

在大鼠牙髓炎中的八聚体结合转录因子 4B 免疫组化研究

兰卫东, 董迎春

(南京大学附属口腔医院, 江苏南京 230001)

[摘要] **目的** 研究内毒素 (LPS) 诱导大鼠牙髓炎模型中八聚体结合转录因子 4B (Oct-4B) 在不同时间的表达特点及定位情况, 以探讨 Oct-4B 在牙髓炎症中的可能作用, 推测它在牙髓炎发生、发展中的意义. **方法** 通过对 LPS 诱导的大鼠磨牙牙髓炎进行连续组织切片, 同时采用免疫组织化学检测大鼠牙髓炎中 Oct-4B 的表达情况. **结果** 1 d 组: 成牙本质细胞呈中度阳性表达, 牙髓成纤维细胞为中度至强阳性表达; 3、5、7 d 组: 成牙本质细胞、牙髓成纤维细胞阳性表达减弱. 2 周组: 坏死区扩大呈均质弱阳性表达, 成牙本质细胞、牙髓成纤维细胞及内皮细胞减少, 呈阳性, 修复牙本质呈弱阳性表达; 3 周组: 大部分坏死牙髓组织呈均质弱阳性表达. **结论** Oct-4B 在大鼠牙髓炎发生、发展呈动态表达, Oct-4B 可能参与调节牙髓炎发生、发展及修复过程.

[关键词] Oct-4B; 牙髓炎; 大鼠;

[中图分类号] R781.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 10-0010-05

An Experimental Study on the Dynamic Expression of Oct-4B in Rats with Pulpitis by Immunohistochemistry

LAN WEI - dong, DONG Ying - chun

(Dept. of Oral Medicine, Nanjing Stomatology Hospital Affiliated to Nanjing University, Nanjing Jiangsu 230001, China)

[Abstract] **Objective** To establish a model of rat endotoxic pulpitis induced by Lipopolysaccharide (LPS); to study the dynamic expression and location of Oct-4B in rat pulpitis model at different time; To evaluate the role of Oct-4B on pulp injury and reparation in rat endotoxic pulpitis. **Method** The slides were made and the dynamic expression and location of Oct-4B was examined by immunohistochemistry. **Results** Oct-4B was moderately positive in the pulp fibroblasts and odontoblasts in 2 weeks. After 2 weeks, it was still positive in odontoblasts and fibroblasts. Up to 3 weeks, it was weakly positive in odontoblasts and fibroblasts. **Conclusion** Oct-4B is dynamically expressed in the rats with pulpitis, and may play an important role in the incidence, development and recovery of pulpitis.

[Key words] Oct-4B; Pulpitis; Rat

牙髓组织受到感染、磨损、龋病等有害刺激后, 牙髓组织具有抵御刺激和自身修复反应. 牙髓牙本质复合体构成牙齿的主体, 在受到刺激或损伤的情况下, 局部牙髓组织将通过活化多种信号分子启动细胞应激反应, 以保护牙髓免受进一步损伤, 继续发挥营养、感觉、再生、防御等生理功能^[1]. 八聚体结合转录因子 4 (octamer binding transcription factor-4, Oct-4) 蛋白属于 POU 家族 V 类成员, Oct-4 基因编码 Oct-4A、Oct-4B 和

Oct-4B1 3 种亚型, Oct-4A 和 Oct-4B1 均主要表达于未分化细胞, 被认为是多能细胞的分子标志^[2-4]; Oct-4B 则主要表达于多种非多能细胞的胞质如终末分化的外周血单核细胞、膀胱肿瘤细胞等, 近年研究发现在应激条件下细胞中 Oct-4B 表达上调, 且高表达 Oct-4B 的细胞抗凋亡能力增强, 提示其对应激状态的细胞具有保护作用^[5]. 本研究检测 Oct-4B 在 LPS 诱导大鼠牙髓炎中牙髓组织中的表达情况以及在大鼠牙髓炎细胞中 Oct-4B 动态

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81100768)

[作者简介] 兰卫东 (1970~), 男, 安徽滁州市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事牙体牙髓病临床工作.

表达特点, 以初步揭示 Oct-4B 是否参与牙髓细胞对炎症的应答反应, 为进一步探讨 Oct-4B 在牙髓损伤修复中的调控作用提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

Wistar 大鼠, 雄性, 32 只, 体重 250~300 g, 购自南京军区总医院医学动物中心. 大肠杆菌标准内毒素 (LPS) (Sigma, USA) LPS 溶液: 用生理盐水将 LPS 稀释至 5 mg/mL, 过滤除菌后备用. 玻璃离子水门汀 (GIC) (日本 Fuji 公司) 1% 戊巴比妥 (上海制药厂); Oct-4 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, 美国); 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂.

1.2 方法

1.2.1 牙髓组织切片 根据不同的处理时间将 36 只大鼠随机分为 6 组. 每组 6 只, 即 1 d 组、3 d 组、5 d 组、7 d 组、2 周组、3 周组. 1% 戊巴比妥 (3 mL/kg) 肌注麻醉后仰卧固定, 以 75% 乙醇消毒双侧上颌磨牙区 A 区、B 区的第 1 磨牙 (M_1)、第 2 磨牙 (M_2), 用 1/4 球钻在咬合面开髓, 暴露穿髓点. A 区 M_1 、 M_2 于穿髓点处置饱和 LPS 溶液的棉球 (实验组), B 区 M_1 、 M_2 则以生理盐水棉球 (对照组), 同时作用 30 min, 再用无菌棉球擦干牙面, 玻璃离子水门汀暂封. 各组鼠分别于 1 d、3 d、5 d、7 d、2 周、3 周后股动脉放血处死, 4% 多聚甲醛主动脉弓插管心内灌注固定 30 min, 取双侧 M_1 、 M_2 连同部分颌骨一起经 4% 多聚甲醛固定 10 h, 经 10% EDTA 脱钙 10 d 后, 流水冲洗 1 h, 乙醇系列脱水、二甲苯置换, 石蜡包埋. 各标本作 5 μ m 厚的石蜡切片, HE 染色, 光镜观察.

1.2.2 免疫组化染色 免疫组织化学染色检测: 切片脱蜡至水化, 3% 过氧化氢溶液中封闭内源性过氧化物酶 10 min, 5% 牛血清蛋白封闭 30 min 后, 滴加 Oct-4 (1:200) 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 滴加抗山羊二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水透明后中性树胶封片. 以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照. 正置显微镜下观察大鼠炎症牙髓组织中 Oct-4B 的表达.

1.2.3 结果判定 Oct-4B 蛋白以细胞胞浆内有棕黄色细颗粒为阳性. 高倍镜下 ($\times 400$) 对每张切片随机选择 5 个视野计数, 阳性细胞数 $< 1\%$ 为阴性 (-), $1\% \sim 10\%$ 为弱阳性 (+), $11\% \sim 50\%$ 为中度阳性 (++) , $> 50\%$ 强阳性 (+++).

2 结果

1 d 组: 成牙本质细胞呈中度阳性表达, 牙髓成纤维细胞为中度阳性表达 (图 1、图 2); 3 d 组: 成牙本质细胞呈中度阳性表达, 牙髓成纤维细胞为阳性表达, 余表现同 1 d 组 (图 3、4); 5 d、7 d 组: 成牙本质细胞、牙髓成纤维细胞及内皮细胞阳性表达减弱 (图 5、图 6); 2 周组: 坏死区扩大呈均质弱阳性表达, 成牙本质细胞、牙髓成纤维细胞及内皮细胞减少, 呈阳性 (图 7); 3 周: 大部分坏死牙髓组织呈均质弱阳性表达, 修复性牙本质呈弱阳性表达 (图 8).

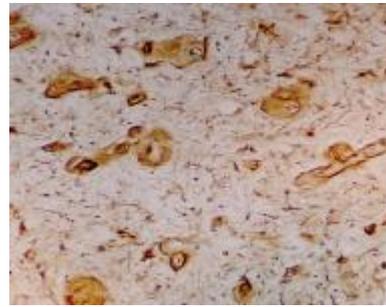


图 1 1 d 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 ($\times 400$)

Fig. 1 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 1 d group ($\times 400$)

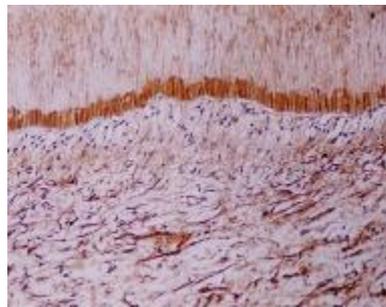


图 2 1 d 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 ($\times 100$)

Fig. 2 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 1 d group ($\times 100$)

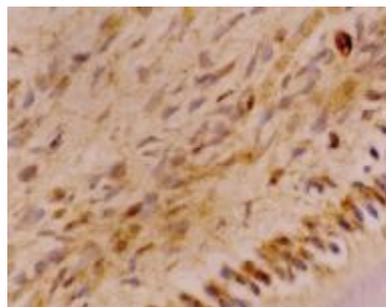


图 3 3 d 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 ($\times 400$)

Fig. 3 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 3 d group ($\times 400$)

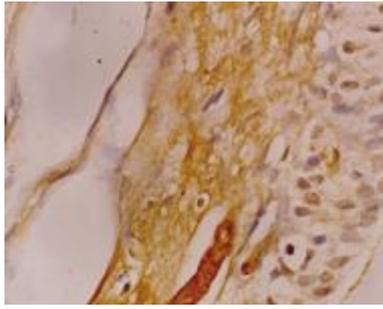


图 4 3 d 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 (×400)

Fig. 4 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 3 d group (×400)

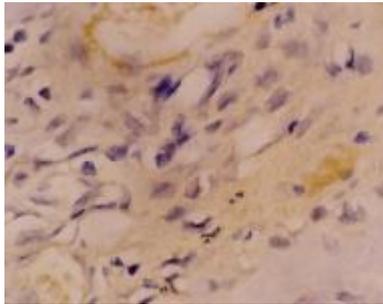


图 5 5 d 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 (×400)

Fig. 5 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 5 d group (×400)



图 6 7 d 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 (×100)

Fig. 6 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 7d group (×100)



图 7 2w 组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 (×100)

Fig. 7 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 2w group (×100)



图 8 3 周组炎性牙髓中 Oct-4B 的表达 (×100)

Fig. 8 Expression of Oct-4B in rat pulpitis of 3 weeks group (×100)

3 讨论

3.1 Oct-4B 的结构和生物学意义

Oct-4 蛋白属于 POU 家族 V 类成员, Oct-4 基因编码 Oct-4A、Oct-4B 和 Oct-4B1 3 种亚型, Oct-4A 和 Oct-4B1 均主要表达于未分化细胞, 被认为是多能细胞的分子标志; Oct-4B 则主要表达于多种非多能细胞的胞质如终末分化的外周血单核细胞、膀胱肿瘤细胞等, 近年研究发现在应激条件下细胞中 Oct-4B 表达上调, 且高表达 Oct-4B 的细胞抗凋亡能力增强, 在本实验中, Oct-4B 在 LPS 诱导大鼠的牙髓炎的早期高效表达, 提示其对应激状态的牙髓细胞具有保护作用. 但 Oct-4B 的氨基末端对 DNA 结合区有抑制作用, 从而失去对细胞多能性的转录调节功能, 单纯依靠 Oct-4B 无法维持细胞的自我更新. Kotoula 等^[6]指出, Oct-4B 在外周血单核细胞中表达可能对活化淋巴细胞群 (尤其 CD3⁺ T 细胞) 具有诱导作用, Oct-4B 积极参与牙髓细胞应激状态下的免疫调节作用. Wang 等^[9]报道宫颈癌细胞中 Oct-4B 表达上调, 提示 Oct-4B 对应激状态下细胞具有保护作用.

3.2 Oct-4B 在牙髓炎发生、发展过程中的表达

实验表明, LPS 诱导大鼠的牙髓炎, 1 d 组、3 d 组表现为急性炎症反应, Oct-4B 在成纤维细胞、成牙本质细胞及内皮细胞中均呈中度阳性表达; 5 d 组、7 d 组, Oct-4B 在成纤维细胞、成牙本质细胞及内皮细胞中均呈阳性表达; 随后表达逐渐减弱, 至修复期为弱阳性表达. 在同一时期, 受损牙髓的不同区域存在动态变化, 早期穿髓附近血管壁、内皮细胞及成纤维组织、细胞呈强阳性, 成牙本质细胞呈中度阳性, 穿髓点坏死区呈强阳性均质染色.

在牙髓炎早期, Oct-4B 蛋白表达上调, 可能

为牙髓细胞提供即时性保护, Oct-4B 在 LPS 的诱导下, 血管内皮细胞、牙髓成纤维细胞、成牙本质细胞大量合成 Oct-4B, 进入细胞核, 参与细胞内蛋白质合成和变性蛋白质的降解, 减轻 LPS 对细胞的损伤, 这时血管内皮细胞、牙髓成纤维细胞、成牙本质细胞呈中度阳性。

随着炎症进展, Oct-4B 的表达逐渐减少。这可能是由于 Oct-4BmRNA 的转录合成本身存在负反馈调节机制。当 Oct-4B 大量合成时, 它可自行减弱 Oct-4B 转录; 同时 Oct-4B 的合成不足以抑制炎症因子释放, 导致牙髓微循环障碍, 血管充血扩张, 血管壁及内皮细胞的代谢减少, 变性。

2 周组以后, 牙髓残存组织中炎细胞浸润减小, 炎症基本消退。残存牙髓表现为积极的牙髓损伤修复反应。成牙本质细胞, 前期牙本质细胞层仍有阳性表达, 提示 Oct-4B 可能参与牙髓修复过程。

3 周、4 周以后, 由于牙髓组织微循环代谢特点, 早期 Oct-4B 提供的抗炎症反应, 可能由于牙髓微循环的代谢障碍进一步加重, 成牙本质细胞、牙髓成纤维细胞、内皮细胞合成 Oct-4B 降低, 表现为 Oct-4B 随炎症发展而减弱, 在炎症晚期, Oct-4B 表达则显示 Oct-4B 积极参与牙髓损伤与修复。

3.3 Oct-4B 对 LPS 诱导大鼠的牙髓炎症损伤调控保护机制的探讨

在炎症过程中活化的巨噬细胞在辅酶 II 作用下产生氧自由基, 氧自由基通过脂质过氧化作用导致细胞膜和线粒体膜的损伤, DNA 链断裂, 使膜通透性增高, 细胞外水分和钙进入细胞, 导致细胞死亡。LPS 诱导大鼠的牙髓炎是相似革兰氏阴性厌氧菌感染为主的疾病, 脂多糖是革兰氏阴性菌的主要毒力因子。Wang 等^[9]报道低氧刺激后, 牙髓细胞中 Oct-4 mRNA 水平显著上调, 而后的激活依赖于低氧诱导因子-2 α (hypoxia inducible factor-2 α , HIF-2 α) 的调节。推测牙髓炎的炎症造成局部组织缺氧, 促使多种应答因子如 HIF-2 α 的释放, 进而上调 Oct-4 的表达。但 Oct-4B 亚型是否通过 HIF-2 α 依赖的途径参与炎症应答则需进一步研究。

3.4 Oct-4B 与细胞因子关系

牙髓炎和根尖周炎是以革兰氏阴性厌氧菌感染为主的疾病, 脂多糖是革兰氏阴性菌的主要毒力因子。当牙髓受到激惹或损伤时, 局部牙髓组织将通过活化多种信号分子启动细胞应激反应, 本实验中 Oct-4B 蛋白表达上调, 具有时间性、空

间性。Oct-4B 在成纤维细胞、成牙本质细胞及内皮细胞中的表达可能对应激状态的细胞具有保护作用, 以保护牙髓免受进一步损伤。有实验表明^[7], HSP70 在牙髓炎发生、发展过程中对牙髓保护扮演着重要作用, HSP70 表达是细胞对抗脂多糖毒性作用的重要指标^[8]。本实验中, Oct-4B 在牙髓炎发生各期表达与 HSP70 表达相似, 表明脂多糖刺激启动牙髓组织的损伤修复机制时, Oct-4B 可能是该过程的重要调控因子。HSP70 与 Oct-4B 在应激状态如何互相调控, 需要更多实验支持验证。Oct-4B 是一种重要的分子伴侣, 与 HSP70 协同可抑制脂多糖诱导产生的炎症介质如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 (IL-1) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 发挥对脂多糖损伤的保护作用, 维持内环境的稳定性^[9-11]。

LPS 和促炎因子 TNF- α 、IL-1 诱导牙髓细胞产生钙非依赖型 iNOS, 释放 NO, 抑制中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附, 引起溶酶体释放障碍, 减少中性粒细胞的趋化性, 抑制线粒体呼吸和 DNA 合成, 引起组织细胞的损伤。Oct-4B 的表达可能是通过抑制钙非依赖型 iNOS 的基因转录和合成, 降低 iNOS 的活性, 减少 NO, 减轻 LPS 和促炎因子对牙髓组织的损伤。同时 Oct-4B 在血管内皮细胞的表达, 可能抑制 Th1 参与炎症反应, 减少释放 IL-1, 限制牙髓炎症进一步发展。

在大鼠牙髓炎早期, Oct-4B 强阳性表达, 积极参与启动牙髓组织炎症免疫应答相关细胞因子调控有关; 在大鼠牙髓炎后期, Oct-4B 的表达, 是否与牙髓修复反应, 需要进一步探讨。

[参考文献]

- [1] SCHIAFFONATI L, TIBERIO L. Gene expression in liver after toxic injury: analysis of heat shock response and oxidative stress-inducible genes [J]. *Liver*, 1997, 17(4): 183 - 191.
- [2] WANG J, WEI X, LING J, et al. Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell [J]. *J Endod*, 2010, 36(3): 453 - 458.
- [3] CAUFFMAN G, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A, et al. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(12): 2 685 - 2 691.
- [4] PAMAMICHOS S I, KOTOULA V, TARLATZIS B C, et al. OCT4B1 isoform: the novel OCT4 alternative spliced variant as a putative marker of stemness [J]. *Mol Hum*

(下转第 21 页)