

TRPC1 通道蛋白在龋坏牙髓组织中的表达

蒋沂峰 刘杨秋 王家霞 曹丽华 许立侠 李红^(通讯作者)

山东医学高等专科学校

DOI:10.12238/bmtr.v7i6.17013

[摘要] 目的成牙本质细胞通过 TRP 通道蛋白发挥了接收和传递刺激以及修复的作用, TRP 通道蛋白是一类具有阳离子渗透性的超家族离子通道蛋白, 其中 TRPC1 可能参与了修复性牙本质的形成, 本实验的目的是研究龋坏对成牙本质细胞中 TRPC1 表达的影响。方法用 HE 染色检测龋坏牙齿切片的形态, 采用免疫组化方法研究 TRPC1 在健康和龋坏牙髓组织中的表达。结果 HE 染色结果显示切片质量良好, 符合后续实验要求, 免疫组化分析表明在健康人牙髓细胞中检测到 TRPC1 的表达, 且在成牙本质细胞中呈现高表达特征。此外, 随着龋病的进展, TRPC1 的表达水平呈增高趋势。结论综上所述, 本研究表明 TRPC1 表达水平受牙齿龋坏的影响, 其可能参与修复性牙本质的形成。

[关键词] 成牙本质细胞; 龋坏; TRPC1 通道蛋白; 修复性牙本质

中图分类号: R781.2 文献标识码: A

Expression of TRPC1 Channel Protein in Carious Pulp Tissues

Yifeng Jiang, Yangqiu Liu, Jiaxia Wang, Lihua Cao, Lixia Xu, Hong Li^(Corresponding Author)

Shandong Medical College

[Abstract] Objective: Odontoblasts play a role in receiving and transmitting stimuli and in repairing teeth through TRP channel proteins. TRP channel proteins are a superfamily of ion channel proteins with cation permeability, and TRPC1 may be involved in the formation of reparative dentin. The aim of this study was to investigate the effect of dental caries on the expression of TRPC1 in odontoblasts. Methods: The morphological characteristics of decayed tooth sections were analyzed using HE staining, and the expression levels of TRPC1 in both healthy and decayed dental pulp tissues were investigated through immunohistochemical analysis. Results: The HE staining results demonstrated that the slice quality was satisfactory and fulfilled the requirements for subsequent experiments. Immunohistochemical analysis revealed that TRPC1 expression was detectable in dental pulp cells of healthy individuals, with a notably high expression level in odontoblasts. Moreover, as dental caries progressed, the expression level of TRPC1 exhibited an upward trend. Conclusion: In conclusion, this study indicates that the expression level of TRPC1 is affected by dental caries and it may be involved in the formation of reparative dentin.

[Key words] Odontoblasts; Dental caries; TRPC1 channels protein; Reparative Dentin

引言

成牙本质细胞 (Odontoblasts, ODs) 是位于近牙髓侧高度极化的终末细胞, 呈栅栏状排列, 为牙髓提供天然的屏障, 向牙本质小管内伸入细胞突起可到达釉牙本质界, ODs 由于独特的解剖学位置和形态学特征可最早感受外界各种刺激^[1]。ODs 涉及几种感觉接收和信号传导的离子通道, 如机械敏感的 K⁺、Ca²⁺、电压门控的 Na⁺通道、瞬时感受器电位 (Transient Receptor Potential, TRP) 离子通道等, 其中研究最广泛的 TRP 离子通道。TRP 离子通道是一类具有阳离子渗透性的超家族离子通道, 分为六个子家族: TRPC (Canonical), TRPA (Ankyrin), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin),

TRPP (Polycystin) 和 TRPML (Mucolipin)。多项研究表明, TRP 通道蛋白参与了哺乳动物的机械感觉和传导^[2,3]。在受到外界刺激时, 牙本质小管内的液体运动引起 ODs 变形从而激活 TRP 通道, 通过 TRP 通道的跨膜 Ca²⁺内流激活了 ODs 中 ATP 的释放, 三叉神经节神经元上的 ATP 受体接受信号从而产生痛觉。瞬时受体电位规范 1 (Transient receptor potential canonical 1, TRPC1) 是 TRPC 通道家族中第一个克隆的哺乳动物成员, 在海马、杏仁核、小脑、黑质、下丘脑和背根神经节的大髓鞘感觉神经元中高表达, 参与突触传递和可塑性相关的重要神经元过程, 也参与间充质干细胞的增殖^[4-5]。最近有研究表明 TRPC1 在牙髓细胞 (dental pulp cells, DPCs)

中有表达,尤其是在 ODs 层,而在 DPCs 向 ODs 样分化过程中 TRPC1 蛋白水平呈时间依赖性增加。敲低 TRPC1 的表达可减弱 ODs 样分化的过程,同时也减少了 Ca^{2+} 进入 DPCs 细胞质,这表明 TRPC1 可能参与修复性牙本质的形成^[6]。

为进一步探索 TRPC1 在 DPCs 中发挥的作用,本研究选取不同龋坏的牙齿进行免疫组化染色,观察随着龋病的进展,TRPC1 表达水平的变化,为临床上治疗龋病提供新的思路。

1 对象和方法

1.1 样本选择

样本选自 2024 年 3 月至 2024 年 6 月就诊于临沂市人民医院和山东医学高等专科学校附属医院的患者,选择 18-24 岁患者因阻生、正畸等原因而预防性拔除的健康完整的和患有不同龋坏程度的第三磨牙、正畸牙,患者健康全身无系统性疾病,实验操作前患者已知情同意,本研究通过了山东医学高等专科学校医学伦理委员会审查(批准号: YX202302)。

1.2 主要材料和仪器

40g/L 多聚甲醛固定液(北京 Solarbio 公司),10%(100g/L) EDTA 脱钙液(北京 Solarbio 公司),兔抗人 DSPP 多克隆抗体(北京 Bioss 公司),兔抗人 TRPC1 通道蛋白多克隆抗体(美国 Proteintech 公司),SP(小鼠/兔 IgG)-POD(北京 Solarbio 公司),HE 染色试剂盒(北京 Solarbio 公司),Oly 普通实验用载玻片(北京中杉金桥生物技术有限公司),12×12 mm 盖玻片(北京中杉金桥生物技术有限公司),Olympus DP72 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),Image J 分析软件。

2 研究方法

2.1 样品制取

获取样本后,随即用 75%酒精棉球擦拭牙齿表面,用刀片及镊子去除牙齿外表面多余组织,并在冰盒中用金刚砂车针带水磨除根尖 3~4mm。之后将样本置于 40g/L 多聚甲醛组织固定液中,4℃固定 48h。固定完成后用 10%EDTA 脱钙液,室温下脱钙 80d,每 2~3d 换液一次,直至样本质地变柔韧,光滑拔髓针可以无阻力穿孔,至此样本脱钙完成。制作平行于牙体长轴的连续切片,厚 4 μm,固定于载玻片上。

2.2 苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE 染色)

将石蜡切片在 60℃恒温箱烘烤 2h,进行 HE 染色。二甲苯行脱蜡,用梯度乙醇水化,转移到苏木精、伊红溶液中染色,观察细胞染色情况。使用脱水酒精,加入适量的中性树胶,密封。在光学显微镜下观察每组石蜡切片中牙髓组织的形态。

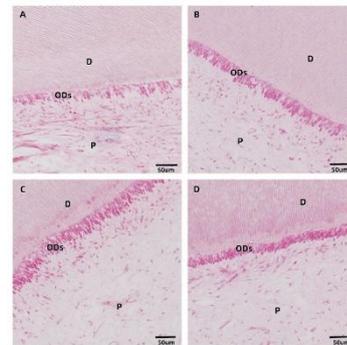
2.3 免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)染色

将石蜡切片在 60℃恒温箱中烘烤 5h,进行 IHC 染色。

二甲苯行脱蜡,用梯度乙醇水化,蒸馏水冲洗 10min。室温 3% H_2O_2 孵育 10min。蒸馏水冲洗 3 次,每次 3min,抗原修复液进行抗原修复。滴加封闭液,在室温下封闭 20min。滴加 TRPC1 抗体及 DSPP 抗体:滴加兔抗人 TRPC1 通道蛋白多克隆抗体、兔抗人 DSPP 多克隆抗体 4℃过夜, PBS 冲洗 3 次,每次 3min。滴加 Bio-羊抗兔 IgG 工作液,37℃孵育 30min, PBS 冲洗 3 次,每次 2min。滴加链酶亲和素-POD 工作液,依旧在 37℃孵育 30min, PBS 冲洗 4 次,每次 5min。避光下, DAB 室温显色,苏木素复染 10s,流水冲洗。乙醇脱水、二甲苯透明,封片。Olympus DP72 型光学显微镜下进行观察并使用 Image J 软件进行分析。

3 结果

3.1 HE 染色结果



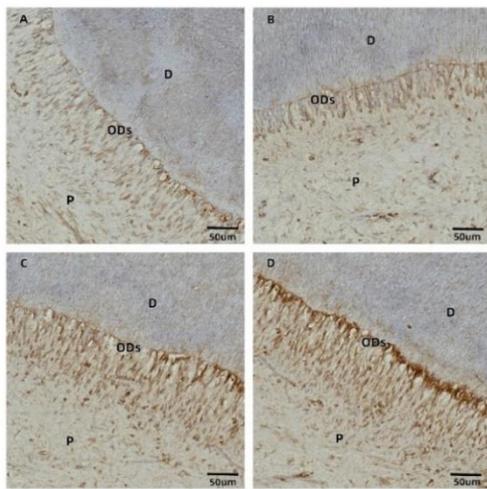
A: 正常对照牙 B: 浅龋 C: 中龋 D: 深龋
D: 牙本质 ODs: 成牙本质细胞 P: 牙髓细胞,比例尺为 50um (A-D)

图 1 不同样本牙齿进行 H&E 染色(×200)

不同龋坏组织的样本经过常规多聚甲醛固定、EDTA 脱钙和石蜡包埋后制作为 4μm 厚度的切片。HE 染色结果显示样本的牙髓组织形态正常,可用于后续实验(图 1A-D)。具体如下,ODs 在冠方为高柱状,在颈部和根部为立方状或扁平状,细胞核较大形似椭圆形存在于基底膜上。在牙髓周围呈栅栏状排列,细胞突起长而规则,在靠近牙髓一侧较为粗大,靠近末端细小。牙髓组织中还可可见呈星形的成纤维细胞、毛细血管、树枝状细胞、神经纤维等。

3.2 定位 ODs

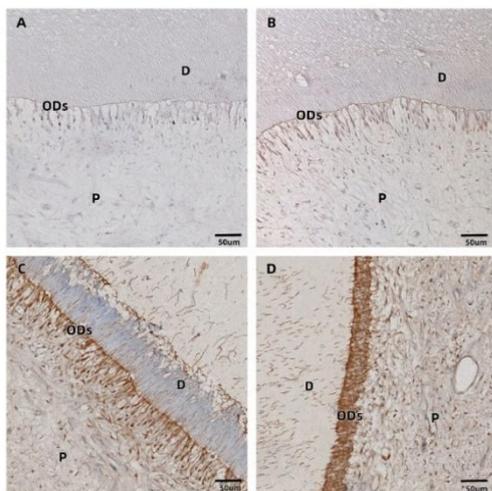
牙本质涎磷蛋白(Dentin Sialophosphoprotein, DSPP)是只存在于牙本质中由 ODs 合成和分泌的一种特异性蛋白,是标记 ODs 的有效标记物。本实验 IHC 染色结果证实 DSPP 在牙髓组织切片 ODs 层中呈阳性表达,并与 HE 染色中的 ODs 组织学位置一致,进一步对 ODs 进行定位(图 2A)。此外, IHC 染色结果表明,随着龋病进展, DSPP 阳性表达率呈上升趋势(图 2B-D)。



A: 正常对照牙 B: 浅龋 C: 中龋 D: 深龋
D: 牙本质 ODS: 成牙本质细胞 P: 牙髓细胞, 比例尺为 50um (A-D)

图2 不同样本牙齿进行 DSPP IHC 染色 (×200)

3.3 TRPC1 在牙髓组织中的表达



A: 正常对照牙 B: 浅龋 C: 中龋 D: 深龋
D: 牙本质 ODS: 成牙本质细胞 P: 牙髓细胞, 比例尺为 50um (A-D)

图3 不同样本牙齿进行 TRPC1 IHC 染色 (×200)

IHC 染色结果表明, TRPC1 存在于正常的牙髓组织中, 且在 ODs 层表达量高于其他组织 (图 3A), 在浅龋组织中, TRPC1 的表达水平略有增加 (图 3B), 但是和正常牙髓组织没有明显差异。随着龋坏的加深, 中龋和深龋的组织切片中观察到 TRPC1 表达量呈明显上升趋势 (图 3C 和 3D)。

4 讨论

龋病是口腔细菌侵入牙体硬组织而引起的一种慢性感染性疾病, 口腔内的致病菌代谢食物中的糖类后产生酸, 从

而使牙体硬组织脱矿, 形成龋洞。WHO 数据表明全球约 30% 人口有恒牙龋齿未治疗, 如果不加以控制, 随着龋病的进展会导致不可逆的牙髓炎症, 随后可能发生牙髓坏死、根管系统感染和根尖周疾病, 最终导致牙齿脱落。而促进修复性牙本质形成也成为保护牙髓、牙齿健康重建的重要方法之一^[7]。

牙齿由三种硬组织 (牙釉质、牙本质和牙骨质) 和唯一一种软组织 (牙髓组织) 构成, 其中位于牙髓最外层呈柱状紧靠牙本质的为 ODs。ODs 为终末分化细胞, 由胞体和突起构成, 细长的突起深入到牙本质小管内, 感受外界刺激, ODs 排列成栅栏状, 细胞之间相互拥挤, 为牙髓提供天然的屏障^[8]。本实验中观察到的 ODs 与以往报道一致, 为我们后续的研究奠定基础。DSPP 是 ODs 的一种主要的非胶原基质蛋白, 有研究表明 DSPP 参与牙齿发育和矿化, 其常用于 ODs 的鉴定^[9], 故本研究将 DSPP 在 DPCs 中的 IHC 染色来验证和确定 ODs 的表达部位, 进一步为后续实验奠定良好基础。

TRPC1 是 TRP 通道蛋白的家族成员之一, 有研究报道, TRPC1 可能参与了存储钙操作通道 (Store-operated Calcium Entry, SOCE) 的组成, 可调节 Ca^{2+} 内流, 从而维持细胞内 Ca^{2+} 总体浓度增加^[10]。细胞内 Ca^{2+} 增加可促进 DPCs 的增殖和分化^[6], 已有文献报道, TRPC1 通过调节 Ca^{2+} 内流参与修复性牙本质的形成, 降低 TRPC1 的表达会使成牙本质向分化过程中的矿化能力减弱, 同时也会减少 Ca^{2+} 进入牙髓细胞质内。本研究结果显示, 正常牙髓组织中即有 TRPC1 的表达, 并且在 ODs 中的表达量高于牙髓其他组分, 这与之前报道的结果一致^[8]。浅龋状态下, TRPC1 表达量没有明显的增强, 这可能与外部刺激损害程度较轻, 没有引起 ODs 形成和分化有关。在中龋切片中发现, TRPC1 的表达量有明显的升高, 而在深龋实验组中, TRPC1 的表达量达到峰值。牙齿遭到严重的损害如深龋或急性龋, 原代 ODs 在病变条件下发生死亡, 牙髓内的未分化间充质干细胞被信号传递至受损区域, 并分化为成牙本质细胞样细胞, 这些细胞沉积修复性牙本质基质, 新形成的硬组织将损伤部位和细菌感染部位分隔开, 保护下方的牙髓组织。在修复过程中, 反应性牙本质形成相对简单, 只需要上调现有的 ODs 活性, 而修复性牙本质形成则更为复杂, 涉及牙本质合成和分泌活性的募集、分化和上调, 在中深龋的状态下, TRPC1 表达量增高, 可能参与了 ODs 分化这一过程。

本研究通过 IHC 染色结果可知, 随着龋病的进展, TRPC1 的表达明显增强, 这表明 TRPC1 可能对修复性牙本质的形成起促进作用, 本课题组将进一步探讨 TRPC1 在调控 DPCs 的成牙本质向分化以及其在刺激条件下的作用。

[参考文献]

[1] 孟润莎, 徐琼. 成牙本质细胞在牙髓免疫防御中的作用

研究进展[J].中华口腔医学研究杂志(电子版),2017,11(4):238-41.

[2]郭京,单徜,李玫,等. TRP离子通道在干细胞中的表达及功能的研究进展[J].中国科学:生命科学,2021,51(12):1692-1700.

[3]Pereira da Silva EA, Mart ín-Arag ón Baudel M, Navedo MF, et al. Ion channel molecular complexes in vascular smooth muscle[J]. Front Physiol, 2022, 13:999369.

[4]Alessandri-Haber N, Dina OA, Chen XJ, et al. TRPC1 and TRPC6 Channels Cooperate with TRPV4 to Mediate Mechanical Hyperalgesia and Nociceptor Sensitization[J]. J Neurosci. 2009, 29(19):6217-28.

[5]Luo LH, Zhang YN, Chen HY, et al. Effects and mechanisms of basic fibroblast growth factor on the proliferation and regenerative profiles of cryopreserved dental pulp stem cells[J]. Cell Prolif. 2021, 54(2): e12969.

[6]Song Z, Chen L, Guo J, et al. The Role of Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 1 in the Odontoblast-like Differentiation of Human Dental

Pulp Cells[J]. J Endod. 2017, 43(2):315-20.

[7]王佳瑛,阮骏杰,张夏佳.口腔微生物在龋病的发病机制中的作用与防治的研究进展[J].浙江创伤外科,2025,30(10):1998-2002.

[8]Bleicher F. Odontoblast physiology [J]. Exp Cell Res, 2014, 325(2):65-71.

[9]Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization[J]. Matrix Biol. 2009, 28(4):221-9.

[10]Li M, Chen C, Zhou Z, et al. A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca^{2+} entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. Cell Calcium[J]. 2012, 51(6):486-96.

作者简介：

蒋沂峰（1981-），男，汉族，山东临沂，硕士，山东医学高等专科学校，副教授，主要研究领域为口腔医学。

基金项目：

山东省医药卫生科技项目（No：202308010873）。