

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.013

## 骨涎蛋白在大鼠磨牙第三期牙本质形成过程中的表达\*

谢晓华<sup>1</sup> 赵芳<sup>1</sup> 王丽杰<sup>2</sup> 刘培红<sup>3</sup> 王海侠<sup>4</sup> 马肃<sup>3</sup> 王秀梅<sup>1</sup>

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086; 2 大庆油田总医院 黑龙江 大庆 163001;

3 哈尔滨医科大学附属口腔医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 4 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要 目的:**观察大鼠牙髓修复第三期牙本质形成过程中骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)的表达变化及意义。**方法:**选取6周龄雄性Wistar大鼠10只,建立实验大鼠模型,利用免疫组化法检测大鼠第三期牙本质中骨涎蛋白的表达情况。**结果:**盖髓2周后,在盖髓处下方有第三期牙本质形成。与原发性牙本质(PD)相比,第三期牙本质小管数目少且形态不规则。BSP在原发性牙本质中没有表达,但在盖髓下方和髓角下第三期牙本质中都有表达。**结论:**BSP可能通过参与羟基磷灰石(HA)的形成以及调节新分化的成牙本质细胞向新形成的牙本质基质的粘附来参与早期的第三期牙本质的生成。

**关键词:**原发性牙本质;第三期牙本质;骨涎蛋白

**中图分类号:**Q95-3;R783 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5451-03

## Expression of Bone Sialoprotein in the Tertiary Dentin of Rat Molars\*

XIE Xiao-hua<sup>1</sup>, ZHAO Fang<sup>1</sup>, WANG Li-jie<sup>2</sup>, LIU Pei-hong<sup>3</sup>, WANG Hai-xia<sup>4</sup>, MA Su<sup>3</sup>, WANG Xiu-mei<sup>1</sup>

(1 The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China;

2 General Hospital of Daqing Oil Field group, Daqing, Heilongjiang, 163001, China;

3 The Stomatology Hospital Affiliated to Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

4 The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

**ABSTRACT Objective:** To analyze the expression and distribution of bone sialoprotein (BSP) in tertiary dentin (TD). **Methods:** 10 six-week male Wistar rats were selected and made to establish the experiment model. The expression of bone sialoprotein was detected by immunolocalization. **Results:** Two weeks after the operation, the region on the cavity bottom formed tertiary dentin. Dentinal tubules in TD were more irregular in shape and fewer in number than PD. At post-operative 2 weeks, BSP was present in TD, but not in PD. TD showed certain similarities to TD under the corner of pulp. **Conclusions:** It is indicated that the odontoblasts would produce a hard tissue in a rapid pace. These findings suggest that in response to the surgical injury, the newly differentiated odontoblasts altered their synthesis of the dentinogenesis-related proteins, and produced a hard tissue that is an intermediate between dentin and bone.

**Key words:** Primary dentin(PD); Tertiary dentin(TD); Bone sialoprotein (BSP)

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3; R783 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2014)28-5451-03

### 前言

在牙和骨等矿化组织中,酸性磷蛋白在羟基磷灰石晶体(HA)的成核和生长中具有重要的作用<sup>[1,2]</sup>。骨涎蛋白为磷酸化的糖蛋白,在骨和牙骨质中有表达<sup>[3,4]</sup>,目前已经证实骨涎蛋白为HA的成核剂<sup>[5]</sup>。BSP作为成核剂具有双向的作用,对HA晶体的形成具有成核作用,同时也有抑制作用<sup>[6]</sup>。牙髓在遭受损伤时会产生修复反应,新形成的第三期牙本质具有保护牙髓的作用,对于BSP在第三期牙本质中HA形成的作用目前尚不明确,本研究采用免疫组化方法观察BSP在牙髓损伤修复中的表达情况,探讨其在第三期牙本质形成中的作用

### 1 材料和方法

#### 1.1 模型的建立

10只6周龄雄性Wistar大鼠,体重80-100克,每只大鼠取2个上颌第一磨牙。所有的操作程序在10%水合氯醛腹腔内麻醉下完成。5.25%的NaOCl清洁牙齿,0.2%氯己定消毒。在上颌左右第一磨牙的近中面备洞,方向朝向近中髓角处。备洞近髓后,氢氧化钙盖髓剂盖髓,玻璃离子水门汀充填窝洞<sup>[7]</sup>。在盖髓操作后的2周后取材,观察盖髓处修复性牙本质的形成。

#### 1.2 标本取材及石蜡切片

10%的水合氯醛腹腔内麻醉,4%多聚甲醛固定后取材,外固定后8%EDTA脱钙4-8周。修整标本,依次经梯度乙醇脱水后,二甲苯透明,石蜡浸蜡并包埋。沿牙体冠状面方向,连续4μm切片,用于HE染色和免疫组化检测。

#### 1.3 免疫组织化学方法

\* 基金项目:黑龙江省自然科学基金(面上项目)(H201418)

作者简介:谢晓华(1979-),女,博士,主治医师,主要研究方向:牙齿和骨组织的矿化研究,

电话:18724603400, E-mail:xiexiaohua\_79@126.com

(收稿日期:2014-06-10 接受日期:2014-06-30)

BSP 单克隆抗体<sup>[8]</sup>由秦春林教授馈赠,SP9001 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物技术公司。石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢阻断溶液室温封闭 10 分钟。蒸馏水冲洗,0.01M 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)浸泡 5 分钟,透明质酸酶抗原修复 1 小时。0.01MPBS 漂洗。正常山羊血清封闭过夜。滴加一抗(稀释度 1:600)1 小时。0.01M PBS 漂洗。滴加酶标二抗,室温下 20 分钟。0.01M PBS 漂洗。3,3'-二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色。显微镜下观察,阳性显色为棕色。苏木素复染。切片经过梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。阴性对照用小鼠的 IgG 代替一抗。

## 2 结果

### 2.1 组织学表现

处理组 10 只小鼠共 20 颗第一磨牙,组织学结果显示 14 例表现为形成第三期牙本质并伴有健康的牙髓组织,2 例有第三期牙本质形成但牙髓组织有炎症表现,4 例盖髓治疗失败,表现为充填物脱落、牙髓坏死并且未见第三期牙本质形成。

在盖髓操作后,可见到第三期牙本质(TD)形成,第三期牙本质和原发性牙本质(PD)的交界处有明显的界限(图 1(a)中箭

头),这两种牙本质的小管走行方向不同。与原发性牙本质相比,新形成的修复性牙本质小管数目少,小管走行方向不规则且不均匀(图 1(a))。在第三期牙本质的部分区域可以看见细胞包埋在牙本质基质当中(图 1(c)中的箭头),表现为骨样牙本质。这部分牙本质主要位于最初形成的牙本质,即接近备洞处的牙本质。在髓角下方,由于磨损等原因也会产生第三期牙本质(TD'),第三期牙本质使大鼠磨牙的髓角变低,牙本质小管结构不规则,盖髓下方的修复性牙本质与髓角下方形成的第三期牙本质结构相似。

### 2.2 免疫组化结果

BSP 在原发性的牙本质(PD)中没有表达。在盖髓治疗后的二周,有修复性的基质(TD)覆盖露髓处,此处组织可以看到较强的 BSP 的阳性表达(图 1(b),(c)),阳性表达邻近含成牙本质细胞或成牙本质细胞样细胞的髓周区域。在骨样牙本质处,BSP 表达阳性更明显(图 1(c)中箭头)。在髓角下方的第三期牙本质中(TD'),也可以看到较强的 BSP 的表达,早期形成的修复性牙本质,几乎全部表达 BSP(图 1(d)中\*)。在后期形成的第三期牙本质中,BSP 的表达减少(图 1(d)中△)。

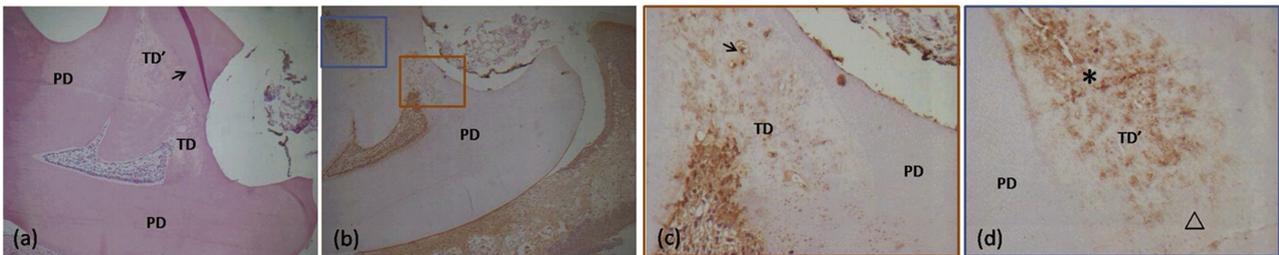


图 1 BSP 在第三期牙本质中的表达 (a× 50 倍;b,c,d× 200 倍)

Fig. 1 The expression of BSP in tertiary dentin of rat molars

## 3 讨论

牙本质的生成是一个复杂的过程,包括干细胞分化为前体细胞,进一步化为成牙本质细胞,成牙本质细胞分泌非胶原蛋白到细胞外基质当中,形成前期牙本质,前期牙本质在非胶原蛋白的作用下,由富含 Ca、P 的羟基磷灰石逐渐沉积,矿化形成牙本质<sup>[9]</sup>。原发性牙本质是在生理状态下形成的,当牙齿遭受磨损、龋、口腔材料刺激或口腔修复操作时会生成第三期牙本质<sup>[10,11]</sup>,局部的第三期牙本质的屏障特性可以保护牙髓,并且为损伤后修复治疗提供一个更坚硬的硬组织基底<sup>[12]</sup>。在牙本质形成过程中,非胶原蛋白(NCPs)具有重要的意义。目前认为 NCPs 可以积极地促进和控制胶原纤维的矿化以及晶体结构在前期牙本质中的生长,最终使组织矿化转变为牙本质<sup>[13,14]</sup>。

BSP 作为非胶原蛋白在骨基质中有丰富的表达<sup>[15,16]</sup>,而在生理条件下在原发性的牙本质中不表达<sup>[9]</sup>。BSP 在 HA 晶体的形成和生长中具有重要作用<sup>[16]</sup>。BSP 在最初的 HA 晶体的形成以及后来起成核的作用,在随后的矿物质在胶原基质上生长,BSP 在指导晶体形成时起抑制作用。在本实验中,BSP 在原发性的牙本质中没有表达,但在第三期牙本质中可以检测到。说明在第三期牙本质形成时,该蛋白在指导 HA 晶体的形成中起

作用<sup>[17]</sup>。

由于 BSP 在骨基质中含量丰富且具有重要功能<sup>[18]</sup>,我们观察到它在初期形成的第三期牙本质中表达,表明了最初形成的第三期牙本质具有某些骨样的特征。BSP 在第三期牙本质中的表达,还伴随着包含有内陷细胞的基质样结构,这些表明成牙本质细胞,在外科创伤的影响下,可能以非常快的速度试图生成一种硬组织来保护细胞不受外界有害的刺激。另外,在早期形成的第三期牙本质中(即接近窝洞制备的区域),BSP 的表达明显,然而在后期形成的修复性牙本质中(即接近牙髓的位置),这种蛋白的表达变少。表明了后期阶段的成牙本质细胞稳定地分泌基质并矿化,生成牙本质样的组织结构。

BSP 除了在 HA 晶体的形成和生长中具有直接作用外<sup>[19]</sup>,还可以通过它的细胞粘附域如 RGD 序列来调节细胞和基质间的相互作用<sup>[20,21]</sup>。本研究结果显示,BSP 在修复性牙本质生成过程中基质形成的早期阶段有表达,可能由于该蛋白在最初时参与调节新分化的成牙本质细胞向新形成的牙本质基质的粘附。

综上所述,与原发性牙本质相比,第三期牙本质的小管结构不规则且数目少,BSP 的表达也不同。BSP 在第三期牙本质中的表达,说明它参与第三期牙本质的形成。BSP 也可能通过调节成牙本质细胞向新形成的牙本质基质的粘附来参与第三

期牙本质的生成。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Boudiffa M, Wade-Gueye NM, Guignandon A, et al. Bone sialoprotein deficiency impairs osteoclastogenesis and mineral resorption in vitro [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(12): 2669-2679
- [2] Chen Z, Wang S, Wang YH, et al. Emdogain regulates the expression of bone sialoprotein gene in human dental pulp cell[J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2013, 48(9): 535-538
- [3] Qin C, Baba O, Butler WT. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004, 15(3): 126-136
- [4] Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1999, 10(1): 79-98
- [5] Choi YJ, Lee JY, Chung CP, et al. Enhanced osteogenesis by collagen-binding peptide from bone sialoprotein in vitro and in vivo [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(2): 547-554
- [6] Baht GS, O'Young J, Borovina A, et al. Phosphorylation of Ser136 is critical for potent bone sialoprotein-mediated nucleation of hydroxyapatite crystals[J]. *Biochem J*, 2010, 428(3): 385-395
- [7] Li Z, Sae-Lim V. Comparison of acidic fibroblast growth factor on collagen carrier with calcium hydroxide as pulp capping agents in monkeys[J]. *Dent Traumatol*, 2007, 23(5): 278-286
- [8] Huang B, Sun Y, Maciejewska I, et al. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone[J]. *Eur J Oral Sci*, 2008, 116(2): 104-112
- [9] Jiang N, Zhou J, Chen M, et al. Postnatal epithelium and mesenchyme stem/progenitor cells in bioengineered amelogenesis and dentinogenesis[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2172-2180
- [10] Nancy A. Dentin-pulp complex. In: Nancy A. ed. *Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function* [M]. Six edition. St Louis, USA, Mosby, 2003: 192-239
- [11] Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration[J]. *Caries Res*, 2004, 38(3): 314-320
- [12] Tecles O, Laurent P, Aubut V, et al. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 85(1): 180-187
- [13] Chibinski AC, Gomes JR, Camargo K, et al. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinases and type I collagen expression after sealing infected caries dentin in primary teeth [J]. *Caries Res*, 2014, 48(4): 312-319
- [14] Yu HS, Won JE, Jin GZ, et al. Construction of mesenchymal stem cell-containing collagen gel with a macrochanneled polycaprolactone scaffold and the flow perfusion culturing for bone tissue engineering [J]. *Biores Open Access*, 2012, 1(3): 124-136
- [15] Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism[J]. *J Periodontol Res*, 2008, 43(2): 127-135
- [16] Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(5): 1145-1153
- [17] Moses K, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of SIBLING proteins in reactionary dentin of rat molars at different ages[J]. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114(3): 216-222
- [18] Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Vanden-Bossche A, et al. Absence of bone sialoprotein (BSP) impairs primary bone formation and resorption: the marrow ablation model under PTH challenge[J]. *Bone*, 2012, 50(5): 1064-1073
- [19] Zurick KM, Qin C, Bernards MT. Mineralization induction effects of osteopontin, bone sialoprotein, and dentin phosphoprotein on a biomimetic collagen substrate [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(6): 1571-1581
- [20] Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis[J]. *Circ Res*, 2000, 86(8): 885-891
- [21] Wang S, Chen Z, Ning J, et al. Calcium hydroxide regulates bone sialoprotein gene transcription in human dental pulp cell [J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2012, 47(9): 552-556