

成釉细胞的研究进展

江中明, 吕春堂*, 周中华 (第二军医大学长海医院口腔科, 上海 200433)

[摘要] 成釉细胞是牙器官形成的关键细胞, 国内外已成功离体培养出成釉细胞, 成釉细胞合成和分泌的细胞外基质——釉原蛋白在釉质的形成中起着关键作用。成釉细胞的增殖和分化受到多种因素的调控。本文就成釉细胞的离体培养、釉原蛋白的研究及影响成釉细胞增殖和分化的因素作一综述。

[关键词] 成釉细胞; 细胞培养; 釉原蛋白; 细胞增殖; 细胞分化; 综述文献

[中图分类号] R 780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0105-03

Research on ameloblasts

JIANG Zhong-Ming, Lü Chun-Tang*, ZHOU Zhong-Hua (Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] The ameloblasts are the key cells during odontogenesis, and they have been already cultured *in vitro*. The amelogenin is the extracellular matrix synthesized and secreted by the ameloblasts, and it plays a crucial role during amelogenesis. The multiplication and differentiation of the ameloblasts were controlled by many factors. This article reviews the culture of ameloblasts, the study of amelogenin and the controlling factors of the multiplication and differentiation of the ameloblasts.

[KEY WORDS] ameloblast; cell culture; amelogenin; cell proliferation; cell differentiation; review literature

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1):105-107]

成釉细胞(ameloblast)是上皮来源的惟一能产生硬组织的细胞。研究^[1]表明, 此细胞既能合成和分泌牙釉质基质, 又对这些基质有重吸收和降解作用, 同时也与钙盐的活跃转运有关, 是牙釉质形成的关键细胞。国内外已成功离体培养出成釉细胞, 对釉原蛋白的功能也有新的认识, 影响成釉细胞增殖和分化的因素也逐渐揭示, 这对研究牙器官形成的机制和为“牙再生”组织工程提供种子细胞具有一定的意义。本文对成釉细胞的研究进展作一综述。

1 成釉细胞的离体培养研究

在对成釉细胞的体外培养的研究中, 学者们多采用器官培养的方法^[2,3], 即将成釉器或(和)牙乳头共同培养, 但这种方法难以就单一因素对成釉细胞的影响进行研究。Kukita等^[4]采用消化培养法用不含血清的培养液培养了大鼠的成釉细胞, 但只传了1代, 持续时间限于1个月之内。Tabata等^[5]用无血清培养基对成釉细胞进行原代培养, 光镜下观察, 细胞生长并相连成簇, 形态似上皮细胞, 其中多数细胞呈柱状。他们还对这些成釉细胞进行免疫组化染色, 结果表明, 这些成釉细胞对CK14、c-Met和釉原蛋白(amelogenin, 又叫成釉蛋白)等成釉细胞的特征性蛋白均有表达, 提示培养的成釉细胞与在体的成釉细胞的发育和功能相似。1998年李富明等^[6]以含20%小牛血清的DMEM作为培养液、以明胶作为基质进行大鼠原代成釉细胞离体培养8~10d, 细胞生长连成片状, 并呈较典型的上皮细胞形态, 传至F₂代时以抗釉原蛋白抗体作免疫组化染色, 胞质中有釉原蛋白合成, 扫描电镜观察, 可见细胞有基质分泌, 胞体伸长, 细胞直径约>

10 μm, 他们连续将成釉细胞传到了第5代, 由此认为成釉细胞的生长与基质及培养液的选择有关。高洁等^[7]以含10%的胎牛血清的DMEM作为培养液、以多聚赖氨酸作为基质进行大鼠原代成釉细胞的离体培养, 结果光镜下成釉细胞多呈上皮细胞样成簇生长, 细胞胞体多呈柱状, 同时还有少量散在的梭形细胞; 透射电镜观察, 培养的成釉细胞的细胞核呈椭圆形, 位于细胞中央, 与在体的成釉细胞基本相似。

2 成釉细胞分泌釉原蛋白的研究

釉质的生物矿化是在成釉细胞合成细胞外基质之后开始的。成釉细胞主要的细胞生物学特征是能表达组织特异的基因调控产物, 即特异的细胞外基质釉原蛋白是主要的釉质基质蛋白, 占釉质发育分泌阶段有机基质体积的90%。Inai等^[8]首次运用免疫组化的方法, 证实在大鼠磨牙发育过程中, 前成釉细胞(preameloblast)能分泌釉原蛋白并分布于牙髓腔的成牙本质细胞突等部位, 随后Nanci等^[9]在猫的研究中也得到了类似的结果。Nakamura等^[10]又首次运用免疫细胞化学的方法, 在体内及体外培养小鼠牙胚的研究中, 发现前成釉细胞合成的釉原蛋白与成牙本质细胞结合, 并推测这些结合可能通过受体介导的细胞内吞作用(endocytosis)来实现。李富明等^[11]首次运用抗釉原蛋白抗体, 在人牙胚发育的早期阶段, 发现前成釉细胞合成、分泌釉原蛋白, 这些蛋白同样也分布于

[作者简介] 江中明(1966-), 男(汉族), 博士生, 讲师、主治医师。
E-mail: jiangzhongming-s@163.com

*Corresponding author. Tel: 021-25070596

成牙本质细胞区,并参与基底膜的构成,这些结果进一步支持在不同的物种之间具有相似的成釉过程,并且提示在不同的物种之间釉原蛋白具有某些相似的功能。但对于这些易位分布的釉原蛋白的确切作用还不清楚,Ruch^[12]推测可能对成牙本质细胞分化有诱导作用,由于釉原蛋白向髓腔方向易位分布的时间与成牙本质细胞合成、分泌牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)的开始时间一致,Inai等^[13]提出这些易位分布的釉原蛋白与成牙本质细胞表达DPP的功能有关。

Brookes等^[14]报道,釉原蛋白新生蛋白为不溶性的,相对分子质量为25,存在于釉质表层,分泌之后在蛋白酶的作用下降解,产生一系列小分子可溶性片段(11~13)和极难溶的富含酪氨酸片段(TRAP),最后蛋白酶进一步作用产生更小的片段和氨基酸,从组织中消失。釉原蛋白氨基酸组成在不同物种之间高度保守,提示其功能的重要性。Robinson等^[15]报道,釉原蛋白是一组不均一性、高度保守的釉基质蛋白,发育中的釉基质蛋白90%都是釉原蛋白,其相对分子质量为 $(3\sim 5)\times 10^4$,这些富含脯氨酸的蛋白分泌形成釉质。在成熟阶段,低相对分子质量的釉原蛋白占主导地位,而高相对分子质量者则被蛋白酶降解。随着基质堆积移动,矿化过程一直持续到釉质达到最后的硬度。釉原蛋白是成釉细胞在釉质发育过程中分泌的,而成釉细胞是由内釉上皮细胞(前成釉细胞)分化形成。在釉质发育过程中内釉上皮经过一系列形态学、生物学分化,包括形成托姆斯突、从矮柱状到高柱状、细胞核远离基底膜等,最后达到其终末分化阶段,即成釉细胞。牙上皮分化成有一定功能的成釉细胞是通过特殊的时空方式实现的,它与外胚层间充质分化为成牙本质细胞密切相关。成釉细胞分泌釉质后,在牙本质的诱导下釉质很快进行生物矿化,釉原蛋白可为釉质生物矿化提供所需的必要支架,并且还可控制晶体生长的速度,是釉质生物矿化的关键^[16]。由于釉原蛋白分子与羟基磷灰石晶体有亲和性,使釉原蛋白聚集体在该区域通过相互作用调节着羟基磷灰石晶体的生长,釉原蛋白对晶体的选择性吸附与整个蛋白分子的空间构型有关^[16]。釉原蛋白经成釉细胞分泌后,很快被基质内的蛋白水解酶降解而逐渐失去与晶体吸附的能力,因此釉原蛋白可能只影响表层釉质的矿化,对深层影响较小^[17]。釉原蛋白有调节晶体生长速率的作用,Robinson等^[18]认为釉质晶体生长的控制依赖于一些抑制性蛋白与晶体表面的结合,这些蛋白控制着晶体生长的速度,并保证其大小一致,釉原蛋白即为抑制性蛋白之一。体外实验表明,釉原蛋白能够选择性吸附于合成的磷灰石表面,抑制晶体的进一步生长,而其小分子降解产物则降低了对磷灰石表面的亲和力,使矿物发生沉积,从而控制晶体生长。Brookes等^[14]认为,在分泌阶段,釉原蛋白仅存于釉质表层,调节表层晶体生长,而沉积于深层的矿物生长则可能受釉原蛋白小分子降解产物和非釉原蛋白的控制。在釉质成熟阶段,组织中剩余的釉原蛋白等有机基质完全去除,从而降解了对晶体生长的限制,实现其最终大小和形态。釉原蛋白还有支持晶体生长的作用,釉原蛋白在亲水性C末端微肽被酶降解后,成为以疏水为主的分子,聚集在釉质基质中,构成釉原蛋白网状结构,该网状

结构能够为生长中的晶体提供物理性支架,有助于支持和引导未成熟的晶体沿正确的方向生长。有学者认为,该物理性的支架一直得以维持,为离子和液体分散提供间隙,直到釉质成熟阶段大部分基质降解,晶体能够实现自我支持为止,从而决定了其最终的组织结构,而成熟阶段釉原蛋白的清除则解除了其对晶体生长的抑制,并为晶体生长提供必要的空间^[14,18]。

3 影响成釉细胞增殖和分化的因素

在牙胚成熟阶段,成釉细胞的生长、增殖、分化、凋亡受到多种基因的调控和生长因子的影响。赵书芳等^[19]利用原位杂交、免疫组织化学技术检测SD大鼠牙胚发育不同时期c-myc mRNA转录及蛋白的表达情况,结果显示c-myc mRNA及蛋白的表达在蕾状和帽状期明显,说明c-myc在牙胚发育早期高表达,促进细胞增殖;钟状期的表达明显减弱,钟状期进入成釉细胞的分化阶段,提示c-myc表达下调可能是细胞分化的原因;进入牙体组织形成期,开始时在成釉细胞中表达增强,以后减弱,这可能是开始时细胞尚处于增殖状态,c-myc表达增强,随着基质分泌,成釉器逐渐萎缩,细胞生长需要的生长因子及其他调节因子表达失调,导致细胞凋亡的信号出现,在其他调控基因参与下,此时可能不断通过细胞凋亡,来消除多余、衰老、异常的细胞和星网层等暂时性结构,说明c-myc基因时牙齿发育过程的重要调控基因之一。

同源异型盒基因为一大家族细胞核内转录因子,编码在胚胎发育过程中发挥重要作用的转录调节蛋白,Msx-1为其主要成员之一,在多种组织中表达主要集中于发育的早期阶段,与组织、器官空间位置的确定和形态形成密切相关^[20]。采用原位杂交研究证实,Msx-1转录主要发生于牙齿硬组织形成早期阶段,即成釉细胞和成牙本质细胞的极化和分泌阶段,提示Msx-1可能参与了小鼠牙胚硬组织形成过程中细胞分化和生物矿化^[21]。应用免疫组化证实,成釉细胞核中AP-1蛋白家族阶段特异性的出现与牙釉质形成关系密切^[22]。信号蛋白Fisp12/CTGF在牙形成中表达限定在特殊的时间和位点,受上皮-间充质交互作用和关键性可溶性因子(TGF- β 1、BMP-2)的调节,是成釉细胞和成牙本质细胞增殖和分化的必要因素^[23]。转录因子Cbf1与功能重要区的釉原蛋白启动子交互作用,在釉原蛋白基因转录中发挥重要作用^[24]。

目前认为生长因子在介导成釉上皮细胞和牙乳头间充质之间的相互作用方面起着重要的作用,其中成纤维细胞生长因子(FGF)家族和TGF- β 家族的作用尤其引人注目。Coin等^[25]认为TGF- β 1、BMP-2结合肝素诱导成釉细胞的细胞分化,IL-7维持成釉细胞的极化状态,TGF- β 可能在成釉细胞分化中起着关键作用。Tanikawa等^[26]用免疫组织化学的方法在鼠磨牙的前成釉细胞和牙髓未分化的间充质细胞中检测到磷脂酶C、表皮生长因子(EGF)、血小板衍化生长因子(PDGF)、FGF的受体,提示这几种因子在成釉细胞的分化中起作用,且控制着成釉细胞的前分泌和分泌功能。Otsuji等^[27]检测到鼠的前成釉细胞、釉上皮、成釉细胞存在

γ干扰素及粒细胞集落刺激因子的受体,认为这两种因子在釉质的形成过程中起作用。

Nishikawa^[28]用核素标记和电镜观察,秋水仙碱注射8h后,小鼠切牙成釉细胞分泌的成熟带可见细胞凋亡现象,他还通过免疫组化和Western印迹分析,在分泌、过渡和成熟的成釉细胞和覆盖釉上皮中发现Fas,说明秋水仙碱可能激发成釉细胞的凋亡,Fas受体可能是成釉细胞凋亡的介质。

总之,成釉细胞的研究目前主要集中在大鼠和人,对不同动物成釉细胞的离体培养,成釉细胞生长、增殖、分化、凋亡的调控机制以及釉原蛋白的分泌及其功能有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] Sasaki T, Takagi M, Yanagisawa T, et al. Structure and function of secretory ameloblasts in enamel formation [J]. *Ciba Found Symp*, 1997, 205(1): 32-50.
- [2] Baba T, Terashima T, Oida S, et al. Determination of enamel protein synthesized by recombined mouse molar tooth germs in organ culture [J]. *Arch Oral Biol*, 1996, 41(2): 215-219.
- [3] Schmitt R, Lesot H, Vonesch JL, et al. Mouse odontogenesis *in vitro*; the cap-stage mesenchyme controls individual molar crown morphogenesis [J]. *Int J Dev Biol*, 1999, 43(3): 255-260.
- [4] Kukita A, Harada H, Kukita T, et al. Primary and secondary culture of rat ameloblasts in serum-free medium [J]. *Calcif Tissue Int*, 1992, 51(5): 393-398.
- [5] Tabata MJ, Matsumura T, Liu JG, et al. Expression of cytokeration 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both *in vivo* and *in vitro* [J]. *Arch Oral Biol*, 1996, 41(11): 1019-1027.
- [6] 李富明, 史俊南, 杨红梅, 等. 大鼠成釉细胞离体培养研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1998, 8(1): 46-48.
Li FM, Shi JN, Yang HM, et al. Culture of rat ameloblasts using gelatin as substrate [J]. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi (Chin J Conservat Dentist)*, 1998, 8(1): 46-48.
- [7] 高洁, 田立坤, 刘冬娟, 等. 大鼠成釉细胞的原代培养和光、电镜观察 [J]. 口腔医学杂志, 2002, 22(2): 62-63.
- [8] Inai T, KuKita T, Ohsaki Y, et al. Immunohistochemical demonstration of amelogenin penetration toward the dental pulp in the early stages of ameloblast development in rat molar tooth germs [J]. *Anat Rec*, 1991, 229(2): 259-270.
- [9] Nanci A, Mckee MD, Smith CE. Immunolocalization of enamel proteins during amelogenesis in the cat [J]. *Anat Rec*, 1992, 233(3): 335-349.
- [10] Nakamura M, Bringas P, Nanci A. Translocation of enamel proteins from inner enamel epithelia to odontoblasts during mouse tooth development [J]. *Anat Rec*, 1994, 238(3): 383-396.
- [11] 李富明, 史俊南. 釉原蛋白在人牙胚发育不同时期表达的免疫组化研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1998, 8(1): 43-45.
Li FM, Shi JN. Immunolocalization of amelogenins expressed at different developmental stages in human tooth germ [J]. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi (Chin J Conservat Dentist)*, 1998, 8(1): 43-45.
- [12] Ruch JV. Determinisms of odontogenesis [J]. *Revis Biol Cellular*, 1987, 14: 1-99.
- [13] Inai T, Nagata K, Kukita T, et al. Demonstration of amelogenin in the enamel-free cusps of rat molar tooth germs; immunofluorescent and immunoelectron microscopic studies [J]. *Anat Rec*, 1992, 233(4): 588-595.
- [14] Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, et al. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel [J]. *Arch Oral Biol*, 1995, 40(1): 1-14.
- [15] Robinson C, Kirkham J, Briggs HD, et al. Enamel proteins; from secretion to maturation [J]. *J Dent Res*, 1982, 61(2): 1490-1496.
- [16] Gibson CW. Regulation of amelogenin gene expression [J]. *Cri Rev Eukaryot Gene Expr*, 1999, 9(1): 45-57.
- [17] Yuan ZA, Collier PM, Robinsenbloom J, et al. Analysis of amelogenin mRNA during bovine tooth development [J]. *Arch Oral Biol*, 1996, 41(42): 205-212.
- [18] Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, et al. The developing enamel matrix nature and function [J]. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106(Suppl): 282-291.
- [19] 赵书芳, 赵皿, 金岩, 等. 牙齿发育中 c-myc mRNA 转录及蛋白表达的意义 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1999, 9(1): 61-62.
Zhao SF, Zhao M, Jin Y, et al. Expression of c-myc mRNA and c-myc protein in the tooth development [J]. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi (Chin J Conservat Dentist)*, 1999, 9(1): 61-62.
- [20] Thomas BL, Tucker AS, Ferguson C, et al. Molecular control of odontogenic patterning; Positional dependent initiation and morphogenesis [J]. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106(Suppl 1): 44-47.
- [21] 王颖莉, 王嘉德, 高岩, 等. 同源异型盒基因 Msx-1 在小鼠牙齿发育生物矿化过程中的表达研究 [J]. 现代口腔医学杂志, 2001, 15(2): 97-99.
Wang YL, Wang JD, Gao Y, et al. Developmental expression of homeobox gene Msx-1 during the cell differentiation and biomineralization of mouse teeth [J]. *Xiandai Kouqiang Yixue Zazhi (J Modern Stomatol)*, 2001, 15(2): 97-99.
- [22] Nishikawa S. Localization of transcription factor AP-1 family proteins in ameloblast nuclei of the rat incisor [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(11): 1511-1520.
- [23] Shimo T, Wu C, Billings PC, et al. Expression, gene regulation, and roles of Fisp12/CTGF in developing tooth germs [J]. *Dev Dyn*, 2002, 224(3): 267-278.
- [24] Dhamija S, Krebsbach PH. Role of Cbfa1 in ameloblastin gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 35159-35164.
- [25] Coin R, Haikel Y, Ruch JV. Effects of apatite, transforming growth factor beta-1, bone morphogenetic protein-2 and interleukin-7 on ameloblast differentiation *in vitro* [J]. *Eur J Oral Sci*, 1999, 107(6): 487-495.
- [26] Tanikawa Y, Bawden JW. The immunohistochemical localization of phospholipase C gamma and the epidermal growth-factor, platelet-derived growth-factor and fibroblast growth-factor receptors in the cells of the rat molar enamel organ during early amelogenesis [J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(9): 771-780.
- [27] Otsuji W, Tanase S, Yoshida S, et al. The immunohistochemical localization of the interferon-gamma and granulocyte colony-stimulating factor receptors during early amelogenesis in rat molars [J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(2): 173-181.
- [28] Nishikawa S. Colchicine-induced apoptosis and anti-Fas localization in rat-incisor ameloblasts [J]. *Anat Sci Int*, 2002, 77(3): 175-181.

【收稿日期】 2003-05-08

【修回日期】 2003-11-19

【本文编辑】 曹静