

# 基质金属蛋白酶-8 在人和大鼠牙胚发育钟状期的表达

郝玉庆<sup>1</sup>, 牛忠英<sup>2</sup>, 王国荃<sup>3</sup>, 周学东<sup>1</sup>, 胡 涛<sup>1</sup>

(1. 四川大学教育部口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川 成都 610041;

2. 北京解放军 306 医院 口腔科, 北京 100101; 3. 新疆医科大学公共卫生学院环境卫生系, 新疆 乌鲁木齐 830054)

**[摘要]** 目的 研究基质金属蛋白酶-8(MMP-8)在牙胚发育牙本质形成过程中的表达。方法 免疫组织化学方法检测 MMP-8 在人牙胚发育钟状期的表达;原位杂交方法检测 MMP-8 mRNA 在大鼠牙胚发育钟状期的表达。结果 MMP-8 在人牙胚钟状晚期硬组织形成期成牙本质细胞和牙本质基质阳性表达,近髓腔处,牙本质染色更深;MMP-8 mRNA 在大鼠牙胚发育钟状早期个别分化的成牙本质细胞表达阳性,钟状晚期,即硬组织形成期,MMP-8mRNA 在成牙本质细胞表达强阳性。结论 MMP-8 可能参与了人和大鼠牙胚发育过程牙本质基质改建。

**[关键词]** 基质金属蛋白酶-8; 牙胚发育; 牙本质形成

**[中图分类号]** R781 **[文献标识码]** A

**Expression of Matrixmetalloproteinase-8 on the Bell-stage in Human and Rat Tooth Development** HAO Yu-qing<sup>1</sup>, NIU Zhong-ying<sup>2</sup>, WANG Gou-quan<sup>3</sup>, ZHOU Xue-dong<sup>1</sup>, HU Tao<sup>1</sup>. (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Dentistry, 306th Hospital people's Liberation Army, Beijing 100101, China; 3. Dept. of Environment Hygiene, College of Public Hygiene Xinjiang Medical University, Urumchi 830054, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression of MMP-8 in human and rat tooth development. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the localization of MMP-8 protein while in situ hybridization was used to examine the expression of MMP-8 mRNA. **Results** The expression of MMP-8 protein was localized in odontoblast and dentin matrix at the later bell stage in human tooth germ. The dentin was denser close to the pulp cavity. The expression of MMP-8 mRNA was found in very few polarized odontoblast at the early bell stage and all polarized odontoblast at the later bell stage in rat tooth germ. **Conclusion** The results suggested that MMP-8 involved in dentin matrix rebuilding in the process of dentin formation in human and rat dental development.

**[Key words]** matrixmetalloproteinase-8; tooth development; dentin formation

牙胚发育过程中,细胞外基质对上皮-间充质细胞的相互诱导和牙釉质、牙本质矿化起非常重要的作用。在行使此功能时,细胞外基质适度的降解是不可避免的。基质金属蛋白酶(matrixmetalloproteinases, MMPs)是降解细胞外基质的重要酶类,1997年,Hanemaaijer等<sup>1</sup>研究表明,MMP在胚胎发育中不仅参与细胞外基质改建,还可能调控程序性细胞死亡、细胞的运动和迁移。MMP-8降解I型胶原能力最强,牙本质基质主要成分是I型胶原。为了明确MMP-8在牙胚发育中的作用,本实验分别用免疫组织化学方法和原位杂交方法研究MMP-8在人和大鼠牙胚发育钟状期的定位表达,为明确其在牙本质基质改建、矿

化中的作用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及实验动物来源

兔抗人MMP-8多克隆抗体,SABC免疫组织化学染色试剂盒,MMP-8原位杂交检测试剂盒均购于武汉博士德公司。DEPC水(Sigma公司,美国)。SD大鼠由第四军医大学动物中心提供。

### 1.2 免疫组化标本制备和染色方法

取胎龄20周胎儿颌骨,于40 g/L多聚甲醛-磷酸盐缓冲液4℃固定24 h,4℃0.5 mol/L EDTA(pH 7.4)脱钙3周,乙醇氯仿逐级脱水,石蜡包埋,制备5 μm厚连续石蜡切片。参照试剂盒说明进行免疫组化染色。以乳腺癌组织作为阳性对照,空白对照以PBS缓冲液代替一抗体。在光镜下细胞胞浆呈棕黄色为MMP-8表达阳性。

[收稿日期 2002-12-31; 修回日期 2003-10-10]

[基金项目] 博士点基金资助项目(20030610052)

[作者简介] 郝玉庆(1965-),女,陕西人,副主任医师,博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85402143

### 1.3 原位杂交标本制备和染色方法

孕 17 d SD 大鼠胎鼠和生后 1 d 子鼠处死,取头颅于 40 g/L 多聚甲醛 4 固定 24 h,系列酒精氯仿脱水,石蜡定向包埋,制备 4  $\mu$ m 厚切片(0.1 % DEPC 水展片)。参照试剂盒说明进行原位杂交染色,MMP-8 寡核苷酸探针序列:5'-GATACATCAAGGCACCA GGGTCA GAGGAT-3'。以乳腺癌组织作为阳性对照,空白对照以 PBS 缓冲液代替探针。在光镜下细胞胞浆呈蓝紫色为 MMP-8 mRNA 表达阳性。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化

MMP-8 在人牙胚钟状晚期硬组织形成期牙本质基质可见阳性表达,越近牙髓,染色越深。MMP-8 在牙乳头细胞和成牙本质细胞也有阳性表达(图 1)。



图 1 MMP-8 在人牙胚钟状晚期硬组织形成期牙本质基质的阳性表达,前期牙本质染色更深,在部分牙乳头细胞和成牙本质细胞也有阳性表达 DAB  $\times 20$

Fig 1 Human tooth germ showed positive expression of MMP-8 in dentine matrix at the late bell stage while hard tissue formation and denser staining appeared in predentin. MMP-8 positive expression in some of papilla cells and odontoblasts also showed DAB  $\times 20$

### 2.2 原位杂交

大鼠牙胚发育钟状早期细胞开始分化,基质未形成,个别分化的成牙本质细胞 MMP-8 mRNA 表达阳性(图 2);钟状晚期,即硬组织形成期,成牙本质细胞排列成高柱状,胞核远离基底膜,此时 MMP-8 mRNA 在成牙本质细胞表达强阳性(图 3)。

## 3 讨论

MMP 参与炎症、肿瘤、胚胎发育、骨重建等许多病理和生理过程。研究表明,多种类型的 MMP 参与了牙胚发育过程。MMP-8 属于 MMP 家族胶原酶类,降解 型胶原能力最强,牙本质基质的主要成分是型胶原,有关 MMP-8 与牙胚发育的关系尚不清楚。本研究结果证实 MMP-8 参与了牙胚发育过程中的牙

本质改建。

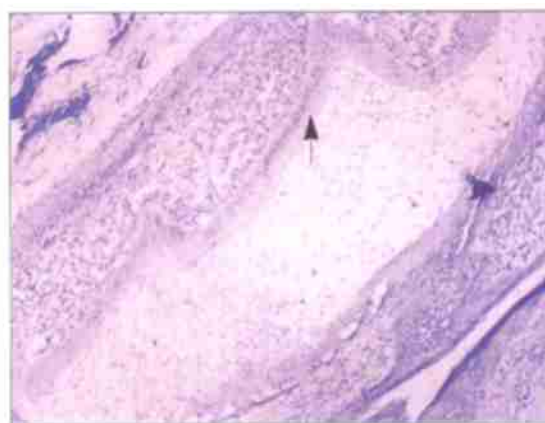


图 2 MMP-8 mRNA 在大鼠牙胚发育钟状早期个别分化的成牙本质细胞中的阳性表达 原位杂交  $\times 10$

Fig 2 The positive expression of MMP-8 mRNA showed in a few differentiated cells at early bell stage of rat tooth germ in situ hybridization  $\times 10$



图 3 MMP-8 mRNA 在大鼠牙胚发育钟状晚期成牙本质细胞的强阳性表达 原位杂交  $\times 10$

Fig 3 The strongly positive expression of MMP-8 mRNA showed in odontoblasts at the late bell stage of rat tooth germ in situ hybridization  $\times 10$

以往一直认为,MMP-8 只能由多形核白细胞合成<sup>2,3</sup>;近年研究发现,除白细胞外,其他间充质细胞如软骨细胞、内皮细胞、成纤维细胞等也可表达 MMP-8<sup>4,5</sup>。尽管以往研究曾报道牙体组织存在胶原酶,本实验证实牙乳头细胞和成牙本质细胞表达 MMP-8 仍然意义重大。因为,到目前为止,非白细胞类细胞表达 MMP-8 仍很有限,且均为间充质来源。本实验再次证实,间充质来源的牙乳头细胞、成牙本质细胞也可表达 MMP-8。

Palosaari 等<sup>6</sup>发现发育成熟的人成牙本质细胞可表达 MMP-8,他认为 MMP-8 可能与以下功能有关:在牙胚发育过程中,分泌的牙本质基质(主要是 型胶原)在前期牙本质内改建,部分牙本质基质需要降解,钙盐沉积形成矿化牙本质,MMP-8 可能对基质型胶原改建起重要作用;调节管周牙本质形成。牙

胚发育过程中,胶原是管周牙本质的主要组成成分<sup>7</sup>,其中也存在Ⅰ型胶原<sup>8,9</sup>,而牙胚发育成熟牙本质矿化后基质内无Ⅰ型胶原,管周几乎没有纤维结构,可见,矿化过程中有机基质必须降解,MMP-8对于降解管周纤维和基质Ⅰ型胶原可能起重要作用。

MMP-8在成牙本质细胞表达还有另一方面重要意义。有关MMP与牙周病的研究较多,其机制也基本明确。关于MMP与牙体牙髓组织疾病的研究较少。1998年,Tjaderhane等<sup>10</sup>发现人牙本质龋损部位存在MMP-8,但关于龋损部位MMP-8的来源一直不能肯定,过去多数人认为龋损部位MMP来源于致龋细菌和龈沟液,后来研究发现<sup>11</sup>,细菌产物不能降解胶原。2000年Palosaari等<sup>6</sup>进一步研究又发现,发育成熟的人成牙本质细胞和牙髓细胞均可表达MMP-8,由此提出,虽然龋损部位MMP主要可能来自龈沟液,但不能排除牙髓牙本质复合体来源的MMP是参与龋病过程牙本质基质降解的MMP的另一个来源<sup>1</sup>。本实验结果表明,成牙本质细胞自身可表达MMP-8,再次支持龋病过程中,牙髓—牙本质复合体本身参与了基质降解病理过程这一观点。

#### [参考文献]

- 1] Hanemaaijer R, Sorsa T, Kontinen YT, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  and doxycycline J. J Biol Chem, 1997, 272(50):31504-31509.
- 2] Mainardi CL, Pourmotabbed TF, Hasty KA. Inflammatory phagocytes and connective tissue degrading metalloproteinases J. Am J Med Sci, 1991, 302(3):171-175.
- 3] Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils J. N Engl J Med, 1989, 320(6):365-376.
- 4] Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: Up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints J. Lab Invest, 1996, 74(1):232-240.
- 5] Cole AA, Chubinskaya S, Schumacher B, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase J. J Biol Chem, 1996, 271(18):11023-11026.
- 6] Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1 J. J Dent Res, 2000, 79(1):77-84.
- 7] Dai XF, Ten Cate AR, Limeback H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine J. Arch Oral Biol, 1991, 36(10):775-778.
- 8] Nagata K, Huang YH, Ohsaki Y, et al. Demonstration of type collagen in the dentin of mice J. Matrix, 1992, 12(6):448-455.
- 9] Waltimo J, Risteli L, Risteli J, et al. Altered collagen expression in human dentin: Increased reactivity of type I and presence of type VI in dentinogenesis imperfecta, as revealed by immunoelectron microscopy J. J Histochem Cytochem, 1994, 42(12):1593-1601.
- 10] Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions J. J Dent Res, 1998, 77(8):1622-1629.
- 11] van Strijp AJ, van Steenberghe TJM, ten Cate JM, et al. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ J. Caries Res, 1997, 31(5):349-355.

(本文编辑 汤亚玲)

## 第七届国际口腔磁性附着体专题研讨会征文通知

经中华口腔医学会批准,第七届国际口腔磁性附着体专题研讨会将于2004年10月25日至10月26日在上海光大国际会展中心召开。会议由中华口腔医学会口腔修复学科专业委员会、中华口腔医学会口腔修复工艺学专业委员会、磁性义齿学国际研究会、日本爱知制钢株式会社共同主办,由上海第二医科大学口腔医学院口腔修复教研室承办。会议由专题报告、论文报告、墙报论文交流、操作演示四部分组成。会议的工作语言为英语,配有中文和日文的同声翻译。大会组委会将邀请国内外的专家作专题报告,邀请十三个国家或地区的学者作论文交流和讨论。会议将按国际学术会议惯例授予I级学分。现开始会议论文征集,主要包括:1.磁性固位义齿的临床应用研究。2.磁性固位义齿的基础研究。3.磁性固位的种植义齿临床应用研究和基础研究。4.磁性固位体在老年齿科中的应用。5.磁性固位体在美学修复中的应用。6.磁性固位体研究的新进展、新领域。7.磁性固位义齿的制作技术、经验和体会。欲投稿者,请寄约300字的中文、英文论文摘要各一份,供组委会安排论文报告或墙报交流,以及编辑论文摘要汇编使用。稿件请寄:上海市制造局路639号,上海第二医科大学口腔医学院口腔修复教研室徐肖云收,邮政编码200011,截稿日期:2004年6月15日。对于未打算投稿又希望参加会议者,欢迎光临,请于2004年7月直接按上述地址索要会议通知。

第七届国际口腔磁性附着体专题研讨会大会组委会  
2004年1月3日