

# 解离的小鼠牙胚上皮细胞在重聚发育过程仍维持牙齿发育基因的表达

胡雪峰, 林陈胜, 王冰梅, 韩萍萍, 张彦定

福建师范大学生命科学学院 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350108

**摘要:** 为了解牙胚细胞解离重聚过程的细胞形态和分子机制, 将小鼠帽状期牙胚解离细胞重聚, 移植到小鼠肾囊膜下培养, 组织切片, HE 染色, 观察再生牙齿的形态发生过程, 并用原位杂交的方法进一步检测了与牙上皮发育密切相关的基因在再生牙上皮中的表达情况。结果发现, 解离重聚的牙胚细胞在牙齿器官的再生过程重现了正常牙齿的形态发生过程; 解离的牙上皮细胞在重聚和再生过程中保持 *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 等牙上皮发育基因表达。以上结果表明, 即便是被解离形成分散状态的牙上皮细胞, 在与牙胚间充质细胞重新聚合后, 仍保持牙向分化的潜能。该结果为理解牙齿再生的机理提供新的实验数据, 对利用干细胞进行牙齿再生的研究有重要的提示意义。

**关键词:** 牙齿再生, 细胞重聚, 牙上皮, 基因表达

## Dissociated mouse tooth germ epithelial cells retain the expression of tooth developmental genes during reaggregation process

Xuefeng Hu, Chensheng Lin, Bingmei Wang, Pingping Han, and Yanding Zhang

Key Laboratory of Developmental and Neuro Biology of Fujian Province, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

**Abstract:** Generation of bio-engineered teeth by using stem cells will be a major approach for bioengineered implantation. Previous studies have demonstrated that dissociated tooth germ cells are capable of generating a tooth after reaggregation *in vitro*. However, the cellular and molecular mechanisms underlying this tooth regeneration are not clear. In this study, we dispersed E13.5 molar germ into single cells, immediately reaggregated them into cell pellet, then grafted the reaggregates under mouse kidney capsule for various times of culture. We investigated the morphogenesis and the expression of several developmental genes in dental epithelial cells in reaggregates of tooth germ cells. We found that dissociated tooth germ cells, after reaggregation, recapitulated normal tooth developmental process. In addition, dissociated dental epithelial cells retained the expression of *Fgf8*, *Noggin*, and *Shh* during reaggregation and tooth regeneration processes. Our results demonstrated that, despite of under dissociated status, dental epithelial cells maintained their odontogenic fate after re-aggregation with dental mesenchymal cells. These results provided important information for future *in vitro* generation of bio-engineered teeth from stem cells.

**Received:** July 14, 2010; **Accepted:** September 2, 2010

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB944802), National Natural Science Foundation of China (No. 30771132), Fujian Natural Science Foundation (No. 2010J01143), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20093503110001).

**Corresponding author:** Yanding Zhang. Tel: +86-591-22868218; Fax: +86-591-22868199; E-mail: ydzhang@fjnu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB944802), 国家自然科学基金 (No. 30771132), 福建省自然科学基金 (No. 2010J01143), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20093503110001) 资助。

**Keywords:** tooth regeneration, reaggregation, dental epithelium, gene expression

在组织工程研究领域中, 牙齿再生技术的建立已经成为该领域引人注目的发展方向<sup>[1-6]</sup>。有关牙齿再生的研究已有多年的尝试。将兔子切牙牙胚的上皮和间充质打散后, 植入到鸡胚的尿囊绒毛膜上培养, 这些分散的细胞可以重新聚集起来, 形成发育良好的牙齿结构<sup>[7]</sup>。在大鼠中, 将打散的牙胚组织植入到皮下, 也能得到同样的结果<sup>[8]</sup>。在由组织工程支架材料 PLGA (poly-L-lactate-co-glycolate) 或 PGA/PLLA (Polyglycolate/poly-L-lactate) 构成的牙型支架中, 植入打散猪胚磨牙牙胚或大鼠的磨牙牙胚, 均能形成牙齿的结构<sup>[6,9-12]</sup>。我们的研究工作也证实了, 在具有诱导牙齿发育能力的 E13.5 (E: 胚龄发育天数) 的小鼠牙胚间充质中, 尽管已经出现基因表达的不对称性和明显的组织形态结构, 但将其打散重聚后仍具有诱导牙齿发育能力<sup>[13]</sup>。因此, 如果能启动与诱导牙齿发育过程有关的基因表达谱和信号通路, 细胞可以自发地聚集并形成特定的牙齿结构。牙齿发育的这一特性对利用干细胞进行牙齿再生有重要的意义。然而, 目前对重聚成牙过程中所发生的细胞形态变化以及其分子机制所知甚少。本研究探讨了牙胚细胞在重聚成牙中的组织形态的发生过程以及牙胚上皮细胞是否维持其牙向分化的潜能。为此, 我们检查了重聚牙齿发育过程的形态学变化, 并进一步检测了相关的牙上皮发育基因的表达。结果证实, 即使在解离的状态下, 牙胚的上皮细胞仍保持其发育基因的表达和牙向分化的潜能。这一结果对利用干细胞进行组织工程牙齿

制备的研究有重要的提示意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

所用小鼠购自福建医科大学实验动物中心, 由本实验室饲养。将 12 周龄雄性昆明鼠与 10 周龄雌性昆明鼠合笼交配, 每日早晨检查, 以发现阴道栓之时起记为 E0.5。将孕鼠断颈处死, 消毒外腹部后, 取不同发育时期的胚胎, 将 E13.5 的鼠胚分离下颌置于 PBS 中, E13.5 和 E14.5 及出生 3 d 的小鼠头部置于 4% 多聚甲醛中, 4℃ 固定 24 h 后包埋, 按常规组织切片, 厚度为 10 μm, HE 染色。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 牙胚组织的体外重聚

如图 1 所示, 取 E13.5 的小鼠磨牙牙胚, 用 0.125% 的胰蛋白酶在 37℃ 消化 5 min, 用窄口长颈玻璃吸管将消化后牙胚反复吹打, 直至在显微镜下观察形成单细胞悬液。将单细胞悬液以每  $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$  个细胞为 1 份, 分配到几个无菌 EP 管中; 3 000 r/min 室温下离心 3 min, 使牙胚细胞重聚形成细胞团块。吸弃上清, 加入 0.5 mL 细胞培养液, 于 37℃ 培养 1 h。用阔口长颈玻璃吸管将重聚的牙胚小心吸出, 滴加到 Trowell 器官培养皿内覆盖有微孔滤膜的不锈钢培养支架上, 添加细胞培养液到淹没重聚牙胚的 1/3, 将培养皿外槽内加 2 mL PBS, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 16~18 h。

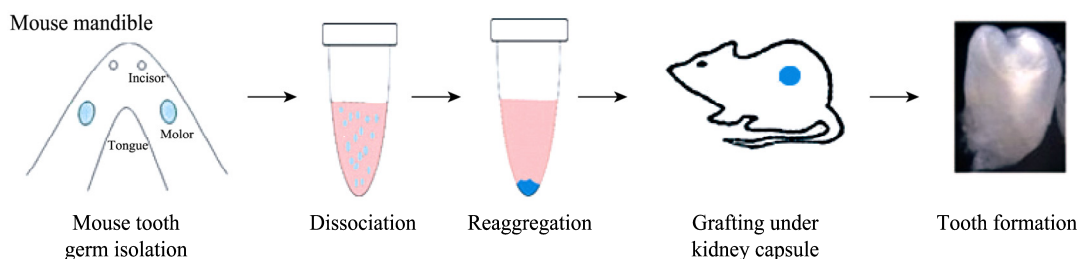


图 1 利用解离的牙胚细胞重聚再生牙齿过程示意图

Fig. 1 Schematic diagram showing generation of tooth from dissociated tooth germ cells after reaggregation and grafting under mouse kidney capsule. The mouse tooth germ is isolated from mandible, and dissociated into single cells. Then, the single cell suspension is reaggregated into cell pellets, and grafting under mouse kidney capsule. Tooth is formed 2-3 weeks after transplantation.

### 1.2.2 重聚牙胚的体内移植

用 400  $\mu\text{L}$  麻醉剂进行腹腔注射以麻醉昆明小鼠, 切开腰背部皮肤, 暴露肾脏后, 用显微外科镊轻轻挑起肾囊膜, 并用钝头玻璃针分离肾囊膜与肾脏; 将培养的重聚牙胚用窄口长颈玻璃吸管转移到昆明小鼠肾脏表面, 并用钝头玻璃针轻轻将其推入分离的肾囊膜下 (以每只裸鼠接受 2~3 个移植块为准), 缝合创口。移植 3 d、6 d、8 d 和 14 d 后, 将昆明小鼠处死, 取移植块, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  下用脱钙液脱钙, 然后进行脱水、包埋、组织切片 (切片厚度 10  $\mu\text{m}$ )。用 HE 法对 4 d、8 d 和 14 d 的移植块进行形态观察, 同时用原位杂交的方法对 3 d 和 6 d 的移植块进行基因表达分析 (图 1)。

### 1.2.3 RNA 反义探针制备

用 *Not* I、*Sma* I、*Hind* III 将带有 *Noggin*、*Fgf8*、*Shh* 基因特异性片段的质粒线性化, 用胶回收试剂盒纯化后, 以线性化质粒为模板、T3 或 T7 聚合酶合成反义 RNA 探针。反应体系为: T7/T3 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , T7/T3 buffer 1  $\mu\text{L}$ , Dig RNA labeling mix 2  $\mu\text{L}$ , RNase inhibitor 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 900 ng, 加去 RNase 水至 20  $\mu\text{L}$  体系。36 $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h, 加无水乙醇 75  $\mu\text{L}$ , 8 mol/L LiCl 1.3  $\mu\text{L}$ , -80 $^{\circ}\text{C}$  沉淀 1.5 h 后 15 000 r/min 离心 15 min, 75% 乙醇洗涤, 50  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解。

### 1.2.4 原位杂交

参照 Zhang 等<sup>[14]</sup>的实验方法, 取组织块切片在梯度酒精 (100%、90%、70%、50%、35%) 复水, 蛋白酶 K (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 消化 1 min, 将其乙酰化后用梯度酒精脱水; 每片加入 110  $\mu\text{L}$  含有探针 (2 ng/ $\mu\text{L}$ ) 的杂交液, 60 $^{\circ}\text{C}$  杂交反应 16 h。杂交后, 经 5 $\times$  SSC 漂洗 3 次, 每次 15 min, 含 50% Formamide 的 2 $\times$  SSC 漂洗 2 次, 每次 15 min, NTE (含有 20 mg/mL RNase A 和 1  $\mu\text{L}$  RNase T1) 中酶解 30 min, 2 $\times$  SSC 漂洗 10 min, 0.1 $\times$  SSC 漂洗 2 次, 每次 5 min。用含有牛血清白蛋白的 2% 封闭液预封闭 1 h, 加入 200  $\mu\text{L}$  含 0.2  $\mu\text{L}$  抗 DiG 抗体 2% 封闭液, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用 NTMT 1 h $\times$ 8 洗去多余探针, 最后 NTMT (加左旋咪唑至终浓度为 2 mmol/L) 室温过夜。每张切片加 400  $\mu\text{L}$  BM Purple 碱性磷酸酶底物, 避光放置于 4 $^{\circ}\text{C}$  显色, 脱水, 透明、中性树脂封片, 拍照。

## 2 结果

### 2.1 重聚牙胚的发育再现了正常牙齿发育的过程

小鼠牙胚发育到 E14.5 时, 牙上皮外周的细胞增殖速度比牙蕾中心部位的细胞增殖速度快, 因此外周部位的细胞突起深入间充质, 并包围间充质, 形成帽状结构, 称为帽状期。同时, 牙胚间充质细胞迅速增殖凝聚成细胞团状的牙乳头 (图 2A), 打散重聚的牙胚牙上皮细胞自发地与牙间充质细胞分离开来, 聚合形成牙上皮组织, 然后重新启动牙齿发育, 移植 4 d 后的重聚牙胚形态与 E14.5 的牙齿形态相似, 其上皮细胞外周增殖快, 包围间充质形成帽子结构, 间充质细胞也迅速增殖凝聚形成牙乳头 (图 2D)。正常小鼠牙胚发育到 E17.5, 牙上皮凹陷更深, 其两边继续生长, 形成钟状结构, 称为钟状期。此时的上皮细胞分化形成外釉上皮、星网层和内釉上皮, 其中内釉上皮细胞被拉长成柱状 (图 2B); 移植 8 d 后的重聚牙齿形态与 E17.5 的牙齿形态相似, 发育到钟状期。其上皮细胞分化形成内外釉细胞和星网层, 与牙乳头相临的内釉上皮细胞拉长成柱状 (图 2E)。到了钟状晚期, 内釉上皮分化形成成釉细胞, 分泌牙釉质; 靠近内釉上皮的间充质细胞分化成一层柱状的成牙本质细胞, 分泌形成牙本质 (图 2C)。而移植 14 d 的重聚牙齿最终形成发育良好的牙齿, 可见高柱状的成釉细胞和成牙本质细胞, 能分泌形成牙釉质、牙本质 (图 2F)。再生牙齿的发育过程重现了正常牙齿的发生过程。但是, 重聚牙胚的形态学发生过程因为需要上皮细胞的重新聚集, 与正常牙齿的发育相比明显出现发育的延迟。

### 2.2 重聚牙胚牙上皮表达 *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 基因

小鼠的牙胚发育受上皮-间充质细胞中表达的信号分子的调控, 在发育中的小鼠牙胚中, *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 都是仅在牙上皮特异表达的标志基因, 在牙上皮的分化中起重要作用。在 E13.5 的小鼠牙胚中, *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 在磨牙牙胚的牙上皮表达 (图 3A-C), 而在间充质中几乎没有 *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 的表达。移植 3 d 的重聚牙胚细胞发

生了重排, 间充质细胞与牙上皮细胞发生分离, 牙上皮细胞自发地聚合形成牙上皮组织, 在牙上皮细胞中仍然维持 *Fgf8* 和 *Noggin* 的表达 (图 3D-E); 移植 6 d 的重聚牙胚上皮组织表达 *Shh* (图 3F), 而在

间充质几乎检测不到 *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 的表达 (图 3D-F)。显然, 解离的牙胚上皮细胞在重新发育过程中, 仍能保持牙齿发育基因的表达和牙向分化的潜能。

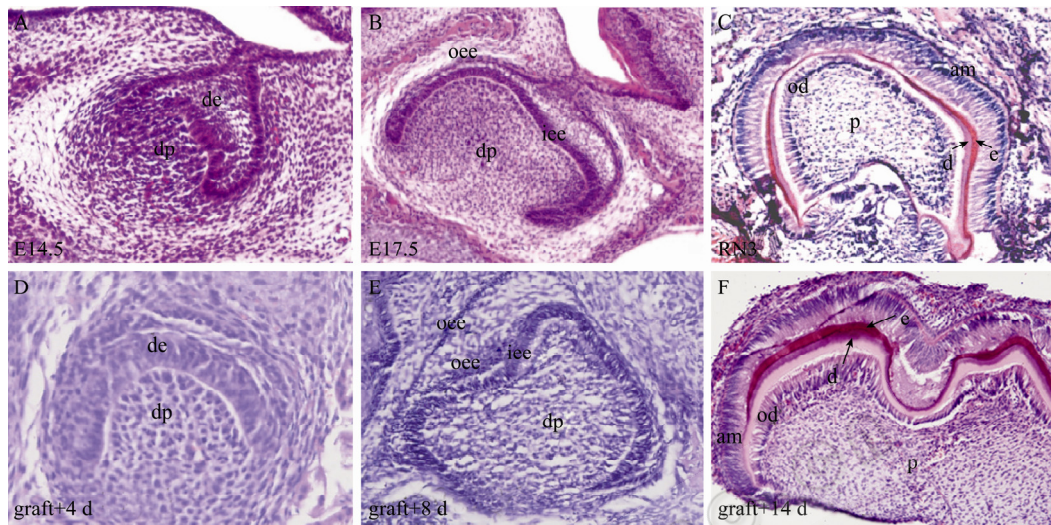


图 2 正常牙胚和重聚牙胚发育过程的组织形态比较观察

Fig. 2 Histological comparison between development of the normal tooth and that of the reaggreated tooth germ after kidney transplantation. (A-C) Developmental process of a molar tooth. (A) The cap stage at E14.5. (B) The bell stage at E17.5. (C) The terminal differentiation stage at PN3. (D-F) Developmental process of a reaggreated tooth germ. (D) The cap stage after 4 days kidney capsule culture. (E) The bell stage after 8 days kidney capsule culture. (F) The terminal differentiation stage after 14 days kidney capsule culture. Abbreviation: d, dentin; e, enamel; p, dental pulp; am, ameloblast; de, dental epithelium; dp, dental pappila; od, odontoblast; pn, postnatal; iee, inner enamel epithelium; oee, outer enamel epithelium.

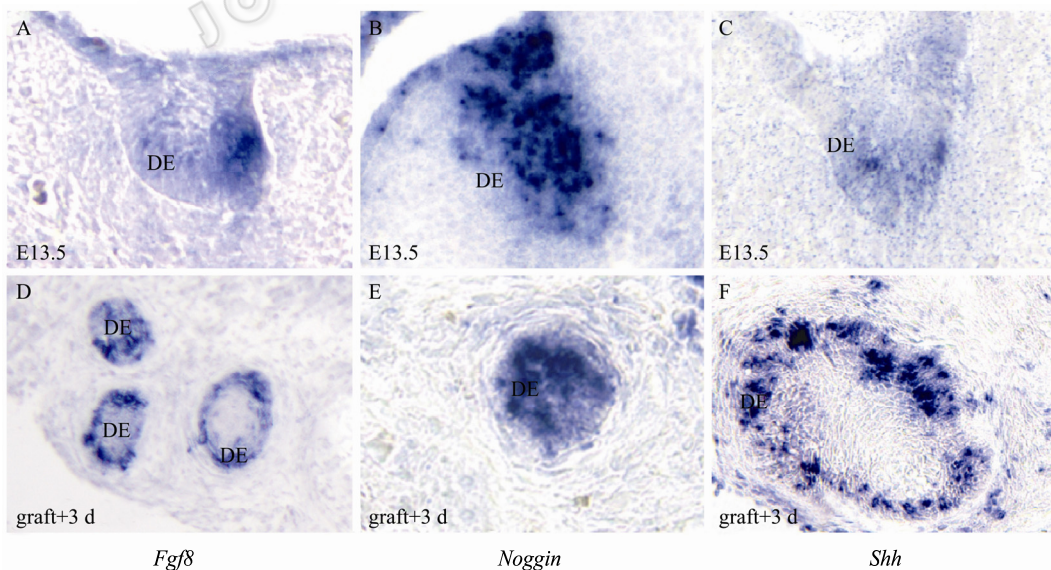


图 3 *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 在正常和重聚牙胚上皮中的表达

Fig. 3 Expression of *Fgf8*, *Noggin*, and *Shh* in the epithelium of normal and reaggreated tooth germs. (A-C) The expression of tooth developmental genes in the dental epithelia of the normal molar tooth germ at the bud stage. (A) Expression of *Fgf8*. (B) Expression of *Noggin*. (C) Expression of *Shh*. (D-F) The expression of tooth developmental genes in the dental epithelia of the reaggreated tooth germ after 3 or 6 days kidney capsule culture. (D) Expression of *Fgf8*. (E) Expression of *Noggin*. (F) Expression of *Shh*. Abbreviation: de, dental epithelium.

### 3 讨论

牙齿的发育与其他器官的发育一样, 上皮组织与间充质之间存在诱导和被诱导的关系。就牙齿发育而言, 作为诱导者, 能诱导相邻组织表达特定基因并指导牙齿发生的组织, 称该组织具有诱导牙齿发育的潜能 (Odontogenic potential)。反之, 能对具有诱导牙齿发育潜能的组织的发育信号起反应, 而被诱导进入牙齿发生过程的组织, 我们称该组织具有牙齿发育的被诱导潜能 (Odontogenic competence)。只有具有诱导牙齿发育潜能的组织存在时, 牙齿的发育才能得以进行。经典的实验胚胎学组织重组实验证明, 诱导牙齿发育潜能先是位于牙上皮, 随后转移到牙间充质。在 E11.5 天时, 将牙上皮与头面部非牙源性的间充质组织重组后, 能发育形成牙齿的结构。因而, 此时牙齿发育的潜能位于牙上皮中。而到了 E12.5 天后, 诱导牙齿发育的潜能则转移到牙胚组织的间充质中, 此时将牙上皮与其他间充质组织重组不能形成牙齿的结构。而牙间充质与非牙上皮组织重组则能诱导该上皮发育形成牙齿的结构<sup>[15-16]</sup>。而且, 哺乳动物的牙胚具备独特的发育性能。将磨牙牙胚组织解离成单细胞, 这些细胞能保持牙向分化的潜能, 重新聚合后, 能重新启动牙齿器官的发育程序, 发育形成组织结构完整的牙齿器官<sup>[13]</sup>。从时间上, 形态学发生过程与正常牙齿的发育明显出现延迟。发育延迟的原因主要是在聚合后牙齿的重新发育过程中, 牙上皮细胞和牙间充质细胞出现了分离和聚合的过程。在聚合的组织块中, 牙上皮细胞自发地与牙间充质细胞分离开来, 聚合形成牙上皮组织, 然后才重新启动牙齿发育的形态学过程, 包括蕾状期、帽状期、钟状期和终末分化期等, 重现了正常的发育过程。本研究进一步支持了领域中的观点, 即再生的过程是重新发育的过程。

*Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 都是牙齿早期发育过程中在牙上皮中表达的基因。FGF8 与牙齿发育过程中牙间充质中 *Bax1*、*Lhx6* 和 *Lhx7* 等多种与模式形成和形态发生密切相关的转录因子的诱导表达有关<sup>[2]</sup>。*Bmp2*、*Bmp4* 和 *Bmp7* 等均在牙上皮和釉节中表达, 调控细胞分裂与凋亡, 决定牙尖的数目形成部位,

即牙齿的模式。*Noggin* 是 BMP 信号的拮抗物, 可以调控 BMP 信号的强度。*SHH* 是牙胚早期不可缺少的生长因子。E13.5 的牙上皮细胞虽然已经失去了诱导牙齿分化的潜能, 但仍保持着牙齿发育的被诱导潜能。我们的研究表明, 这些牙上皮细胞被解离成单细胞, 进而自发重聚成牙上皮后, 仍然表达了牙上皮在牙齿发育过程所表达的基因, 从而导致重现牙齿的正常发育过程, 发育形成牙齿。因此我们推测, 解离的牙上皮细胞在重聚形成牙上皮之前, 即使是被解离的单个细胞, 仍能保持牙向分化所需的牙齿发育基因的表达。E13.5 的牙间充质细胞具有诱导牙齿发育的潜能, 解离的牙上皮细胞之所以能保持牙齿发育基因的表达, 可能是通过与牙间充质细胞的相互作用, 从而维持了牙向分化的潜能。

近年来的研究表明, 在成体的牙组织中存在多种干细胞, 具有牙向分化的潜能, 在特定的诱导条件下能形成牙本质等牙齿组织。但是, 这些干细胞都是间充质源性的, 只能被诱导形成间充质源性的牙组织<sup>[17]</sup>。牙上皮将发育形成成釉质细胞层, 完成釉质分泌后凋亡, 不复存在。因此, 无法分离到牙上皮源性的干细胞。在组织工程牙齿的研究中, 利用皮肤的表皮干细胞, 诱导多潜能干细胞和胚胎干细胞进行牙上皮的诱导分化, 是重要的研究内容之一。我们已有的研究证实, 利用小鼠的牙间充质的诱导牙齿发育的潜能, 可以将人的皮肤表皮干细胞诱导形成可分泌牙釉质的成釉质细胞<sup>[18]</sup>。本研究结果表明, 解离的牙上皮细胞在重聚和再生过程中保持 *Fgf8*、*Noggin* 和 *Shh* 等牙上皮发育基因表达。这一结果提示我们, 在利用干细胞进行组织工程牙齿制备的研究中, 如果能够激活牙向分化基因的表达, 可诱导干细胞的牙向分化, 包括牙上皮的分化。

### REFERENCES

- [1] Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *Microsc Res Tech*, 2003, **60**(5): 469-479.
- [2] Zhang YD, Chen Z, Song YQ, et al. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res*, 2005, **15**(5): 301-316.
- [3] Garcia-Godoy F, Murray PE. Status and potential

- commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. *Stem Cells Dev*, 2006, **15**(6): 881–887.
- [4] Yelick PC, Vacanti JP. Bioengineered teeth from tooth bud cells. *Dent Clin North Am*, 2006, **50**(2): 191–203.
- [5] Yen AH, Sharpe PT. Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 2006, **6**(1): 9–16.
- [6] Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, *et al.* Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res*, 2004, **83**(7): 523–528.
- [7] Slavkin HC, Beierle J, Bavetta LA. Odontogenesis: cell-cell interactions *in vitro*. *Nature*, 1968, **217**(5125): 269–270.
- [8] Orams HJ, Sim FR, Reade PC. An *in vivo* and *in vitro* study of dissociated tooth germs of rats. *Arch Oral Biol*. 1974, **19**(4): 285–291.
- [9] Young CS, Terada S, Vacanti JP, *et al.* Tissue engineering of complex tooth structure on biodegradable polymer scaffold. *J Den Res*, 2002, **81**(10): 695–700.
- [10] Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, *et al.* Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol*, 2005, **68**(2): 89–101.
- [11] Young CS, Abukawa H, Asrican R, *et al.* Tissue engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng*, 2005, **11**(9/10): 1599–1610.
- [12] Young CS, Kim SW, Qin C, *et al.* Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch Oral Biol*, 2005, **50**(2): 259–265.
- [13] Song YQ, Zhang ZY, Yu XY, *et al.* Application of lentivirus-mediated RNAi in studying gene function in mammalian tooth development. *Devl Dyn*, 2006, **235**(5): 1334–1344.
- [14] Zhang YD, Zhao X, Hu YP, *et al.* Msx1 is required for the induction of patched by sonic hedgehog in the mammalian tooth germ. *Dev Dyn*, 1999, **215**(1): 45–53.
- [15] Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Archs Oral Biol*, 1987, **32**(2): 123–127.
- [16] Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development*, 1988, **103**: 155–169.
- [17] Liu H, Gronthos S, Shi ST. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol*, 2006, **419**: 99–113.
- [18] Wang BM, Li LW, Du SR, *et al.* Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. *Dev Biol*, 2010, **344**(2): 795–799.