

氟对大鼠牙胚发育中 survivin 蛋白表达的影响

钟翠翠^{1,2}, 田剑刚², 黄瑞哲², 齐红², 邓转云²

(1.山东省阳谷县人民医院 口腔科, 山东 阳谷 252300;

2.西安交通大学医学院附属口腔医院 预防科,

陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室, 陕西 西安 710004)

[摘要] 目的:观察 survivin 蛋白在氟中毒 SD 大鼠牙胚发育过程中的表达,探讨氟对 survivin 蛋白表达的影响,进一步探讨氟斑牙的发病机制。方法:取妊娠 10 d 孕鼠 45 只,随机分为对照组、实验 1 组和实验 2 组,饮水中含氟浓度分别为 0、50、150 mg/L。每组分别在 E18.5 d(妊娠 18.5 d)、E20.5 d、P1.5 d(出生后 1.5 d)、P3.5 d、P5.5 d 时取材、固定、包埋,选择 P1.5 d 标本做 H-E 染色。应用免疫组织化学 SABC 法对每组切片染色。利用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统(A)进行图像采集。采用 SPSS 13.0 软件包对数据进行单因素方差分析。结果:在牙胚发育的不同时期,各组 survivin 蛋白的表达均呈“M”形变化趋势。E18.5d 组 $F=1.050, P>0.05$;E20.5 d 组 $F=2.232, P>0.05$, 各组间差异无显著性;P1.5 d 组 $F=3.538, P<0.05$, P3.5 d 组 $F=3.820, P<0.05$, P5.5 d 组 $F=5.096, P<0.05$ 。实验组与对照组 survivin 的表达有显著差异。新生鼠各组经 SNK 法比较,对照组与实验 1 组之间的 survivin 表达差异无显著性($P>0.05$);对照组与实验 2 组之间的差异有显著性($P<0.05$)。结论:氟使新生鼠 survivin 蛋白表达量减少,且氟浓度越高,这种抑制作用越明显,可能是氟牙症发生的一条途径。

[关键词] Survivin 蛋白;大鼠;氟;牙胚发育

[中图分类号] R780.1

[文献标志码] A

DOI: 10.19439/j.sjos.2017.03.004

Effects of fluoride on expression of survivin during rats' dental germ development ZHONG Cui-cui^{1,2}, TIAN Jian-gang², HUANG Rui-zhe², QI Hong², DENG Zhuan-yun². (1.Department of Stomatology, People's Hospital of Yanggu City, Yanggu 252300, Shandong Province; 2.Department of Preventive Dentistry, Stomatological Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University; Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research. Xi'an 710004, Shaanxi Province, China)

[Abstract] PURPOSE: This study was to investigate the expression of survivin in dental germ development of SD rats with fluorosis, and explore the effects of fluoride on survivin expression and the pathogenic mechanism of dental fluorosis. **METHODS:** Forty-five SD rats (pregnant for 10 days) were randomly divided into control group, experimental group 1 and group 2. Drinking water with fluoride concentration of 0, 50, 150 mg/L was provided for rats accordingly. The samples were collected at E18.5th day, E20.5th day, P1.5th day, P3.5th day and P5.5th day, then the samples of P1.5th day were selected for H-E staining. SABC method was used for immunohistochemical analysis of samples in each group. The images were acquired by Motic Med 6.0 digital medical image analysis system, and the data were analyzed for ANOVA with SPSS 13.0 software package. **RESULTS:** Survivin expression fluctuated and exhibited 'M' shape (rose first and fell later) in each group. There was no significant difference at E18.5th day ($F=1.050, P>0.05$) and E20.5th day ($F=2.232, P>0.05$) between each group. There were significant differences at P1.5th day ($F=3.538, P<0.05$), P 3.5th day ($F=3.820, P<0.05$) and P5.5th day ($F=5.096, P<0.05$) between the control and experimental groups. The postnatal rats in each group were evaluated by SNK method for surviving expression. There was no significant difference between control group and experimental group 1 ($P>0.05$). However, there was significant difference between control group and experimental group 2 ($P<0.05$). **CONCLUSIONS:** The results suggest that fluoride can decrease the expression of survivin in the postnatal rats

[收稿日期] 2016-12-12; [修回日期] 2017-01-04

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2003K10-G22)

[作者简介] 钟翠翠(1981-),女,硕士,主治医师,

E-mail: zheicui@xjtu@163.com

[通信作者] 黄瑞哲, Fax: 029-87273400, E-mail: huangrz@mail.xjtu.edu.cn

©2017 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

with higher fluoride concentration, which may be the mechanism in the development of dental fluorosis.

[Key words] Survivin; SD rat; Fluorosis; Tooth development
Shanghai J Stomatol,2017,26(3):254-257.

氟牙症是牙在发育期间机体摄入过量的氟而引起的一系列形态、结构、功能改变的疾病,临床上分为白垩型、着色型和缺损型^[1]。目前尚无理想的修复方法,影响患者的生活质量。Survivin 蛋白是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族中的一个新成员,是目前作用最强的凋亡抑制基因,还有促细胞增殖、促进毛细血管网形成和内皮细胞增生的功能^[2]。本课题通过建立饮水型氟牙症大鼠模型,采用免疫组织化学方法观察氟对成釉细胞中 survivin 表达的影响,从细胞分子水平探讨氟斑牙的发病机制,为其防治提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择健康、12 周龄,体重(250±10)g 的雌性 SD 大鼠 45 只用于实验。另选用健康、12 周龄,体重(250±10)g 的雄性 SD 大鼠 23 只用于与雌鼠交配。所有动物均购自第四军医大学实验动物中心。

1.2 实验试剂

氟化钠溶液:在电子分析天平上准确称取 NaF 5526.32 mg,溶解后定容至 500 mL 容量瓶中。使用时分别稀释至工作浓度 50 mg/L、150 mg/L 的氟化水,对照组用去离子水(0 mg/L 氟)。Survivin 蛋白多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司(北京中杉金桥生物公司分装),免疫组织化学试剂盒及 DAB 显色液购于武汉博士德试剂公司。

1.3 氟斑牙动物模型的建立及取材

将所购买的 45 只雌鼠和 23 只雄鼠,在发情期以雌:雄=2:1 的比例于晚 8:00 同笼。次日晨 6:00 取出雄鼠,观察雌鼠受孕情况。采用精子涂片法检查。将受孕的雌鼠随机分为 3 组,对照组、实验 1 组和实验 2 组。3 组根据取材时间再分为妊娠 18.5d (E18.5d)、妊娠 20.5d(E20.5d),出生后 1.5 d(P1.5 d)、出生后 3.5 d(P3.5 d)、出生后 5.5 d(P5.5 d)组。每组 3 只大鼠。实验 1 组和实验 2 组在妊娠第 10 天分别饲以氟浓度为 50、150 mg/L 的水。取材时分离出胎鼠及新生鼠的下颌骨,将两侧第一磨牙牙胚部位以后的下颌体及下颌支去除,置于 4%多聚甲醛溶液中固定过夜,脱水、浸蜡、包埋、连续 5 μm 切片。

1.4 免疫组织化学染色

将切片脱蜡至水,在微波炉内进行热抗原修复后,浸入新鲜配制的 3% H₂O₂。室温放置 10 min,蒸馏水冲洗,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)浸泡 5 min,正常山羊血清室温封闭 20 min,滴加一抗(1:300),4℃过夜;恢复室温后,PBS 漂洗,滴加生物素标记二抗,37℃孵育 15 min,PBS 漂洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素,37℃孵育 15 min,PBS 漂洗;DAB 显色苏木精轻度复染胞核,梯度乙醇脱水,二甲苯透明中性树胶封片。以上步骤除封闭后不清洗外,均用 0.01 mol/L PBS 洗 5 min,共 3 次。阳性对照用人胃癌组织切片,空白对照以 PBS 代替一抗。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件包对数据进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 各组动物一般情况观察

对照组雌鼠行动灵敏,对外界刺激反应迅速;毛色纯白而富有光泽,无脱落现象;饮水量平均每只 1 d 约 40 mL,饮食量平均每只 1 d 约 20 g 饲料;中切牙唇面色黄而有光泽。

实验 1 组雌鼠情况与对照组基本相同,但在无外界刺激的情况下,较对照组略显躁动不安,易产生攻击性,出现过母鼠咬死新出生子鼠的现象。中切牙唇面与对照组相似。

实验 2 组雌鼠行动迟缓,对外界刺激反应呆滞;背部毛末端色略呈淡黄,无光泽,更换垫料时可见较多脱落的毛发;饮水量平均每只 1 d 约 25 mL,饮食量每只一天约 15 g。中切牙唇面与对照组相似。

2.2 各组光镜检查结果

对照组在 P3.5 d 时成釉细胞胞质 survivin 染色阳性,成牙本质细胞胞质黄染,呈强阳性;中间层、牙乳头细胞、外釉上皮细胞染色阳性,其他层细胞染色弱阳性(图 1A)。到 P5.5 d 时,成釉细胞、成牙本质细胞、牙乳头细胞胞质染色阳性,其他层细胞染色弱阳性(图 1B)。

实验 1 组在 P3.5 d 和 P5.5 d 时成釉细胞间隙增大,局部有扭曲现象;成釉细胞胞质黄染较对照组

有所减弱,但仍比实验2组染色程度略深(图2)。

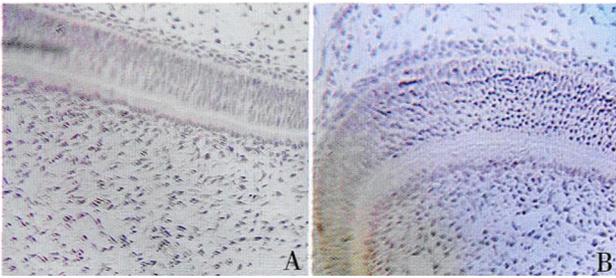


图1.对照组 P3.5 d(A)和 P5.5 d(B)牙胚 survivin 的表达(SABC 染色,10×40)

Figure 1. Expression of survivin in the control group at P3.5 d (A) and P5.5 d(B)(SABC, 10×40)

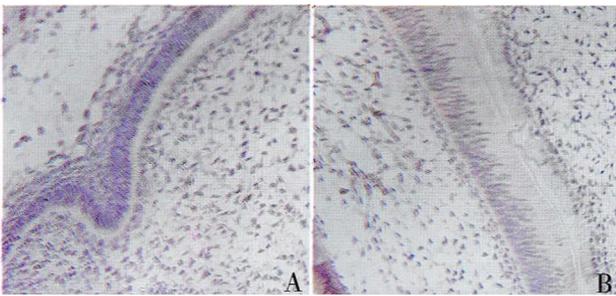


图2.实验1组 P3.5 d(A)和 P5.5 d(B)牙胚 survivin 的表达(SABC 染色,10×40)

Figure 2. Expression of survivin in experimental group 1 at P3.5 d (A) and P5.5 d(B) of dental germ(SABC, 10×40)

实验2组在 P3.5 d 和 P5.5 d 时成釉细胞排列不整齐,间隙增大明显,囊泡变大,成釉细胞胞质黄染较对照组明显减弱,与阳性对照相比呈弱阳性(图3)。

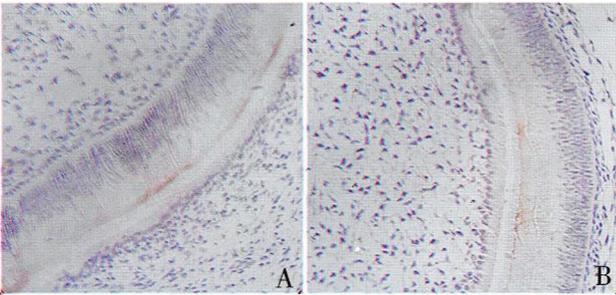


图3.实验2组 P3.5 d(A)和 P5.5 d(B)牙胚 survivin 的表达(SABC 染色,10×40)

Figure 3. Expression of survivin in experimental group 2 at P3.5 d (A) and P5.5 d(B)(SABC, 10×40)

2.3 实验组与对照组免疫组织化学染色结果

结果见图4和表1。由图4可见,在牙胚发育过程中,3个组的平均灰度值表达均呈由低变高再变低再变高的“M”形趋势,代表3组 survivin 的表达量呈“M”形的变化趋势。除 E18.5 d 组外,其他4组均是对照组的表达量高于实验1组,也高于实验2组,而且实验2组的表达在同一发育时期最低。

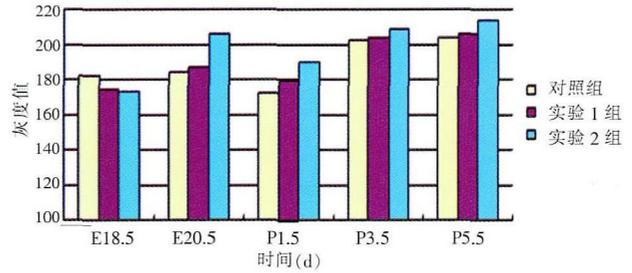


图4.各组牙胚 survivin 蛋白表达平均灰度值柱状图

Figure 4. Histogram showing the average gray values of survivin expression in dental germ of each group

表1.各组牙胚中 survivin 蛋白表达的灰度值分析

Table 1. Gray value analysis of survivin expression in dental germ of each group

| 时间(d) | 对照组 | 实验1组 | 实验2组 |
|-------|--------|--------|--------|
| E18.5 | 181.80 | 174.16 | 172.82 |
| E20.5 | 184.07 | 186.71 | 206.23 |
| P1.5 | 171.93 | 179.75 | 189.99 |
| P3.5 | 202.12 | 204.10 | 208.46 |
| P5.5 | 204.14 | 205.68 | 213.67 |

由单因素方差分析得出,E18.5 d 组 $F=1.05, P>0.05$, 各组间无显著差异;E20.5 d 组 $F=2.23, P>0.05$, 各组间差异无显著性。经检验,P1.5 d 组 $F=3.538, P<0.05$, 实验组与对照组 survivin 的表达显著不同;P3.5 d 组 $F=3.82, P<0.05$, 实验组与对照组 survivin 的表达差异显著;P5.5 d 组 $F=5.10, P<0.05$, 实验组与对照组 survivin 的表达差异显著。新生鼠各组经 SNK 法两两比较,对照组与实验1组之间的灰度值无显著差异 ($P>0.05$);对照组与实验2组之间的灰度值有显著差异 ($P<0.05$), 实验2组较对照组 survivin 蛋白的表达显著减少。

3 讨论

Survivin 是 1997 年 Altieri 等^[3]在研究效应细胞蛋白酶受体 1 时发现的定位于染色体 17q25 的一个 14.7 kb 的新基因,主要分布于胚胎组织、分化未成熟组织以及各种肿瘤组织内^[4]。Survivin 基因可通过多种信号传导通路抑制细胞凋亡:①直接抑制凋亡终末效应酶 caspase3 和 caspase7 的活性,阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程^[5];②也可结合 caspase9, 抑制其活性, 阻断 caspase9 依赖的细胞凋亡信号传导^[6];③survivin 基因也可通过 p21 间接抑制 caspase, 阻止细胞凋亡^[7]。目前对 survivin 的研究已经涉及许多医学领域,但这些研究很少涉及牙组织。本课题组前期研究观察到,Survivin 在成釉器、牙囊、牙乳头、牙板中持续表达,但在不同的发育时期表达强弱不

同,在成釉器的表达呈现先强后弱再变强再变弱的变化,这样的变化趋势可能与其双重作用有关。

牙发育过程是由大量的信号分子构成了复杂的信号网络系统,共同参与调控上皮与间充质之间相互的诱导作用,并指导细胞完成增殖、凋亡、分化、形态发生等一系列过程,从而导致牙胚器官的形成^[8]。过量氟对牙发育阶段的影响主要表现为抑制其生长活性、促进凋亡、紊乱细胞周期等^[9]。正常情况下,胚胎 14~21 d 的小鼠下颌第一磨牙牙胚经历了由蕾状期向钟状期的转变,牙胚内釉上皮细胞完成了向成釉细胞的分化过程^[10]。本研究在妊娠 10 d 至出生后 5.5 d 给氟,发现在氟中毒大鼠的成釉细胞中,Survivin 表达降低,并且在实验 2 组氟浓度升高的条件下,其表达降低更加明显,说明氟化物对 survivin 的表达有抑制作用。这种作用可能的机制是:① caspase3 是细胞凋亡下游的关键执行者,是细胞凋亡过程中的重要凋亡效应因子^[11]。Caspase3 参与牙的细胞凋亡,并且其分布和牙的细胞凋亡相互关联^[12]。当过量氟化物最终激活下游的 caspase3 时,影响了 survivin 的凋亡抑制作用;②氟损伤 DNA 分子并激活 p53 蛋白,后者可能对 survivin 有负反馈调节作用^[13]。过量氟化物使细胞活性受抑制,S 期细胞数明显增多,G2/M 期细胞明显减少并诱导细胞凋亡^[14-15]。Survivin 在细胞周期的 G2/M 期选择性表达,因此表达量减少。

本研究还观察到,氟对胎鼠成釉细胞中 survivin 的表达无显著影响,可能与此时 survivin 的作用主要是促进细胞增殖有关,对其抗凋亡的作用影响不大,也可能与胎盘屏障有关。氟浓度不同,新生鼠牙胚中 survivin 的表达不同程度降低,说明氟对 survivin 在钟状期成釉细胞中的表达有抑制作用,而且氟浓度越高,对 survivin 的表达抑制作用越明显。因而可以推测,氟化物可能通过细胞凋亡途径、干扰细胞周期影响 survivin 的时空表达,从而影响牙胚发育中细胞凋亡的有序发生,间接影响牙胚的正常发育,这可能是氟化物作用的一条途径,但其具体机

制有待于深入研究。

利益冲突声明:无。

[参考文献]

- [1] 樊明文,周学东.牙体牙髓病学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2003:105.
- [2] 石金莲,张月飞. Survivin 与 Caspase-3 的关系及其在鼻咽癌中的表达[J]. 广东医学,2014,35(22):3578-3581.
- [3] Altieri DC, Marchisio PC. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer [J]. Lab Invest, 1999,79(11):1327-1333.
- [4] 赵祯,匡安仁. 凋亡抑制蛋白 survivin 研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(24):4761-4764.
- [5] Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, et al. Survivin as a predictor of cis-diammine-dichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients [J]. Cancer Sci, 2004,95(1):44-51.
- [6] Dohi T, Beltrami E, Wall NR, et al. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis [J]. J Clin Invest, 2004,114(8):1117-1127.
- [7] 李昌荣,李红浪. Survivin 与胃癌相关性的研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(33):5079-5085.
- [8] 刘帆,刘奕. 牙发育相关信号通路研究进展[J].中国实用口腔科杂志,2013,6(8):503-506.
- [9] 张爱君. 氟斑牙的形成机制 [J]. 中国地方病防治杂志,2011,26(1):16-20.
- [10] 汪凤,崔颖颖,黄瑞哲,等. 氟化物对大鼠牙胚中光蛋白聚糖影响的免疫组化观察 [J]. 实用口腔医学杂志,2013,29(5):626-629.
- [11] 毛德文,陈月桥,王丽,等. Caspase-8 及 caspase-3 与细胞凋亡 [J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(10):148-150.
- [12] Matalová E, Kovárů F, Mísek I. Caspase 3 activation in the primary enamel knot of developing molar tooth [J]. Physiol Res, 2006,55(2):183-188.
- [13] Lowth AC, Williams GT, Scarpell JH, et al. Heterotrimeric G-protein are implicated in the regulation of apoptosis in pancreatic beta-cell [J]. Exp Cell Res, 1996,229(1):69-76.
- [14] 张颖,孙贵范,金亚平,等. 氟化物对大鼠颅骨成骨细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响 [J]. 卫生研究,2003,32(5):432-433.
- [15] 王长松,桂传枝,刘家骥,等. 氟在体外对成骨细胞增殖能力及细胞周期的影响 [J]. 贵阳医学院学报,2004,29(3):201-203,206.