

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2017.03.003

· 基础研究 ·

TLR4在人健康和深龋牙髓组织中的定位表达研究

刘影¹, 高岩², 文军¹, 徐帅妹¹

1. 南方医科大学口腔医院(广东省口腔医院)牙体牙髓科, 广东 广州(510280); 2. 南方医科大学口腔医院(广东省口腔医院)种植中心, 广东 广州(510280)

【摘要】 目的 比较人健康及深龋牙齿牙髓的组织形态及Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)在两种牙髓组织中的定位表达,以明确TLR4是否参与牙髓的天然免疫反应过程。**方法** 正常及深龋牙齿脱矿后行HE染色,观察牙本质及牙髓组织基本形态,正常及深龋牙髓组织行免疫组织化学染色,观察TLR4的定位表达情况,进行免疫组织化学染色评分分析。**结果** HE染色显示正常牙齿牙本质小管结构完整、分布均匀,牙髓组织内细胞、血管和纤维结缔组织完整清晰。深龋牙齿部分牙本质小管遭到破坏,牙髓组织结构完整,与正常组牙髓组织相比较未见明显改变。免疫组织化学染色显示正常与深龋牙髓组织中TLR4阳性染色均表达于成牙本质细胞层及血管周围组织,但深龋牙髓组织阳性染色明显增强。免疫组织化学染色评分结果正常组为 1.25 ± 0.46 ,深龋组为 2.10 ± 0.74 ,2组差异具有统计学意义($t = 2.833, P = 0.012$)。**结论** TLR4在正常及深龋牙髓中均有表达且深龋牙髓表达更多,提示TLR4参与了深龋牙髓组织的天然免疫反应。

【关键词】 牙髓; TLR4; 深龋; 定位表达; 天然免疫反应

【中图分类号】 R781.05 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2017)03-153-06

【引用著录格式】 刘影,高岩,文军,等. TLR4在人健康和深龋牙髓组织中的定位表达研究[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(3): 153-158.

Locations of TLR4 in healthy dental pulp tissue and dental pulp tissue affected by deep caries LIU Ying¹, GAO Yan², WEN Jun¹, XU Shuai-mei¹. 1. Department of Endodontics, Stomatological Hospital of Southern Medical University & Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China; 2. Center of Oral Implantology, Stomatological Hospital of Southern Medical University & Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: GAO Yan, Email: yingliu0504@yahoo.com, Tel: 0086-20-84403983

【Abstract】 Objective To analyze the role of TLR4 in innate immune response of dental pulp by comparing the locations and expressions of TLR4 in healthy dental pulp tissue and dental pulp tissue affected by deep caries. **Methods** Healthy teeth and teeth affected by deep caries were demineralized and stained with hematoxylin and eosin (HE) to observe the morphology of dental pulp. Immunohistochemistry staining was performed to observe the expressions of TLR4. **Results** Observed under HE staining, dentin tubules of teeth affected by deep caries were damaged with a lot bacteria mass. The expression of TLR4 were located in the odontoblast layer and near the blood vessels in both groups. Positive staining of TLR4 in deep caries pulps (2.10 ± 0.74) were significantly higher than that in healthy teeth (1.25 ± 0.46). **Conclusion** Expression of TLR4 in deep caries pulp is stronger than that in healthy pulp. It suggests that TLR4 may play a role in the innate immune response of deep caries.

【Key words】 Dental pulp tissue; TLR4; Deep caries; Location; Innate immune response

【收稿日期】 2016-11-08; **【修回日期】** 2016-12-28

【基金项目】 广东省自然科学基金项目(2015A030310071);广东省医学科学技术研究基金项目(A2016356);广东省医学科学技术研究基金项目(A2016212);广东省自筹经费类科技计划项目(粤科规财字[2015]110号)

【作者简介】 刘影, 医师, 博士, Email: yingliu0504@yahoo.com

【通讯作者】 高岩, 医师, 博士, Email: gaoyan518_008@163.com

龋病被世界卫生组织列为继癌症、心血管疾病之后的第三大慢性非传染性疾病,患病率高、危害范围广。2005年第三次全国口腔健康流行病学资料表明,我国儿童乳牙龋病患病率为66%,恒牙达28.9%。因此,对龋病的防治格外重要。天然免疫反应是人体抵御病原体刺激的防御屏障,在保护人体免受病原体入侵的过程中起着至关重要的作用。Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)属于模式识别受体的成员,可以识别并与病原体特异性结合,开启人体的天然免疫反应。龋病是在以细菌为主的多种因素作用下,牙体硬组织发生慢性进行性破坏的一种疾病,其致病菌包括链球菌属、乳杆菌属、放线菌属等多种细菌,这些细菌及其产生的毒力因子沿着牙本质小管走行,入侵牙髓组织。目前,牙髓组织TLR4的相关研究主要集中在健康牙髓组织中,而对于深龋情况下,人牙髓组织中是否存在TLR4,TLR4是否参与了识别致龋菌并抵御细菌入侵牙髓组织的天然免疫反应过程并不明确,以上这些都是亟待解决的问题。本文即从组织学层面,采用HE染色、免疫组织化学染色技术观察TLR4是否存在于深龋牙髓并比较TLR4在正常和深龋牙髓组织中的定位表达情况。

1 材料和方法

1.1 标本收集

标本取自南方医院口腔颌面外科18~26岁正常人因正畸或阻生而拔除的健康、完整、无龋坏的牙齿(正常组11例)以及深龋但无牙髓炎症状的牙齿(深龋组15例)(经患者本人及家属知情同意)。拔除前彻底消毒,拔出后即刻放入10%福尔马林固定液中储存。

1.2 主要试剂及仪器

EDTA(广州化学试剂厂),Toll-like receptor 4一抗(Abcam,美国),二抗试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),HE染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。脱水机(Leica,德国),包埋机(Leica,德国),展片机(Leica,德国),切片机(Leica,德国),正置荧光显微镜及照相系统(Olympus,日本)。

1.3 HE染色

正常组及深龋组各随机抽取3例在10% EDTA溶液中使用EDTA联合微波超声脱矿法脱矿4周后进行脱水、透明及包埋处理。石蜡切片经二甲

苯脱蜡、梯度酒精脱水,经苏木精染色、伊红染色后脱水、透明、封片,正置显微镜下观察牙齿组织形态。

1.4 免疫组织化学染色

取健康牙齿(正常组8例)以及深龋但无牙髓炎症状的牙齿(深龋组12例),标本沿釉牙骨质界用高速手机环绕牙颈部磨出2 mm深度的沟槽,将牙齿沿沟槽劈开,取出牙髓,放入包埋盒内,标记后进行脱水、透明、包埋及切片处理。标本修整至组织面完全暴露,连续切片5张,选取组织完整的切片进行后续检测。

石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,3% H₂O₂灭活过氧化物酶,山羊血清孵育30 min,实验组用TLR4鼠抗人一抗(1:100)4℃孵育过夜,阴性对照组用生理盐水孵育过夜,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗3次,兔抗鼠二抗(1:500)室温孵育1 h, PBS冲洗3次。二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色液染色2 min,镜下观察,见标本出现棕褐色特异性染色时终止染色。蒸馏水充分冲洗,苏木素复染,中性树脂胶封片。正置显微镜观察、拍照。

每例样本选取1张切片,每张切片于镜下随机选取5个视野进行免疫组织化学染色评分。基于正常组和深龋组牙髓组织TLR4免疫组化染色的强度,设置评分标准:0 = 阴性染色;1 = 弱阳性染色;2 = 中等强度染色;3 = 强阳性染色。评分由2名人员分别单独完成,当两者评分不同时,进行讨论确定评分。

1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件处理数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,*t*检验进行2组比较,*P* < 0.05为差异有统计学意义。

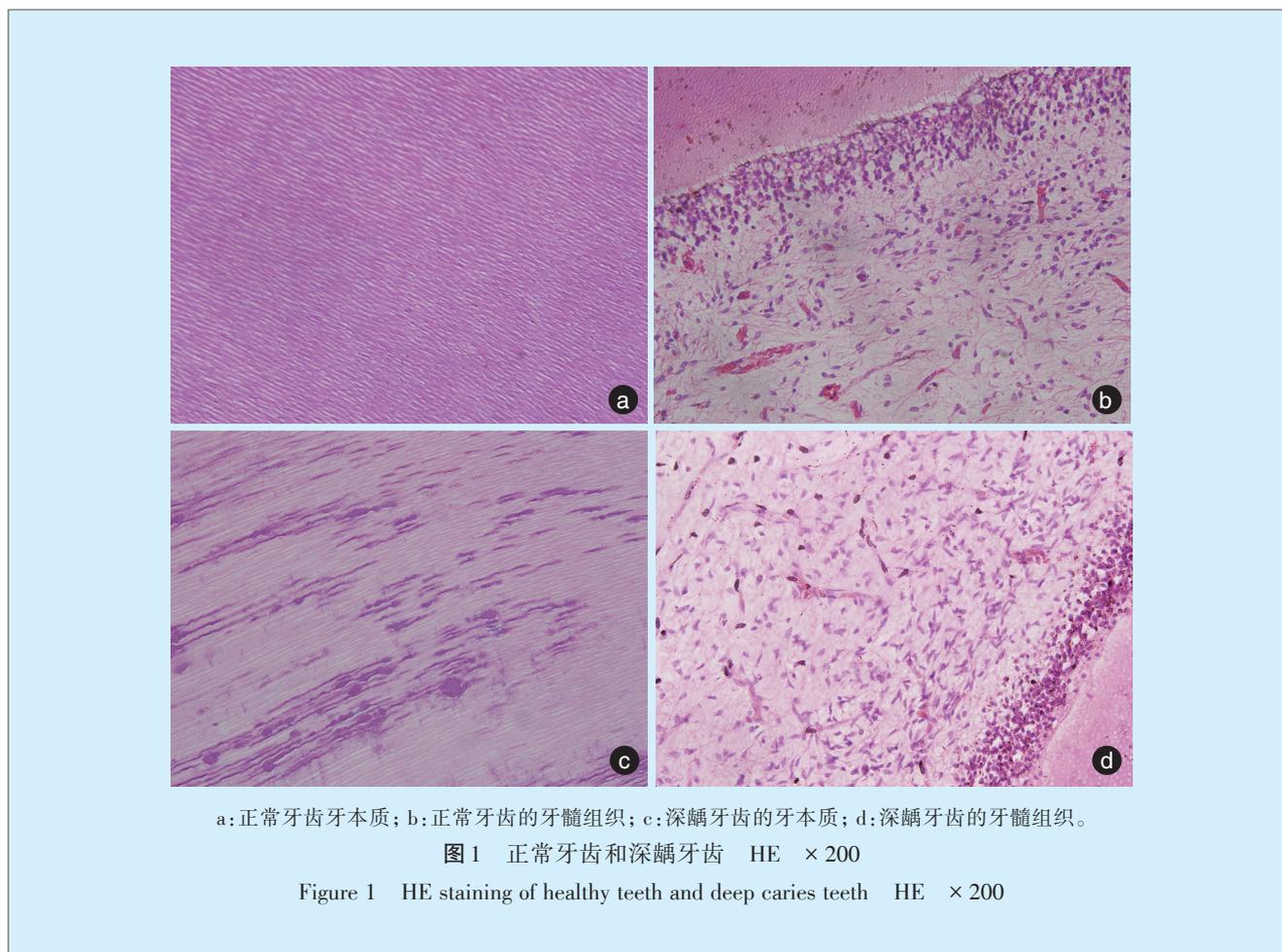
2 结果

2.1 正常与深龋牙体和牙髓组织基本形态HE染色结果

正常与深龋牙齿脱矿完成时间为20~31 d。HE染色结果显示:正常组牙齿牙本质内牙本质小管结构清晰完整,牙本质小管分布均匀,成细长管状;牙髓组织染色均匀,细胞膜红染、细胞核蓝染,结构清晰,成牙本质细胞成栅栏样排列在组织外侧,其后依次为乏细胞区、多细胞区及固有牙髓组织,细胞、血管和纤维结缔组织完整清晰。

深龋组牙齿的牙本质内可见部分牙本质小管遭到破坏,牙本质小管膨胀、弯曲,观察到大量细菌的入侵,呈串珠样改变,牙本质小管内部可见与小管平行走行的蓝染细菌团,坏死牙本质和细菌

融合成椭圆形坏死灶,有修复性牙本质形成;牙髓组织结构完整、未见炎症细胞的浸润,与正常组牙髓组织相比较未见明显改变(图1)。



2.2 免疫组织化学染色结果

免疫组织化学染色结果显示:正常牙髓组织中TLR4阳性染色表达于成牙本质细胞层及血管周围组织,但特异性染色较弱。深龋牙髓组织中TLR4的表达部位与正常牙髓一致,均为成牙本质细胞层及血管周围组织,但阳性染色明显增强。阴性对照组均未见阳性染色(图2)。TLR4免疫组织化学染色评分,正常组为 1.25 ± 0.46 ,深龋组为 2.10 ± 0.74 ,2组差异有统计学意义($t = 2.833, P = 0.012$)。深龋组TLR4表达量较正常组牙髓组织多(图3)。

3 讨论

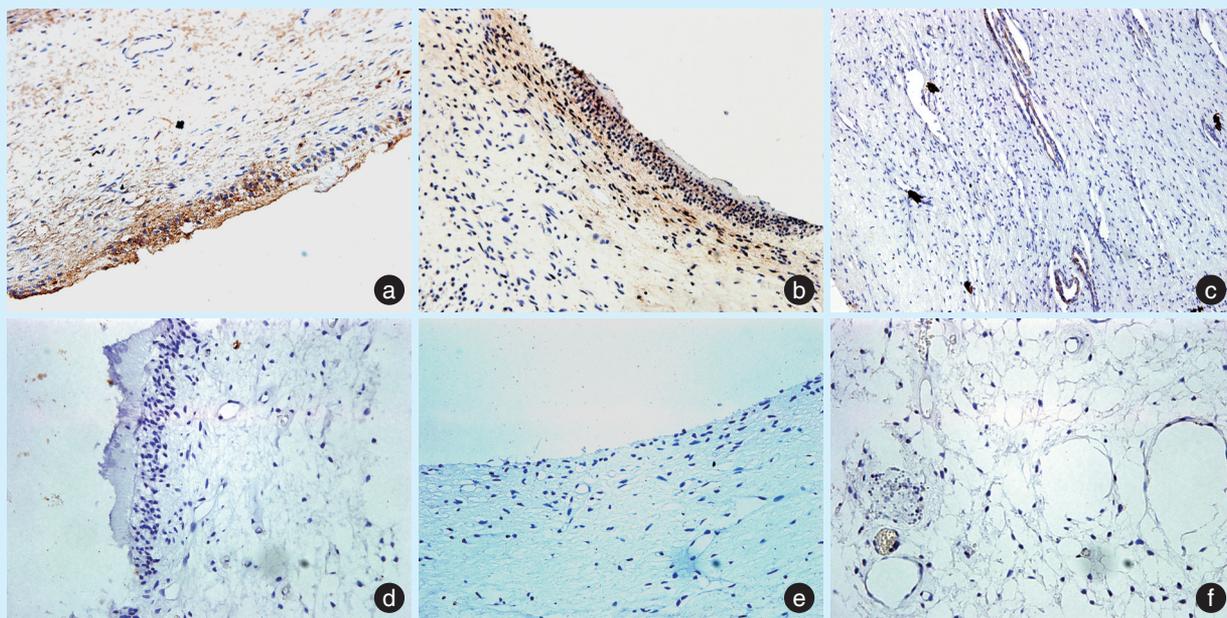
3.1 龋病、天然免疫反应及Toll样受体

龋病是人类的常见病、多发病之一,在各种疾

病的发病率中,龋病位居前列。在大多数工业化国家,60%~90%的学龄儿童及大部分成年人均受到龋病的影响^[1]。2008年广州市儿童恒牙龋病流行病学调查报告显示:12岁儿童恒牙患龋率为29.44%,其中城市为23.43%,农村为47.50%^[2]。它是在以细菌为主的多因素影响下,牙体硬组织发生慢性进行性破坏的一种疾病。当牙本质暴露,细菌和其他机械性或化学性刺激沿牙本质小管传导至牙髓,髓腔内侧出现牙髓组织的保护屏障-修复性牙本质以抵御外界刺激。随着龋病的发展,牙髓内部的牙髓干细胞可多向分化为受损细胞以补充和修复受损组织^[3-4]。以上过程被认为是牙髓组织参与的天然免疫反应^[5]。牙髓组织处于一个密闭的内环境,对刺激抵抗能力较低,一旦发生炎症则牙髓难以保存。天然免疫反应作为人体抵御

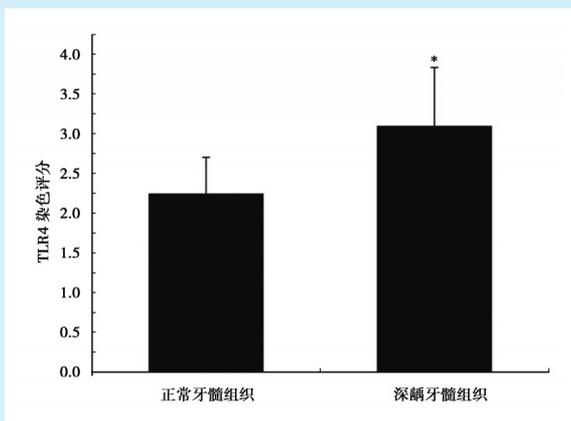
外界病原体入侵的第一道防线,在人体自我保护和自我修复过程中具有重要作用。因此,探讨天

然免疫反应在牙髓组织中的作用,对牙髓组织的自我保护、修复再生具有重要意义。



a: 正常牙髓组织实验组; b: 深龋牙髓组织实验组; c: 深龋牙髓血管实验组; d: 正常牙髓组织阴性对照组; e: 深龋牙髓组织阴性对照组; f: 深龋牙髓血管阴性对照组。TLR4: Toll 样受体 4。

图2 免疫组织化学染色检测 TLR4 在正常牙齿和深龋牙齿中的定位表达 × 200
Figure 2 Expressions of TLR4 in dental pulp of healthy teeth and deep caries teeth × 200



TLR4: Toll 样受体 4。

图3 正常牙髓与深龋牙髓组织 TLR4 免疫组化染色评分比较

Figure 3 TLR4 staining scores of healthy teeth and deep caries teeth

Toll 样受体属于模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)的一种。人类的天然免疫反应是通过 PRRs 特异性识别病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMPs)来实现的^[6]。Toll 样受体可以与 PAMPs 特异性结合,开启人体的天然免疫反应。有学者发现^[7],在人正常牙髓组织中,成牙本质细胞可以表达 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR9,但不表达 TLR7、TLR8 和 TLR10。TLR4 是第一个被鉴定的人类 Toll 样受体^[8],可以广泛识别各种病原体刺激物,如革兰氏阴性菌胞壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、热休克蛋白、纤维蛋白原、呼吸道病毒、肝素等。TLR4 广泛表达在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞以及内皮细胞和上皮细胞等参与天然免疫的细胞,并且这些细胞是抵御侵入机体的病原微生物的首道防线。TLR4 是脂多糖跨膜信号转导的关键受体,亦是机体激活天然免疫对抗病原微生物的重要环节。

3.2 深龋牙髓组织的病理学改变及TLR4表达

细菌是龋病的主要致病因素。HE染色后可以观察到深龋牙齿牙本质内牙本质小管被细菌破坏,并有大量细菌团呈串珠样排列并有椭圆形液化坏死灶形成。而健康牙本质内牙本质小管结构清晰。在深龋牙髓组织中未发现结构破坏、血管充血扩张及炎症细胞浸润等牙髓炎症的病理改变,与正常牙髓相比未见明显差异,由此证明,深龋牙髓并没有处于炎症状态。龋坏状态下,大量细菌及其产物刺激牙髓组织。LPS是位于革兰氏阴性菌胞壁表面的成分。已经证实,LPS存在于深龋的牙髓组织中^[9-10]。而LPS是TLR4的激动剂,它可以刺激TLR4产生免疫反应^[11-13]。

为明确TLR4是否参与到深龋时人牙髓抵抗细菌入侵的自我保护过程,本研究比较了TLR4在正常牙齿和深龋牙齿牙髓组织中的定位表达。免疫组织化学染色结果表明TLR4主要表达在成牙本质细胞层及血管周围组织。这与以往学者的研究结果一致。Jiang等^[14]已经证实,健康牙髓组织成牙本质细胞层TLR4阳性表达,部分牙髓内血管可见环状着色,血管内有阳性细胞存在。牙髓内部未见或偶见TLR4阳性细胞。在小鼠的实验性龋坏模型中也同样发现巨噬细胞和树突样细胞表达TLR4^[15]。但以往的实验主要集中于TLR4在正常牙髓中的表达^[16],而对其在人深龋牙髓中的定位表达报道较少。本研究发现健康牙髓和深龋牙髓组织均有TLR4的表达但深龋牙髓组织中TLR4的表达明显强于健康牙髓。TLR4具有识别病原体的功能,在与龋坏细菌表面的LPS结合之后刺激TLR4的表达,可以解释这一现象^[17-18]。Mutoh等^[15]在小鼠实验性龋齿中的研究也支持了本实验的研究结果。

成牙本质细胞位于牙髓组织的外侧,紧密地排列成栅栏状并伸出长长的牙本质细胞突起进入牙本质小管。成牙本质细胞是细菌入侵牙髓过程中先接触到的细胞。成牙本质细胞被刺激后可分泌基质并矿化形成修复性牙本质以抵抗细菌的入侵,进而形成牙髓组织抵御外界刺激的生物屏障,此过程是牙髓组织参与天然免疫反应的重要组成部分^[5]。在深龋情况下,位于牙本质细胞表面的TLR4在识别细菌的过程中被激活。这一观点已经得到学者们的广泛证实。细菌成分刺激成牙本质细胞样细胞及成牙本质细胞系

MDPC-23后均可刺激细胞表面TLR4的表达增高^[19-21]。

TLR4广泛表达在牙髓组织的各种细胞中。已经发现牙髓组织的血管内皮细胞、纤维细胞及牙髓神经元细胞均可以表达TLR4^[14, 22-24]。本实验观察到,TLR4表达于血管周围牙髓组织。有学者已经证明,TLR4表达于牙髓血管的内皮细胞,另外,牙髓神经总是伴随着牙髓血管的分布而走行,这也可以解释TLR4高表达于血管周围这一现象。

本研究明确了TLR4在牙髓组织中的定位表达,并且观察到TLR4在深龋牙髓组织中的表达量明显高于健康牙髓,提示TLR4参与了牙髓组织抵御深龋细菌入侵的天然免疫反应过程,为研究龋病的防治提供一种新思路。

参考文献

- [1] Mikx FH, Hoeven JS, Koenig KG, et al. Establishment of defined microbial ecosystems in germfree rats[J]. *Caries Res*, 1972, 6(3): 211-219.
- [2] 黄少宏, 张屹, 林文红, 等. 2008年广州市儿童恒牙龋病流行病学调查报告[J]. *广东牙病防治*, 2010, 18(4): 202-206.
- [3] Ma D, Gao J, Yue J, et al. Changes in proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from deep caries in vitro[J]. *J Endod*, 2012, 38(6): 796-802.
- [4] 文军, 徐帅妹, 刘影. Wnt通路抑制剂XAV-939对牙髓干细胞成脂分化的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2016, 24(8): 459-463.
- [5] Liu Y, Gao Y, Zhan XL, et al. TLR4 activation by lipopolysaccharide and *Streptococcus mutans* induces differential regulation of proliferation and migration in human dental pulp stem cells[J]. *J Endod*, 2014, 40(9): 1375-1381.
- [6] Hirao K, Yumoto H, Takahashi K, et al. Roles of TLR2, TLR4, NOD2, and NOD1 in pulp fibroblasts[J]. *J Dent Res*, 2009, 88(8): 762-767.
- [7] Durand SH, Flacher V, Roméas A, et al. Lipoteichoic acid increases tlr and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2880-2887.
- [8] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the drosophila Toll protein signal activation of adaptive immunity[J]. *Nature*, 1997, 388(6640): 394-397.
- [9] Wang CY, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 1997, 12(2): 65-71.
- [10] Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7[J]. *Eur J Oral Sci*, 2000, 108(3): 202-206.
- [11] Papp T, Hollo K, Meszar-Katona E, et al. TLR signalling can

- modify the mineralization of tooth germ[J]. *Acta Odontol Scand*, 2016, 74(4): 307-314.
- [12] Li JG, Lin JJ, Wang ZL, et al. Melatonin attenuates inflammation of acute pulpitis subjected to dental pulp injury[J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(1): 66-78.
- [13] Rachmawati D, Peferoen LA, Vogel DY, et al. Metal ions potentiate microglia responsiveness to endotoxin[J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 15(291): 89-95.
- [14] Jiang HW, Zhang W, Ren BP, et al. Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue [J]. *J Endod*, 2006, 32(8): 747-751.
- [15] Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, et al. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp[J]. *J Endod*, 2007, 33(10): 1183-1186.
- [16] Veerayuthwilai O, Byers MR, Pham TT, et al. Differential regulation of immune responses by odontoblasts[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, 22(1): 5-13.
- [17] He W, Qu T, Yu Q, et al. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells[J]. *Int Endod J*, 2013, 46(2): 128-136.
- [18] Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, et al. TLR4 mediates LPS - induced VEGF expression in odontoblasts[J]. *J Endod*, 2006, 32(10): 951-955.
- [19] Park JH, Kwon SM, Yoon HE, et al. Lipopolysaccharide promotes adhesion and migration of murine dental papilla-derived MDPC-23 cells via TLR4[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(2): 277-281.
- [20] Levin LG, Rudd A, Bletsa A, et al. Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer in vitro[J]. *Eur J Oral Sci*, 1999, 107(2): 131-137.
- [21] Horst OV, Tompkins KA, Coats SR, et al. TGF-beta1 Inhibits TLR-mediated odontoblast responses to oral bacteria[J]. *J Dent Res*, 2009, 88(4): 333-338.
- [22] Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity[J]. *J Dent Res*, 2000, 87(3): 256-261.
- [23] Wadachi R, Hargreaves KM. Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection[J]. *J Dent Res*, 2006, 85(1): 49-53.
- [24] Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, et al. LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons[J]. *J Dent Res*, 2011, 90(6): 759-764.

(编辑 张琳,陈蕾)

· 短讯 ·

《口腔疾病防治》获得国际期刊刊名代码

2016年11月,《口腔疾病防治》杂志获得美国国际CODEN服务部分配的国际期刊名称代码:KJFOA4。它标志着《口腔疾病防治》得到国际科技期刊界的认可。本刊从2016年第24卷第11期起,将CODEN码印刷在期刊封面右上角国际标准刊号ISSN 2096-1456和国内统一刊号CN 44-1724/R下方。

国际期刊刊名代码即CODEN码,是一种以期刊刊名的缩写为基础的代码形式,是由美国材料试验学会(ASTM)制定的科技期刊代码,全码由6位组成。CODEN码具有唯一性,是在世界范围内识别某一种期刊的国际性编码,在国际上公认并被广泛使用。国外多种文献数据库,如美国《工程索引》(EI Compendex)、《化学文摘》(CA, Chemistry Abstracts)、《乌利希国际期刊指南》(Ulrich's IPD)、英国《科学文摘》(SA, INSPEC)等文献数据库,以及各国图书馆收藏部门均采用CODEN码进行文献/期刊识别。目前国内一些大型文献数据库也将CODEN码列为数据库记录中的重要字段。

因此,CODEN码KJFOA4的获得使《口腔疾病防治》在国内、外检索和引用中又增加了一个重要标识,对创建精品科技期刊、推动科技期刊走向国际化具有重要的作用和深远的影响。