC	108
	R	AAGTGCTCGTCGCTGTAGGT	
FGF8	F	TTGGAAGCAGAGTCCGAGTT	108
	R	ATACGCAGTCCTTGCCCTTG	
SHH	F	ACCCCTTTAGCCTACAAGCAGTT	101
	R	TAAATCGTTCGGAGTTTCTTGTA	
β-actin	F	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	155
	R	GGCATAGAGGTCTTTACGGATG	
ALP	F	TAAGGACATCGCTACCAGCTC	116
	R	TCTTCCAGGTGTCAACGAGGT	
GAPDH	F	CTTTGGTATCGTGAAGGATC	155
	R	GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT	

1.4 WISH细胞的成骨诱导及鉴定

1.4.1 WISH细胞培养 WISH细胞常规复苏培养,显微镜下观察细胞收缩变圆、细胞间隙增大后加入含血清的培养基中止消化;离心去除含消化液的培养液,重新加入培养基后轻轻吹打,制成细胞悬液,按1:(2~3)比例接种培养,隔天换液。

1.4.2 免疫荧光检测WISH细胞CK14和vimentin的表达 角蛋白CK14是上皮细胞特异性表达蛋白,也是上皮细胞的标志产物。Vimentin主要表达于中胚层起源的间充质细胞。应用免疫荧光检测角蛋白抗体阳性可鉴定为上皮细胞。当WISH细胞生长至约80%时,按试剂盒说明进行细胞免疫荧光染色检测,一抗CK14 (1:200), vimentin (1:200), 37℃孵化2 h; PBS漂洗5 min×3次;二抗FITC标

记山羊抗兔IgG (1:200), 37℃杂交1 h; PBS漂洗5 min×3次; 5 μg/mL DAPI 2 min; PBS漂洗5 min×3次; 抗淬灭封片剂封片; 以WISH细胞+二抗处理为阴性对照, 荧光显微镜下观察并采图。

1.4.3 WISH细胞的成骨诱导及茜素红染色 WISH细胞培养生长达到80%~90%融合时, 消化后接种于6孔板中, 每孔约 3×10^5 个细胞, 加入2 mL/孔完全培养液。放入37℃、体积分数5% CO₂孵箱中培养, 24 h后移去旧培养液。将其分为2组, 诱导组加入2 mL/孔成骨诱导液, 对照组加原培养液; 每3 d换液, 成骨诱导2~3周后, 观察是否有钙结节形成, 采用茜素红染色评价骨向分化能力。

1.4.4 RT-qPCR检测碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 基因的表达 ALP是早期成骨分化的标志指标。成骨诱导3周后, 诱导组和对照组WISH细胞分别加入1 mL RNA iso Plus裂解; 12 000×g 4℃离心5 min; ALP基因和内对照甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因引物序列见表1。其余步骤参照1.3.3进行ALP基因检测。

1.5 移植重组组织块, 验证WISH细胞、第二腮弓上皮的成牙分化

1.5.1 重组移植组织的准备 采用胚层重组实验进行组织重组(无成牙能力的WISH上皮细胞和第二腮弓上皮), 将重组的组织块移植于小鼠肾被膜下, 观察WISH上皮细胞和第二腮弓上皮是否获得成牙能力。具体为: 将重组移植组织分为5组, 分别为阳性对照组: 第一腮弓上皮(first branchial arch epithelium, FA Epi)+第二腮弓间充质(second branchial arch mesenchyme, SA Mes)(FA Epi+SA Mes); 阴性对照组: WISH+SA Mes组和第二腮弓上皮(second branchial arch epithelium, SA Epi)+SA Mes(SA Epi+SA Mes)组; 实验组为两阴性对照加入

BMP4重组蛋白, 即: WISH+SA Mes+BMP4和SA Epi+SA Mes+BMP4。

参照1.3.3完整分离出胎鼠E10.5第一、二腮弓上皮及间充质。WISH细胞消化后离心使其聚集成团块; 将凝胶珠放入100 ng/mL BMP4重组蛋白37℃孵育1 h, 然后将其放入第二腮弓上皮或者WISH细胞团块中; 放入离心管中离心使其紧密结合以便移植。

1.5.2 肾被膜下移植以及取材 选取8~10周C57雄鼠30只, 随机分为5组, 每组6只。用2.5%的水合氯醛, 按每10 g小鼠肌注0.1 mL麻醉, 背部右侧肋下切口暴露肾脏, 分离肾被膜, 每只小鼠的肾被膜下按分组放入2~3个相同重组块, 分层缝合创口。4周后处死小鼠, 取移植植物, 每组分两部分, 一部分分离周围组织观察牙齿发育的形态特征, 另一部分用体积分数为4%多聚甲醛固定24 h, 10% EDTA 37℃脱钙1周, 脱水, 包埋, 切片; 切片脱蜡至水, 进行HE染色, 观察组织形态学变化。

2 结果

2.1 E9.5~E14.5胚胎形态学观察及BMP4、FGF8、SHH、LEF1蛋白在胎鼠E10.5、E11.5、E14.5口腔上皮和间充质的时空差异化表达

结果显示, E9.5时胚胎呈半透明, 可见背腹走向的6对腮弓, 其中第1、2、3、6腮弓清晰可见, 而4、5腮弓发育不完全(图1A); E10.5时可见第一腮弓开始分化为上颌突(图1B黄箭)和下颌突(图1B蓝箭), 牙胚尚未发育, 第一腮弓较大呈现一对半月形, 第二腮弓较第一腮弓小; E11.5时胚胎体积增大, 上、下颌突明显分离, 口腔初具形态(图1C); E14.5时, 胚胎进一步发育, 颌面各部形态已清晰可见(图1D)。

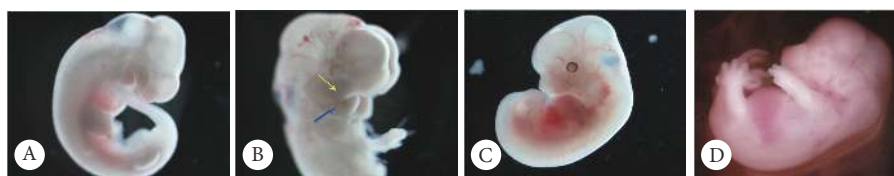


图1 E9.5~E14.5胚胎形态学观察

Fig 1 Morphology of the embryos on E9.5-E14.5

A: E9.5 embryo, ×1; B: E10.5 embryo (Yellow arrow: Maxillary process; Blue arrow: Mandible process), ×2.7; C: E11.5 embryo, ×1; D: E14.5 embryo, ×1

胎鼠E10.5~E14.5免疫组化染色结果显示: E10.5时BMP4蛋白主要表达于第一腮弓上皮, 而在第一腮弓间充质、第二腮弓上皮及间充质均无表达。E11.5时牙胚发育为牙板期, 可看到特定位置上皮的增厚(图2红色楔形箭头示), BMP4蛋白主要表达在口腔上皮的牙板增厚区, 间充

质未见阳性区域。E14.5时BMP4蛋白在牙胚上皮无表达, 在间充质中有表达, 其中牙囊部位为主要的阳性表达区域。见图2A。上述结果表明: E10.5~E14.5 BMP4蛋白的阳性表达从第一腮弓上皮开始, 逐渐向间充质转移表达。

E10.5胎鼠FGF8蛋白主要表达于第一腮弓上皮, 在第

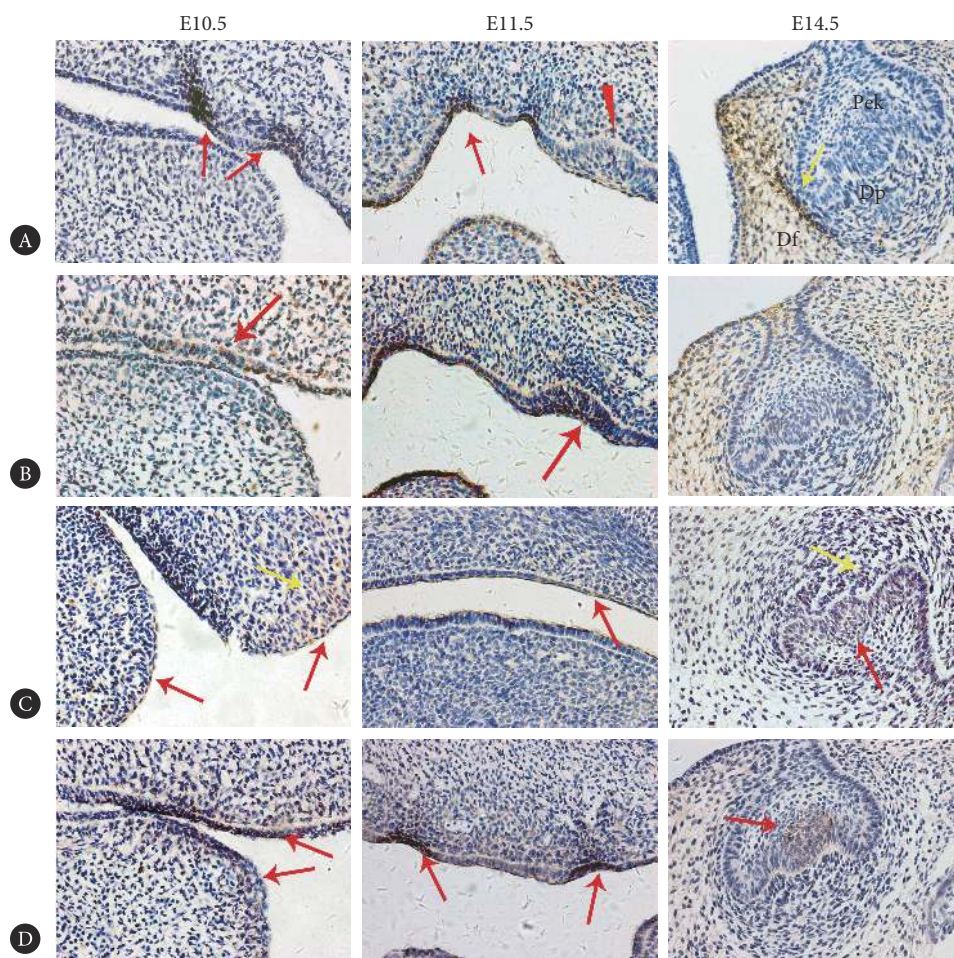


图 2 免疫组化染色检测胎鼠E10.5~E14.5时BMP4 (A)、FGF8 (B)、LEF1 (C)、SHH (D) 蛋白在上皮和间充质的表达。×100

Fig 2 Immunohistochemistry staining results of BMP4 (A), FGF8 (B), LEF1 (C), SHH (D) proteins expressed in the epithelium and mesenchyme on E10.5-E14.5 of fetal mice. ×100

Pek: Primary enamel knot; Dp: Dental papilla; Df: Dental follicle; Red wedge: Dental lamina thickening area; Red arrow: Positive epithelial area; Yellow arrow: Positive mesenchymal area

一腮弓间充质、第二腮弓上皮间充质无表达;E11.5时FGF8蛋白主要表达在口腔上皮的牙板增厚区,间充质未见阳性区域;E14.5时FGF8蛋白在牙胚上皮及间充质中均无表达。见图2B。

E10.5胎鼠LEF1蛋白在第一、二腮弓上皮、间充质中均有表达;E11.5时主要表达在口腔上皮,间充质未见阳性区域;E14.5时LEF1蛋白在牙胚上皮及间充质中均有阳性区域。见图2C。

E10.5胎鼠SHH蛋白在第一腮弓、第二腮弓上皮表达,间充质无表达;E11.5时主要表达在口腔上皮的牙板增厚区,间充质未见阳性区域;E14.5时SHH蛋白主要表达在牙胚的釉结区域。见图2D。

2.2 RT-qPCR检测胎鼠E10.5第一、二腮弓上皮和间充质组织BMP4、FGF8、SHH、LEF1基因的表达

由图3可见,BMP4、FGF8、SHH、LEF1基因在第一腮弓上皮表达均高于第一腮弓间充质、第二腮弓上皮、第

二腮弓间充质,差异有统计学意义($P < 0.05$);FGF8、SHH、LEF1 mRNA在第二腮弓上皮表达均高于间充质

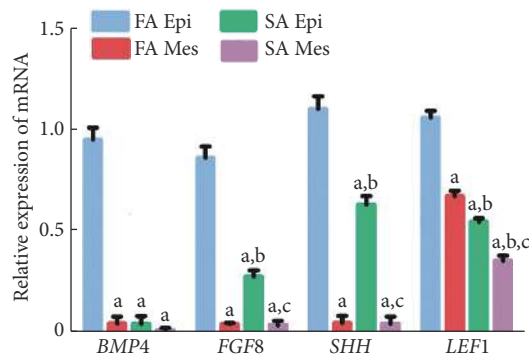


图 3 E10.5时BMP4、FGF8、SHH和LEF1 mRNA在胎鼠第一、二腮弓的表达 (n=6)

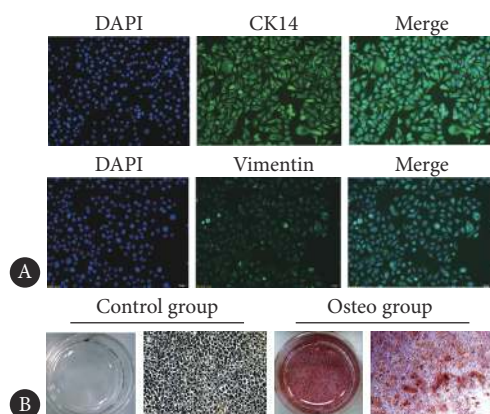
Fig 3 Expressions of BMP4, FGF8, SHH, LEF1 mRNAs in the FA and SA in fetal mice on E10.5 (n=6)

FA: First branchial arch; SA: Second branchial arch; Epi: Epithelium; Mes: Mesenchyme. a $P < 0.05$, vs. FA Epi; b $P < 0.05$, vs. FA Mes; c $P < 0.05$, vs. SA Epi

($P < 0.05$); *LEF1* mRNA在第一、第二腮弓间充质都有表达。

2.3 WISH细胞成骨诱导

结果显示: WISH细胞呈多角形, 长满后呈上皮细胞特有的铺路石样。免疫荧光结果显示, CK14强表达,



vimentin弱表达(图4A)。成骨诱导3周后茜素红染色阳性(图4B), 即经成骨诱导后WISH细胞形成钙结节。RT-qPCR检测结果显示, 与对照组相比, WISH细胞成骨诱导3周ALP mRNA表达升高($P < 0.05$)。

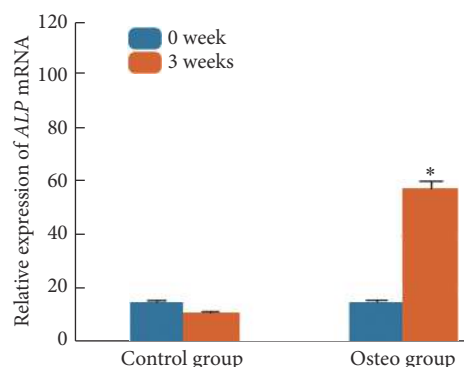


图4 WISH细胞免疫荧光检查鉴定(A, $\times 100$)、成骨诱导3周后茜素红染色(B, $\times 40$)及RT-qPCR检测ALP mRNA表达(C, $n=3$)

Fig 4 Immunofluorescence result of identifying WISH cells (A, $\times 100$), ALZ staining result after 3 weeks' osteogenesis induction (B, $\times 40$) and the expression of ALP mRNA after 3 weeks' osteogenesis induction detected by RT-qPCR (C, $n=3$)

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; Osteo: Osteogenesis induction; * $P < 0.05$, vs. 0 week

2.4 肾被膜下移植

移植4周后取材, 可见各组移植在肾被膜下均有不同程度的生长, 其中阳性对照组、实验组生长情况均良好, 可见肾被膜包裹下的移植体呈块状, 触之坚硬(图5A~5C)。两阴性对照组仅有软组织形成(图5D、

5E)。分离阳性对照组和实验组的移植组织, 均可见似磨牙牙冠形态, 但是肾被膜下移植形成的牙冠牙尖形态均不明显, 牙冠圆滑, 且3组均未见牙根发育的迹象(图6)。

各组移植切片HE染色结果显示(图7): 阳性对照组(A)和实验组(B、C)均可见牙齿样组织的形成, 镜下见

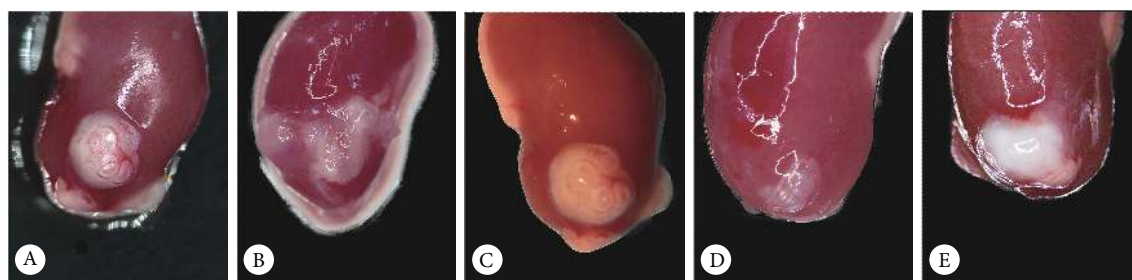


图5 肾被膜下移植4周后各组移植体大体图

Fig 5 General morphology of grafts after 4 weeks' renal subcapsular transplantation

A: FA Epi+SA Mes, positive control group; B: WISH+SA Mes+BMP4, experimental group; C: SA Epi+SA Mes+BMP4, experimental group; D: WISH+SA Mes, negative control group; E: SA Epi+SA Mes, negative control group

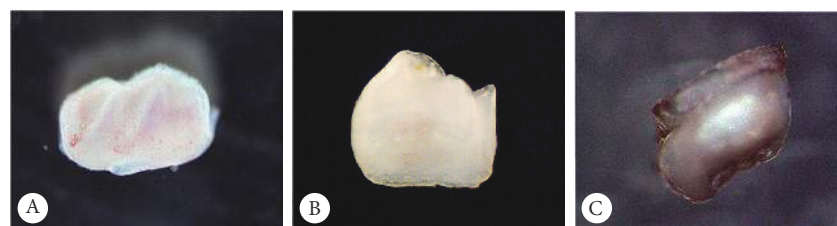


图6 肾被膜移植4周后所形成的牙胚形态图

Fig 6 Morphology of tooth germs formed in the grafts after 4 weeks' renal subcapsular transplantation

A: FA Epi+SA Mes, positive control group; B: WISH+SA Mes+BMP4, experimental group; C: SA Epi+SA Mes+BMP4, experimental group

类似正常牙齿组织结构的牙釉质、牙本质样结构。A和实验组(SA Epi+SA Mes+BMP4, C)还可见排列规则的成牙本质样细胞,实验组(WISH+SA Mes+BMP4, B)的细胞

排列相对不规则。而两组未加入BMP4的阴性对照组则仅可见一些不规则的囊袋样结构,中间有散在角化珠的形成,但未见牙釉质以及牙本质样结构。5组中均未见牙

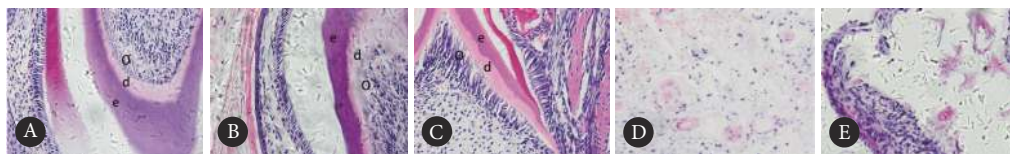


图 7 肾被膜下移植4周后各组移植HE染色。×20

Fig 7 Hematoxylin-eosin (HE) staining of grafts after 4 weeks' renal subcapsular transplantation. ×20

A: FA Epi+SA Mes; B: WISH+SA Mes+BMP4; C: SA Epi+SA Mes+BMP4; D: WISH+SA Mes; E: SA Epi+SA Mes. e: Enamel; d: Dentin; O: Odontoblast

根的发育迹象。

3 讨论

近年来,随着学者对牙发生过程的研究加深,出现了两种全牙再生的思路,其一是基于支架的牙再生,其二是无支架的牙再生。

基于支架的牙再生是将具有特定生物活性的牙源性细胞种植到具有一定空间结构的支架材料上,并提供可以使细胞生长和分化的生长因子微环境,通过细胞的附着、生长和分化,形成牙齿样结构或牙齿。在整个牙再生过程中,种子细胞、生物支架和生长因子微环境被认为是生物组织工程的3个基本要素。YOUNG等^[21]将猪的第三磨牙牙髓解离的单细胞悬液接种在聚乳酸-聚乙醇酸支架上,在免疫缺陷大鼠宿主中生长20~30周后发现矿化的牙齿结构。但是目前为止牙再生的实验中牙的数目、形状及大小均不可控^[21-23]。

无支架牙再生则是利用了胚层重组技术,使上皮-间充质相互作用,诱导间充质细胞成牙分化。OHAZAMA等^[24]于2004年通过使用小鼠口腔胚胎上皮的重组技术培育了牙齿始基;以及包含由胚胎干细胞、神经干细胞、骨髓干细胞制备的非牙齿细胞群体的细胞聚集体。

目前牙再生最大的障碍是找到临床上可行的合适细胞来源,诱导种子细胞的成牙能力并通过基因层面调控发育的过程和方向。牙齿再生的研究主要是利用胚胎干细胞或成体干细胞进行,随着对胚胎干细胞研究的伦理关注,很难找到合适的来源于患者的干细胞。若使用异种来源的间充质细胞,则有可能产生免疫排斥。从牙胚中提取的自体干细胞在体外很难分离和扩增,临床应用困难。

无论何种牙再生方式,均需要找到种子细胞以及调控牙发生过程的生长因子。

由于牙发育各个阶段受细胞间信号传递形成的复杂网络所调控,牙胚的发育需要各信号精确的时空表达。本实验选择牙胚启动阶段表达于上皮的信号分子BMP4、

FGF8、SHH和LEF1,初步探索成牙过程中的关键信号分子,结果发现上述4种信号分子在E10.5~E14.5表现出时空差异性表达。BMP4蛋白在牙板期表达于上皮,而在蕾状期之后其表达则转移至间充质,与成牙潜能从上皮至间充质的转移时间一致,两者在转移时间和方向上的一致性提示,BMP4可能在维持上皮和间充质的成牙潜能中都有关键作用。

免疫组化实验中FGF8蛋白第二腮弓上皮无表达,而qRT-PCR结果显示FGF8 mRNA在第二腮弓上皮有表达,除此之外,其余结果均一致。qRT-PCR是从转录水平上检测目的基因,而免疫组化是从蛋白水平进行检测,从转录到翻译还有复杂的过程,因此基因的表达和蛋白的表达不一定完全呈现正相关。

用组织重组后小鼠肾被膜下移植来验证BMP4的功能,结果证实,加入外源性的BMP4蛋白可使原本无成牙能力的第二腮弓上皮和WISH上皮细胞获得成牙能力,形成类似正常牙组织的牙釉质、牙本质样结构构成的牙冠,证实了BMP4为成牙关键基因,可使非牙源性上皮获得成牙能力,可能为牙再生过程中的必要启动基因,为精确可控的牙再生提供可能性。

此外,本实验亦验证了WISH细胞在特定情况下的成牙能力,因WISH细胞取自废弃的胎盘组织,极易获取且不存在伦理争议,因此WISH细胞有望成为组织工程牙再生的种子细胞,但仍需进一步研究其成牙潜能。

参 考 文 献

- [1] PISPA J, THESLEFF I. Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol*, 2003, 262(2): 195-205.
- [2] THESLEFF I, SHARPE P. Signaling networks regulating dental development. *Mech Dev*, 1997, 67(2): 111-123.
- [3] JERNVALL J, THESLEFF I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 2000, 92(1): 19-29.
- [4] TUCKER A S, SHARPE P T. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(7):

- 499–508.
- [5] LUMSDEN A. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*, 1988, 103(suppl): 155–169.
- [6] ZHANG Y, WANG S, SONG Y, *et al.* Timing of odontogenic neural crest cell migration and tooth-forming capability in mice. *Dev Dyn*, 2003, 226(4): 713–718.
- [7] THESLEFF I, HURMERINTA K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation*, 1981, 18(2): 75–88.
- [8] MINA M, KOLLAR E J. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol*, 1987, 32(2): 123–127.
- [9] KOLLAR E J, BAIRD G R. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. I. Reorganization of the dental epithelium during tooth-germ reconstruction. *J Embryol Exp Morphol*, 1970, 24(1): 159–171.
- [10] CHEN Y, ZHANG Y, JIANG T X, *et al.* Conservation of early odontogenic signaling pathways in Aves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(18): 10044–10049.
- [11] BEI M. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev*, 2009, 19(5): 504–510.
- [12] VAINIO S, KARAVANOVA I, JOWETT A, *et al.* Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell*, 1993, 75(1): 45–58.
- [13] TURECKOVA J, SAHLBERG C, ÅBERG T, *et al.* Comparison of expression of the *msx-1*, *msx-2*, *BMP-2* and *BMP-4* genes in the mouse upper diastemal and molar tooth primordia. *Int J Dev Biol*, 1995, 39(3): 459–468.
- [14] NEUBUSER A, PETERS H, BALLING R, *et al.* Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell*, 1997, 90(2): 247–255.
- [15] DASSULE H R, MCMAHON A P. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol*, 1998, 202(2): 215–227.
- [16] LAN Y, JIA S, JIANG R. Molecular patterning of the mammalian dentition. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 25–26: 61–70.
- [17] JUSSILA M, THESLEFF I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(4): a008425 [2020-05-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312678/>. doi: 10.1101/cshperspect.a008425.
- [18] MIKI T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *Am J Reprod Immunol*, 2018, 80(4): e13003 [2020-05-27]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/aji.13003>. doi: 10.1111/aji.13003.
- [19] ILANCHERAN S, MICHALSKA A, PEH G, *et al.* Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*, 2007, 77(3): 577–588.
- [20] SI J, ZHANG J, DAI J, *et al.* Osteogenic differentiation of human amniotic epithelial cells and its application in alveolar defect restoration. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(12): 1504–1513.
- [21] YOUNG C S, TERADA S, VACANTI J P, *et al.* Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*, 2002, 81(10): 695–700.
- [22] DUAILIBI M T, DUAILIBI S E, YOUNG C S, *et al.* Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *Dent Res*, 2004, 83(7): 523–528.
- [23] GALLER K M, DSOUZA R N, HARTGERINK J D, *et al.* Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res*, 2011, 23(3): 333–339.
- [24] OHAZAMA A, MODINO S A, MILETICH I, *et al.* Stem-cell based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*, 2004, 83(7): 518–522.
- (2020 – 03 – 01收稿, 2020 – 06 – 04修回)
- 编辑 沈 进