

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis



牙髓幹細胞與牙齒神經發育的關係

The Relationship between Dental Pulp Stem Cells
and Tooth Innervation

張書亞

Shu-Ya Chang

指導教授：陳敏慧 博士

Advisor: Min-Huey Chen, Ph.D

中華民國 108年 7月

July 2019

致謝



三年的時間接近尾聲，要特別感謝指導老師陳敏慧博士和前輩陳蓉書博士耐心且細心的指導和協助。過去這些研究的日子並沒有很順遂，但許多的挫折和挑戰帶給我許多的磨練，在各方面都不斷成長。臨床方面也謝謝李伯訓醫師的指導，讓我獲益良多。

感謝玉芳老師忍耐我許多的打擾，讓我在困難時可以請教，得到許多可以讓自己實驗度過難關的寶貴指點。

感謝逸平老師慷慨地出借實驗物品讓我可以順利地做實驗，也同時給我指點。

感謝容慈學姊在我卡在一些癥結點時不吝嗇地分享許多建議。

感謝勝豪學長在我挫折時聽我發些牢騷，也不忘給我鼓勵。

感謝宜鄉姊在我做實驗不順碎碎念時，幽默風趣地給我一些支持。

感謝助理柔芳姊在實驗室中大大小小的協助，幫助我們可以更無後顧之憂地專心在實驗上。

感謝善立學長在我學染色時分享了珍貴的經驗談。

感謝吳穎學長在忙碌的博班研究生活中依然很有活力的感染我，且給我幫忙。

感謝容慧的陪伴和許多協助，在彼此都很忙碌時能夠彼此幫忙，互相打氣。

特別感謝我的父母，謝謝你們的支持和了解。雖然你們不太懂我的實驗在做些什麼。但你們一句鼓勵的話就可以讓我記得許久，也讓我沒有中途放棄而是堅持到最後。

中文摘要



牙齒的神經發育是很重要的議題，由之前的研究可知牙齒神經隨著牙冠與牙根的形成而出現在牙髓腔之內。牙髓幹細胞來自牙髓組織，根據研究能在體外具有神經分化能力，可作為幹細胞的替代來源，具有表達CD146 的特徵，且是外胚層來源，起源於遷移的神經脊細胞和擁有間葉幹細胞的特性，有分化為成牙本質母細胞，骨細胞/骨細胞胚細胞，脂肪細胞，軟骨細胞和神經細胞的潛力。因此我們推測神經的生長可能與牙髓腔內的牙髓幹細胞有關係。所以，本研究的目的是探討和觀察牙髓幹細胞在牙齒神經支配中的角色。

本實驗方法是使用螢光染色和注射螢光染劑的方式，觀察牙髓幹細胞、神經幹細胞、牙髓神經和神經生長椎在老鼠出生後第四天和第八天在牙胚中的位置分佈和量，觀察這兩個不同時間點這些標記之間的關係。

實驗發現出生後四天的牙胚結果顯示神經纖維在牙胚外，並未進入牙髓中。出生後八天在牙胚內外都有神經纖維，且已進入牙髓中。

出生後四天和八天的牙胚中結果顯示神經幹細胞免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。

出生後四天和八天的牙胚結果顯示牙髓幹細胞在牙胚中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。

出生後四天牙胚中結果顯示神經生長錐在牙囊外圍是免疫反應陽性。出生後八天的牙胚在牙胚齒頸部免疫反應陽性的量較多且牙髓中有少量免疫反應陽性。

經第四天至第八天的白齒牙胚觀察到神經慢慢從牙胚外進入牙胚內。神經幹細胞一直出現在成牙本質細胞和其突觸的位置；此外，也一直有牙髓幹細胞出現在牙髓中。神經生長錐則由牙胚外慢慢往牙胚齒頸部移動。由實驗結果可

以推測幹細胞和神經向牙髓內生長有相當大的關係，且牙髓內應具有神經分化潛力相關的類神經幹細胞。

關鍵字：人類牙齒發育、老鼠牙齒發育、牙髓幹細胞、牙髓神經、免疫螢光染色



英文摘要



The neurodevelopment of teeth is an important issue. It is known from previous studies that the growth of dental nerves occurs in the pulp cavity with the formation of crowns and roots. The dental pulp stem cells are derived from pulp tissue and can be studied in vitro. They have the abilities to be differentiated into nerve cells and can be used as an alternative source of stem cells. They have the characteristic of expressing CD146. These stem cells are derived from the ectoderm, which are originated from the migrating nerve ridge cells and possess the characteristics of mesenchymal stem cells. They can be differentiated into odontoblasts, osteocytes/osteocyte blasts, fat cells, chondrocytes and nerve cells. Therefore, we hypothesize that nerve growth may be related to dental pulp stem cells in the pulp cavity. The purpose of this study was to investigate and observe the relationship between dental pulp stem cells and teeth innervation.

Immunofluorescence staining and injection of fluorescent dye were used to observe the distribution of dental pulp stem cells, neural stem cells, pulp nerves and nerve growth cone in the tooth germ of mice on the fourth and eighth day after birth. The relationship between these markers at these two different time points was observed.

The results showed that in the tooth germ of mice at four days after birth showed that the nerve fibers were outside the tooth germ and did not enter the pulp. Eight days after birth, there are nerve fibers inside and outside the tooth germ, and they have entered the pulp.

In both the four-day and eight-day tooth germs It was shown that the immunostaining of neural stem cell was positive in the odontoblasts and their processes



we also found that dental pulp stem cells were positive for immunoreactivity in microvascular endothelial cells inside and outside of dental pulp in both the four-day and eight-day tooth germs.

In the tooth germ four days after birth showed that the nerve growth cone was immunoreactive at the periphery of the tooth follicle. The tooth germs that were eight days after birth had more immunoreactive effects on the tooth germ and a small amount of immunoreactivity in the pulp.

From the fourth to the eighth day, the nerve was observed to enter the pulp from the outside of the tooth germ slowly. Neural stem cells continue to appear in odontoblasts and their processes. Stem cells have also been found in the pulp. The nerve growth cone moves from the outside of the tooth germ to the cervical of the tooth germ. From the results, it can be inferred that stem cells have relationship with the growth of nerves in the pulp, and might have neural stem cells related properties with potential for neural differentiation in the pulp.

◦

Keywords:

Human Tooth development, Mouse Tooth development ,Dental pulp stem cells,

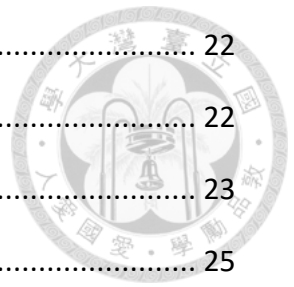
Nerve of pulp, Immunofluorescence staining

目 錄



致謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	v
目 錄	vii
圖次目錄	ix
第一章 引言	1
1. 牙齒發育	1
1.1 牙齒發育的起始和階段	1
1.2 老鼠牙齒胚胎發育	3
1.3 牙齒神經發育	7
1.4 牙齒神經支配	9
2. 幹細胞	11
2.1 牙髓幹細胞	11
2.2 神經幹細胞	13
3. 神經因子, receptor	14
4. 幹細胞表面標記	16
4.1 CD146	16
5. 神經表面標記	17
5.1 巢蛋白(Nestin))	17
6. 神經介紹	18
7. Growth associated protein(GAP-43):	18
8. AM1-43 mechanism:	20
第二章 實驗假說，實驗目的，特定目標	21

第三章 材料與方法	22
1. 實驗流程圖	22
2. AM1-43，石蠟包埋	23
3. 免疫螢光染色	25
4. 材料	26
5. 共軛焦顯微鏡	27
第四章 結果	28
第五章 討論	30
1. AM1-43 反應陽性的時間和位置	30
2. 巢蛋白(Nestin)反應陽性的時間和位置	30
3. CD146 免疫反應陽性的時間和位置:	32
4. 生長相關蛋白 43 (GAP-43) 免疫反應陽性的時間和位置:	33
第六章 結論	34
第七章 未來研究方向	35
第八章 參考書目	51



圖次目錄



圖 1- 1 Bud stage(Avery and Chiego 2006)	2
圖 1- 2 Cap stage(Avery and Chiego 2006).....	2
圖 1- 3 Bell stage(Avery and Chiego 2006).....	2
圖 1- 4 老鼠齒列示意圖	4
圖 1- 5 牙齒神經發育過程圖	8
圖 3- 1 實驗流程圖	22
圖 3- 2 ICR mouse	24
圖 3- 3 ICR mouse 解剖下頷	24
圖 4- 1 Nestin、CD146、GAP-43、Nerve 的 P4 和 P8 比較圖	29
圖 4- 2 P4 Nestin	36
圖 4- 3 P4 Nestin	36
圖 4- 4 P4 Nestin control	37
圖 4- 5 P8 Nestin	37
圖 4- 6 P8 Nestin(1).....	38
圖 4- 7 P8 Nestin(2).....	38
圖 4- 8 P8 Nestin(3).....	39
圖 4- 9 P8 Nestin control	39
圖 4- 10 P4 CD146.....	40
圖 4- 11 P4 CD146(1)	40
圖 4- 12 P4 CD146(2)	41
圖 4- 13 P4 CD146(3)	41

圖 4- 14 P4 CD146 control.....	42
圖 4- 15 P8 CD146.....	42
圖 4- 16 P8 CD146(1)	43
圖 4- 17 P8 CD146(2)	43
圖 4- 18 P8 CD146(3)	44
圖 4- 19 P8 CD146 Control	44
圖 4- 20 CD146 positive control: blood vessels in human pulp	45
圖 4- 21 P4 GAP-43	45
圖 4- 22 P4 GAP-43(1)	46
圖 4- 23 P4 GAP-43(2)	46
圖 4- 24 P4 GAP-43(3)	47
圖 4- 25 P4 GAP-43 Control	47
圖 4- 26 P8 GAP-43	48
圖 4- 27 P8 GAP-43(1)	48
圖 4- 28 P8 GAP-43(2)	49
圖 4- 29 P8 GAP-43(3)	49
圖 4- 30 P8 GAP-43 Control	50
圖 4- 31 GAP-43 Positive Control: human pulp Raschkow plexus	50

第一章 引言



1. 牙齒發育

1.1 牙齒發育的起始和階段

牙齒主要由兩種類型的細胞發育：

(1) 口腔上皮細胞形成釉質器官(enamel organ)。

(2) 間葉細胞形成牙乳頭(dental papilla)。

人類在第五週胚胎發展，口腔上皮變厚，沿著未來的牙拱形成牙板(dental lamina)。神經嵴細胞來自神經組織早期發育時且遷移進入下顎，與間葉細胞混合，有助於牙齒發展。牙釉質從釉質器官發展而來，牙乳頭形成牙本質。上皮細胞和間葉細胞的相互作用對牙齒的萌生和形成相當重要。

牙齒形成是一個連續不間斷的發展過程，主要分為三個階段分別為芽(bud stage)，帽(cap stage)和鐘階段(bell stage)。每個階段都是根據上皮釉質的形狀定義器官，是發育中牙齒的一部分。芽階段始於第八週，間質神經嵴誘導十個上下牙板的牙胚發展，牙板在間質內長成芽包狀，局部增長的上皮細胞被增生的間葉組織包圍，逐漸地增大，慢慢開始進入帽階段。在胚胎發育的第九週，牙齒從牙板分化為帽狀瑱瑒器官，前庭牙板發展為嘴唇或臉頰。在帽階段(cap stage)，上皮細胞生長不均勻且向下生長，在間質周圍產生凹陷形成牙乳頭；乳頭細胞被認為在促進牙釉質器官形成帽和鐘階段方面具有重要意義。牙乳頭細胞密度隨著釉質器官的生長得以保持，研究發現牙乳頭細胞應該是成纖維細胞，且是一個精緻的網狀物。

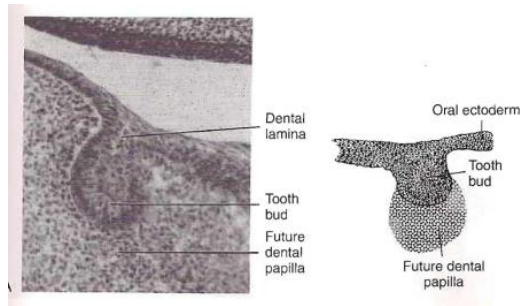


圖 1- 1 Bud stage(Avery and Chiego 2006)

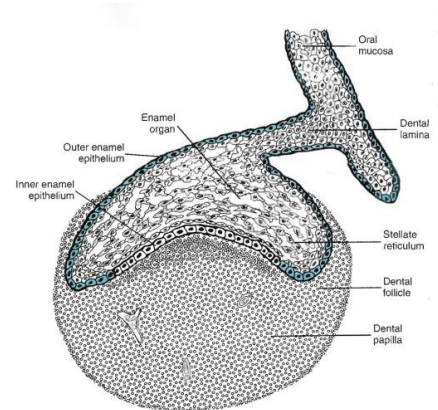


圖 1- 2 Cap stage(Avery and Chiego 2006)

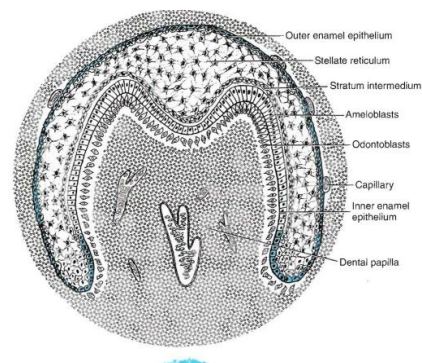


圖 1- 3 Bell stage(Avery and Chiego 2006)

其他間質細胞包圍釉質器官形成牙囊。且釉質器官一直附著在椎板(lamina)上，間葉組織形成牙乳頭，成為牙髓。圍繞這兩個結構的組織是牙囊(dental follicle)。牙乳頭和牙釉質進一步生長後達到形態分化和組織分化階段，也就是鐘階段。

細胞分化在鐘形期間變得明顯，可以區分為內釉上皮(internal enamel epithelium)和外釉上皮(external enamel epithelium)。內釉的細胞上皮，未來將成為成釉細胞，在頸環(cervical loop)附近分化最少，在牙尖分化最多。釉質器官



的內部包括星狀網(stellate reticulum)，緩衝層，連續的薄層，薄層將產生由牙板而來的牙齒。

在此階段，內釉質上皮細胞其特徵在於它們形成的牙齒的形狀。而且，牙釉質器官的細胞具有不同的細胞分化為外釉質上皮細胞，它覆蓋了牙釉質器官和內部琺瑯質上皮細胞，成為琺瑯質；在這兩個細胞層之間是星狀網狀細胞。

釉質器官中的第四層由中間細胞(Stratum intermedium cells)組成。這些細胞位於內部釉質上皮細胞附近。他們協助成釉細胞形成牙釉質。外釉質的功能上皮細胞組成一個毛細血管網絡給成釉細胞帶來營養，營養成分從外層釉質上皮通過星狀網到達成釉細胞。在鐘形期間，牙乳頭周圍的細胞成為成牙本質細胞。

牙乳頭細胞引起前成釉細胞促成牙本質細胞的分化。血管出現於牙乳頭早期，起初在中央區域且伴有神經纖維，帶來營養促進牙釉質器官快速生長。牙乳頭生長後在周邊也看到了較小的血管，為延長的牙本質母細胞帶來營養。細胞變化導致中央乳頭周圍形成硬殼。發生這種情況時，乳頭被稱為牙髓。

牙本質母細胞(Odontoblast)在開始生產牙本質之前稱為前牙本質母細胞(Pre-odontoblast cells)，這些細胞是由間葉細胞分化而來。由於牙本質母細胞伸長並且變成柱狀，它們形成的膠原蛋白基質纖維被鑑定為前牙本質。24小時後，這個基質鈣化並變成牙本質；當牙本質增量形成時，分化的成釉細胞沉積釉質基質。

牙本質生成總是先於釉質生成。之後釉質器官分化，牙板開始裂解而退化。(Avery and Chiego 2006)

1.2 老鼠牙齒胚胎發育

實驗室小鼠(Mus musculus)是牙齒發育研究中最常見的模型動物，具有多種衍生牙列。它缺少犬齒和前臼齒，在頷骨的兩側各有一個門牙和三個臼齒由diastema分開，且小鼠門牙連續生長但牙齒沒有更換。

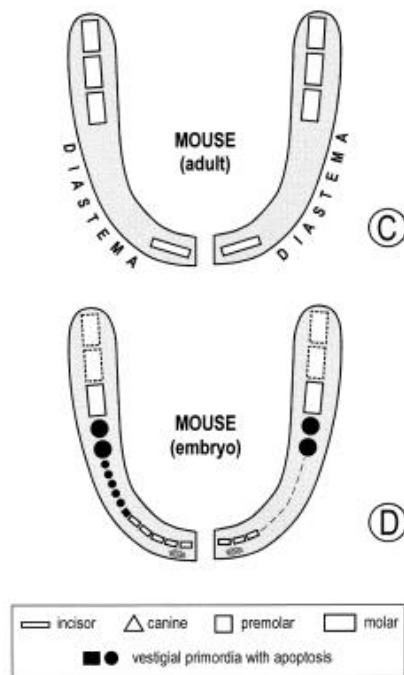


圖 1-4 老鼠齒列示意圖

(Peterkova, Peterka and Lesot 2003)

牙齒從上皮和間充質組織發展為外胚層附屬物。在所有發育步驟期間，透過複雜的細胞 - 細胞信號傳導網絡來調節牙齒器官發生。牙齒硬組織、牙本質、牙釉質和牙骨質由獨特的細胞類型形成，其分化與形態發生有密切關聯 (Fraser et al. 2009, Tummers and Thesleff 2009)。牙齒從牙板開始，首先是在胚胎第十一天(E11)，一層上皮發現在未來會形成牙齒位置的組織切片中。當上皮出芽開始時，第一個信號中心出現在牙基板(Dental placode)上；隨後，在從芽過渡到帽階段時，出現釉質結信號中心。

牙齒由兩個組織成分引發：表面上皮和下層間質。間質來源於顱神經嵴細胞遷移到鼻前過程和第一個鰓在哺乳動物中，上皮來自外胚層。小鼠胚胎牙板可以透過觀察幾種轉錄因子和信號分子的局部表達。Pitx2 是牙齒上皮細胞及其表達的最特異標記，在牙冠發育期間，持續存在於所有上皮細胞中(Mucchielli et al. 1997)

在胎膜中的其他轉錄因子包括 Foxi3(Shirokova et al. 2013)，Dlx2，Lef1 和 p63，它們與 Pitx2 一起可能與口腔上皮中的牙齒命運和牙源性潛能的獲得有關。牙板也表達信號分子，如 Shh，Bmp2，Bmp4，Bmp7，Fgf8，Fgf9，Wnt10a，和 Wnt10b(Dassule and McMahon 1998)，可能從上皮到間質的牙源性

潛力有調解者的作用。小鼠第一顆牙齒的成形是從基板(Dental placode)開始，出現在胚胎後第十二天 E12 小鼠胚胎中局部增厚在門齒和白齒區域(Biggs and Mikkola 2014, Jussila and Thesleff 2012)。

牙齒發育成上皮附屬物與其他外胚層一起開始和成形的步驟相同的調節分子。然而，與許多其他人類上皮不同，人類牙齒沒有再生能力。

此後，第二和第三白齒（M2 和 M3）在第一白齒（M1）後發育。許多牙板基因的表達變得局限於牙板，包括 Pitx2 和 Foxi3，以及幾種與信號通路相關的信號。值得注意的是，信號的表達例如 Shh，Wnt10，Bmp2 和 Fgf20 稱為早期信號傳導中心的基板細胞(Haara et al. 2012, Jussila and Thesleff 2012, Keranen et al. 1999)。這些信號調節了牙芽的基板上皮增殖和向下長。

牙齒發育中的早期信號傳導事件是通過來自上皮的 Bone morphogenetic protein (BMP)和 Fibroblast growth factor (FGF)誘導牙源性間充質。組織重組研究顯示，上皮信號在間質中有誘導隨後牙齒形態產生的能力。BMP 和 FGF 誘導幾種間充質轉錄因子的表達，其中許多是牙齒繼續發育所必需的。不同組織和不同時間對相同信號的細胞反應的變化，是由細胞的不同歷史決定其接收和響應信號的能力(Thesleff 2003)。受不同信號調節的基因包括轉錄因子和信號受體，它們調節細胞對下一個信號的反應能力，以及相互作用的新信號，繼續細胞和組織之間的通訊(Jernvall and Thesleff 2000, Thesleff and Mikkola 2002)。

下一個信號中心，稱為琺瑯結(Enamel knot)，形成於芽尖，其特徵是細胞從細胞週期中排出（p21 的表達）以及信號分子的局部表達和信號通路相關的基因。信號刺激了生長產生頸環(Cervical loop (CLs))和牙齒的側翼上皮使牙齒從芽到帽階段發展。琺瑯結成熟並成為形態上可辨別的特徵，是很多不同信號的來源(Jussila and Thesleff 2012)。來自琺瑯結的信號影響兩者上皮細胞和間質細胞，以及隨後的相互作用；間質和上皮之間的影响維持牙釉質結以及隨後的形態發生上皮細胞。來自牙釉質結的 SHH 信號需要生長上皮頸環對牙釉質結構有影響。

之後的鐘形階段，上皮生長和折疊決定牙冠的形狀和大小。在白齒，二次琺瑯質在上皮細胞中誘導，它們充當信號傳導中心，顯示出與初級牙釉質結相同的信號。它是次要的琺瑯結，決定特徵和寶尖的高度位置和高度。(Jernvall

and Thesleff 2012)。(Balic and Thesleff 2015)

鐘形期間內釉質上皮的生長和折疊決定了牙冠的大小和形狀，形狀變得固定。當牙本質和牙釉質的有機基質礦化時，牙本質或牙釉質的重塑就不會發生了。

當牙冠發育後開始形成牙根，成釉細胞分化到達未來冠根邊界，內釉上皮細胞不再分化為成釉細胞，相反的，他們形成 Hertwig 的上皮根鞘 Hertwig's epithelial root sheath (HERS) 與外層釉質上皮。Hertwig 的上皮根鞘 (HERS) 擴散並向下遷移引導根系形成，它也引起了不同的成牙本質細胞形成根牙本質。Hertwig 的上皮根鞘 (HERS) 有一個有限的增長潛力，決定了牙根長度。(Nanci 2008)

神經嵴衍生的間質變為特定的間質凝結在花蕾周圍並產生除牙釉質外的所有牙齒組織。上皮芽在(其)尖端，其頸環長大到包圍牙乳頭間質，產生了牙髓和成牙本質細胞形成牙本質。在信號分子方面，旁分泌信號分子由幾種保守的介導細胞溝通牙齒間的發展；他們中的大多數都屬於轉化生長因子 Transforming growth factor β (TGF β)，成纖維細胞生長因子 Fibroblast growth factor (FGF)，Hedgehog 和 Wnt 家族。雖然信號主要調節相互作用在外胚層和間質之間，他們還調解內部的組織層。

Ectodysplasin，一種最近在腫瘤壞死因子 Tumor necrosis factor (TNF) 家族中識別的信號分子，其受體 Edar 介導 (Edar mediate) 牙胚中外胚層區室 (ectodermal compartments) 之間的信號傳導 (Jernvall and Thesleff 2000, Thesleff and Mikkola 2002)。

目前組織之間的交流被認為是調節牙齒以及所有其他器官發育的最重要機制。這種交流是相互的，並在器官的形態發生過程中持續。最重要的信號分子屬於四個主要家族之一，有趣的是這些信號在整個進化過程中都是保守的，並且它們調節所有動物的器官發育。這些信號家族是 WNT，骨形態發生蛋白 Bone morphogenetic protein (BMP)，Hedgehog (HH) 和成纖維細胞生長因子 Fibroblast growth factor (FGF)。此外，需要一種稱為 ectodysplasin (EDA) 的信號，特別是需要從胚胎表面發育的牙齒和其他器官的發育，如毛髮和腺體。Ectodysplasin (EDA) 和上面提到的四個信號系列對於牙齒發育是必需的：阻斷這

些家族的信號傳導將造成牙齒發育停滯或受到干擾(Thesleff 2018)。



1.3 牙齒神經發育

目前有許多學者致力於牙齒神經發育的研究。在咀嚼系統中，牙齒是很重要的器官。牙齒是從上皮和間葉細胞發展出來，源自外胚層和神經脊。牙髓中的神經主要有感覺與交感神經，副交感神經幾乎不會出現在牙髓中，因此可以維持運作。(Moe et al. 2008)

根據研究指出，感覺神經主要源自感覺三叉神經節，主要調節痛覺。在不同物種中研究感覺神經的發展發現三叉神經神經纖維自芽階段(bud stage)之後在白齒牙胚旁邊；在第四天的老鼠下頷第一白齒牙冠形狀大部分都形成一層薄薄的牙釉質且牙本質已生成，這個時候神經進入牙髓中。(Sasano et al. 1995)

牙齒神經的發展主要是由上下牙槽骨神經進入上頷骨和下頷骨突起開始，在任何牙齒發育的組織學證據之前可以辨識出來。當牙板有形成，神經叢分支可見於增厚的口腔上皮下的間質。每個未來會有牙芽的確切位置是可辨識的。此後，特定的分支可以區分門牙和犬齒基。在芽階段牙齒原基，軸突末端與濃縮間質表示預期的牙乳頭。在帽階段牙齒原基，局部軸突形成牙乳頭附近的神經叢。接近那個階段軸突的末端進入牙胚的牙囊。(Moe et al. 2008, Kettunen et al. 2007)

在胚胎發育過程中，牙齒形成由上皮和神經嵴衍生的外胚間質細胞之間有順序的和組織相互作用調節。這種牙源性二次誘導由不同保守家族的信號分子調節。最近的分子和實驗數據提供了的證據，證明來自早期牙源性上皮的指導性信號也控制牙齒間質中的軸突導航。(Kettunen et al. 2007)

也有研究指出，不同牙齒的神經在不同時間進入牙髓中，例如當門牙牙本質形成時，就有神經進入牙髓中；但在白齒要等到一層薄薄的牙釉質形成後神經才進入。雖然神經早期是伴隨血管，但很多神經是單獨存在於牙髓中。(Mohamed and Atkinson 1983)

早期鐘形階段的牙原基被骨頭包圍和許多薄的軸突出現在牙囊中。當牙冠形成時，神經纖維主要在牙胚周圍且主要在間葉牙囊。神經分佈的最後一個階段主要是樹枝狀且會重新將現有的神經重組。因此，神經長入牙髓，然後神經

排列，之後神經長入到牙周需要藉著牙囊目標區的胚胎神經正常生長和長入。在鐘階段晚期進行釉質發生和牙本質發生，第一個軸突進入牙乳頭(Kollar and Lumsden 1979a, Lumsden 1982, Mohamed and Atkinson 1983, Pearson 1977, Tsuzuki and Kitamura 1991)，同時硬組織形成，牙髓軸突的數量增加。

牙齒萌發和根部形成伴隨著感覺牙髓軸突的快速發展，包括牙本質下 Raschko 叢和軸突末端的形成，前牙本質和牙本質。通過神經生長和分支的牙本質神經支配始於尖瓣的尖端，繞過其他神經牙本質域，然後蔓延到更多冠狀牙本質。當咬合已經確定時，牙尖端的大部分牙本質神經支配已經形成(Byers 1980)。牙髓基質中的一些軸突與血管相關(Bernick 1959, Byers 1980, Mohamed and Atkinson 1982, Wassermann 1939)完成功能性咬合後，牙髓軸突在一段時間內繼續緩慢增加。(Kettunen et al. 2007)

當牙根開始生長，源自上頸神經節的交感神經也出現在牙髓。(Luukko and Kettunen 2014)

感覺神經主要在牙髓牙本質交界區，神經纖維主要在牙本質下叢，牙本質細胞層，前牙本質，牙冠內牙本質小管。感覺神經末梢主要在牙髓角中，甚少在牙髓周圍或是牙根的牙本質。源自三叉神經的感覺神經主要藉由痛感覺保護牙齒，有些則是跟機械感覺刺激有關。從上頸神經節(superior cervical ganglion)來的交感神經主要伴隨著血管且主要與調節血管有關。(Luukko and Kettunen 2014)

有研究的結果是牙髓的先鋒交感神經支配在出生後第 9 天開始，接著是感覺神經支配。(Moe et al. 2008)

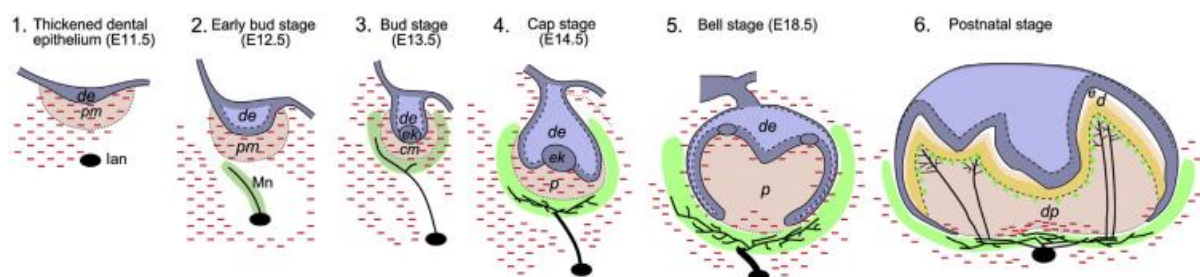


圖 1-5 牙齒神經發育過程圖

(Luukko and Kettunen 2014)

對於牙齒神經發育有許多相關研究，有研究指出在生長的鼠白齒期間敏感

性增加與根尖閉合和牙本質神經支配密度增加有關。顯然，牙髓和牙本質神經支配的發展與牙齒的發育密切相關。因此，感覺神經支配的形成在乳牙中比在恆牙中更快發展。在大鼠和小鼠的白齒中，它們在少數幾個是萌發幾週後，大多數感覺神經支配在萌發後一個月內形成。在人類的牙齒中，在根尖閉合前經過了幾年，並且神經成熟相應緩慢。(Byers 1984, Fried and Hildebrand 1981a, Fried and Hildebrand 1981b, Johnsen and Karlsson 1974)。

乳牙小於恆牙，並且在完全發育的乳牙和恆牙中每單位牙齒重量的軸突數量相似。因此，軸突數量差異可能是次級差異(Johnsen and Karlsson 1974)。直到乳牙開始吸收，齒內軸突的發育解剖結構在初級和恆牙中大致相似(Johnsen and Karlsson 1977, Mohiuddin 1950)。然而，在那時，原發性牙髓軸突退化，而永久性牙髓軸突繼續發展(Naftel, Qian and Bernanke 1994)。當神經生長到牙本質的初始階段之後，由於磨損和形成次級牙本質，牙尖端的軸突逐漸喪失。淨效應是從年輕白齒尖端受神經支配的牙本質位置逐漸轉變為在較老的白齒中的中間角和根部水平的牙本質(Byers 1980, Byers 1984, Byers, Neuhaus and Gehrig 1982, Taylor and Byers 1990)。這種轉變仍在繼續，最終導致牙齒老化中牙髓軸突的損失。(Hildebrand, Schaller and Parsons 1995)

有研究鑑於 Schwartz 建議神經與幹細胞之間可能存在相關性，因此在神經分支數之間和牙類的數量，此篇研究了一個大樣本 - 3 個月的胎兒闡明神經分支模式的性質和神經分支的發展初級牙列（即“暫時”門牙，犬齒和白齒，以及牙齒第一個“永久”白齒）。與預期相反，神經分支的圖案變化是規則的。如果神經纖維確實在牙齒發育中起作用，那就是它只能在啟動時，明確的神經支配發生在牙齒發育較晚期。(Winkler, Schwartz and Swindler 1991)

1.4 牙齒神經支配

神經有不同種類，例如：無髓鞘，有髓鞘的感覺神經和無髓鞘的交感神經元，支配神經元成熟的牙齒。感覺神經起源於三叉神經神經節，而交感腎上腺素神經來自上頸椎神經節(Luukko et al. 1997)。(Luukko 1997)

有髓鞘和無髓鞘軸突混合後從牙髓中進入牙髓尖。雖然大多數這些纖維支

配牙髓，其中一些通過牙本質小管進入牙本質。 感官神經纖維傳遞到中樞神經系統，交感神經調節血液流入牙髓並參與牙本質生成。 一開始來自三叉神經的纖維神經位於牙齒基板或牙齒原基下方。(Johnsen 1985)

研究中發現，來自假定牙齒區域的三叉神經纖維的缺失表明它們不參與大鼠牙齒發育的起始。 此外，神經纖維的定位表明與人和小鼠牙齒相比，大鼠牙齒的神經支配存在一些差異，帶來了進一步研究胚胎大鼠牙齒神經支配的調節 (Luukko et al. 1997)。(Luukko 1997)

牙髓內部包括傳導感覺脈衝的傳入神經元和傳出的自主神經纖維，主要提供對牙髓中血流的神經原性調節。 有髓鞘的軸突大多在 1-4 μm 直徑範圍內 (周長為 3-10 μm)，與疼痛感覺功能一致。 然而，一小部分有髓鞘軸突大於疼痛感覺纖維的預期大小 (Johnsen 1985)。根據研究指出，芽和帽階段，神經纖維在牙齒上皮和乳頭中不存在，而正在發育的牙囊有高度神經支配。當牙本質沉積開始時，第一個軸突穿透牙髓開始。大量的神經元向內生長將有助於豐富的牙髓神經支配，而這些神經支配在牙齒萌發後完成。

發育中的神經支配與個體牙齒的發育階段相關，而不是與小鼠的實際年齡相關。在萌芽階段，神經接近發育中的牙乳頭，到帽階段時，在牙乳頭下方形成基底叢。來自該神經叢的神經纖維在開始發育時擴散到牙囊中。 牙冠形成開始，當神經支配相當迅速時，神經才進入牙乳頭(Dental papilla) (Mohamed and Atkinson 1983)。

在發育過程中，三叉神經纖維以高度時空控制的方式引導並建立其在發育中牙齒的位置。

Semaphorin3A(Sema3a)在第一個牙齒神經纖維到達前在牙齒間質中表達，或許可以協調軸突引導和牙齒形成。 此外，研究結果指出牙源性上皮具有控制牙齒神經供應形成的信息。(Luukko, Kvinnsland and Kettunen 2005)

神經支配在牙齒萌發和發育中的作用是有爭議的。 有研究發現從發育的早期階段開始，在發育中的牙齒上皮附近不存在神經纖維。(Luukko et al. 1997, Pearson 1977)

有研究使用胚胎小鼠組織的銀染色支持了在牙齒出現之前存在神經支配的觀點。這些結果顯示在小鼠外周神經系統中存在早期的軸突束，可用於導引後

來分化的神經元，包括三叉神經節的移植物之間的牙齒形成發生率沒有顯著差異。結論是，神經支配在確定牙齒發育中不起作用。(Kollar and Lumsden 1979b, Pagella, Jimenez-Royo and Mitsiadis 2014)

有研究發現神經支配牙髓的組成由兩相?組成：

(1) 神經纖維線性沿著血管穿透進入牙髓內血管

(2) 神經纖維往冠狀牙本質發芽和延伸。(Nishikawa 2007)

另有研究結果發現，口腔環境中的熱變化導致快速移位牙本質管內容物，導致疼痛。這種效應，稱為流體動力學效果，是熱-牙髓測試中疼痛感的調節劑。數以百計的軸突從根尖孔進入牙齒，為其提供感覺供應。神經牙本質 - 牙髓複合體的供應主要由 A 纖維 (δ 和 β) 和 C 纖維組成，根據它們的直徑和傳導速度對它們進行分類：A 纖維主要受寒冷刺激，產生劇烈疼痛，而 C 纖維的刺激會產生暗沉的疼痛。因為他們的位置和排列，C 纖維引起疼痛。(Abd-Elmeguid and Yu 2009b, Abd-Elmeguid and Yu 2009a)

2. 幹細胞

2.1 牙髓幹細胞

人類牙幹細胞包括人類牙髓幹細胞 (DPSCs)，牙周韌帶幹細胞 (PDLSCs) 和根端乳頭幹細胞，可在體外具有神經分化能力。相關研究所提供的數據支持使用人類牙科幹細胞作為幹細胞的可能替代來源，用於治療神經疾病的治療用途 (Lee et al. 2014)

來自人類脫落的乳牙 Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) 的幹細胞高度增殖，具有神經嵴細胞起源(Neural-crest cell origin)的克隆(Clone)形成和多能幹細胞(Multipotent stem cell)。此外，與其他間質幹細胞 Mesenchymal stem cells (MSCs) 來源相比，其收集具有微創性。因此，脫落的乳牙幹細胞 SHED 可能是有潛力的治療理想選擇。在這項研究中，脫落的乳牙幹細胞(SHEDs)是由 6 至 9 歲的孩童酶分解的乳牙髓建立的。經由 FACS 分析評估，得知脫落的乳牙幹細胞(SHED)具有典型的成纖維細胞形態並表達抗原

MSCs，STRO1，CD146，CD45，CD90，CD106 和 CD166 的特徵，但不是造血細胞和內皮標記，CD34 和 CD31。

透過差異化評估得知脫落的乳牙幹細胞(SHED)具有強烈的成骨和脂肪形成潛力。為了進一步評估體外脫落的乳牙幹細胞 Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) 分化為神經細胞的潛能，使用一種簡單的短時生長因子誘導。

免疫螢光染色和流式細胞儀分析表明脫落的乳牙幹細胞 Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) 可迅速表達 Nestin 和 β -III tubulin，之後表達中間神經標記物。此外，Nestin 和 β -III tubulin 和成熟神經標誌物 (polysialic acid-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM)，Neuronal nuclei(NeuN)，Tau，Tyrosine hydroxylase(TH)或 Glial fibrillary acidic protein(GFAP)) 在治療後的強度和百分比顯著增加。(Nourbakhsh et al. 2011)

再生醫學的出現使人類器官功能有機會再生，修改和恢復。幹細胞，再生醫學中的關鍵資源，被定義為克隆，自我更新，可以生成一種或多種特定細胞類型的細胞的先驅細胞。

幹細胞分為三大類：胚胎幹細胞 Embryonic stem cells (ESCs)，誘導多能幹細胞 Induced pluripotent stem cells (iPSCs) 和成人/產後幹細胞 Adult/postnatal stem cells (ASCs)。現在評論性文章將注意力集中在成人/產後幹細胞 ASC 上，這些成人/產後幹細胞 ASC 已經被認定存在於許多口腔組織如牙髓、牙周組織韌帶、囊泡、牙齦、牙槽骨和牙乳頭。人的牙髓幹細胞 (hDPSCs) 是外胚層來源的幹細胞，起源於遷移的神經嵴細胞和擁有間葉幹細胞的特性。

過去十年中，人的牙髓幹細胞 hDPSCs 由於其可以分化成幾種細胞表型，在組織領域受到廣泛關注。這篇評論仔細描述了人的牙髓幹細胞 hDPSCs 分化為牙本質母細胞、骨細胞/骨細胞胚細胞、脂肪細胞、軟骨細胞和神經細胞的潛力。(Nutti et al. 2016)

最近報導了人類根尖週囊腫 Human Periapical cysts (hPCys)，一種常見的牙源性炎症性囊性病變，含有間葉幹細胞 Mesenchymal stem cells (MSCs)，具有自我更新和多向分化的能力。在這項研究中，根尖周炎將炎症性囊腫與牙髓進行比較，以確定該組織是否可能是替代的可接觸組織來源保留神經原性分化潛能

的間葉幹細胞 MSC。流式細胞儀和免疫螢光分析可鑑定 hPC。

MSCs 和牙髓幹細胞和神經乾/星形膠質細胞特異性蛋白質膠質纖維酸性蛋白 neural stem-/astrocyte-specific protein glial fibrillary acidic protein (GFAP) 在分化前的基礎狀態表達神經元特異性蛋白 β -III 微管蛋白(neuron-specific protein β -III tubulin)。(Marrelli, Paduano and Tatullo 2015)

在這篇研究中描述了自我更新能力，牙髓幹細胞 (DPSCs) 有多譜系分化能力(multi-lineage differentiation capacity)，和人牙髓的克隆效益(clonogenic efficiency)。牙髓幹細胞在體內能夠形成異位牙本質和相關的牙髓組織。原發性牙髓幹細胞移植的培養物重新建立基質樣細胞(Stromal-line cells)和重新培養移植到免疫功能低下的小鼠體內產生牙本質 - 牙髓樣組織，證明他們的自我更新能力。牙髓幹細胞也是發現能夠分化成脂肪細胞和神經樣細胞(neural-like cells)。牙源性潛在的 12 個單個菌落衍生的牙髓幹細胞株(single-colony-derived DPSC strains)被測定，三分之二的牙髓幹細胞株在體內產生豐富的異位牙本質，而剩下的三分之一只有檢測到限量的牙本質。這些結果表明單株衍生的牙髓幹細胞株不同於彼此的是形成牙本質的比率。綜合起來，這些結果證明牙髓幹細胞具有幹細胞之特性，包括自我更新能力和可塑性之分化能力。(Gronthos et al. 2002)

2.2 神經幹細胞

神經幹細胞不只存在於生長的哺乳類神經系統也存在於成年哺乳類(含人類)哺乳神經系統。神經幹細胞也可取自原始的胚胎幹細胞。

神經幹細胞可以藉由移植而修復失去的細胞，也可以活化內分泌細胞來提供“自我修復”。但在探討神經幹細胞的潛力之前，我們要先了解如何控制神經幹細胞增殖和分化。

有關調節內源性幹細胞的機制目前所知有限。利用幹細胞進行修復，可包括移植幹細胞進行修復有缺失的細胞，亦可藉幹細胞達到活化體內細胞的作用從而達到自我修復的效果。

在充分發揮神經幹細胞潛能之前，我們需要了解如何控制其增殖以及其各種子細胞的分化途徑。(Gage 2000)

根據研究指出，牙齒幹細胞已於體外和實驗動物神經系統的研究中有不錯的效果。源自神經脊的牙髓幹細胞傾向神經分化，也可分泌和製造神經滋養因子(neurotrophic factors)。牙髓幹細胞的再生潛力適合被用來研究其在神經疾病和組織受傷中所扮演的角色。

(Martens et al. 2013)

3.神經因子, receptor

根據研究指出，神經滋養因子保護神經元避免凋亡，刺激內分泌修復和軸突生成有關鍵的角色。根間乳突 Apical papilla 的幹細胞和牙髓幹細胞分泌蛋白體分泌大量的 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF)和其他許多因子。(Ratajczak et al. 2016)

神經生長因子 (NGF) 是一個目標衍生的營養因子，支持組織中的交感神經和感覺神經支配。雖然它的名字看起來只跟神經有關，NGF 可能具有更廣泛的生物功能，在廣泛的非神經元發育的早期分化細胞。NGF 的許多影響是直接的 - 依賴於 NGF 與特定的目標細胞上的膜受體初始結合(Mitsiadis et al. 1992)，被鑑定為對牙齒發育中神經軸突向目標生長的關鍵分子訊號；NGF 調節神經反應，且與蛀牙和創傷有關。(Berman and Hargreaves 2016, Chao 2003)

神經生長因子 (NGF) 對於神經元和非神經元細胞發育和分化是重要的。在更進階的發育階段，神經生長因子 NGF 和 TrkA 是在具有分泌能力的分化細胞中，例如前成釉細胞/成釉細胞分泌牙釉質基質和成牙本質細胞分泌牙本質基質。相比之下，這些分泌細胞沒有 p75NTR，並被限制在牙齒上皮的增殖細胞中。NGF 和 p75NTR 在人胚胎牙齒內與齧齒動物中觀察到的相似但不相同。

NGF, p75NTR, and TrkA 在牙本質生成過程中的表現形態顯示出 NGF 在上皮和間質細胞的分化和增殖、牙齒神經纖維的生長和吸引有調節的角色，NGF 並不只有與牙髓軸突向內生長有關。(Mitsiadis and Pagella 2016, Nosrat et al. 1998)

另外，據研究上皮間質細胞藉由 NGF 對 p75 神經營養蛋白受體(p75 neurotrophic receptor) (NGFR) 作用，促成牙齒發育相關的誘導(Mitsiadis et al. 1992, Byers et al. 1982)；NGF 也存在於成熟的牙髓組織中，參與創傷後的牙髓炎症反應和修復(Byers, Wheeler and Bothwell 1992)。但是，它在牙生理性牙齒磨損後的發育，控制神經支配和組織修復效果的作用目前還不清楚。

具有 p75 受體的 NGF 在牙齒中形成細胞信號傳導機制的一部分，包括發展，衰老和創傷(Byers, Schattelman and Bothwell 1990, Byers et al. 1992)，並主要在生理和病理生理條件下神經纖維的生長和發芽發揮調節作用(Byers et al. 1992, Mitsiadis et al. 1992)

與先前的研究一樣，發現在初級牙本質發生過程中成牙本質細胞和子成牙本質細胞中有 NGF 和 NGFR 的免疫反應性(Byers et al. 1990, Luukko et al. 1996, Mitsiadis et al. 1992)，顯示成牙本質細胞在初級牙本質發生和成熟組織中控制牙髓細胞的角色可能與成牙本質細胞層的幾個空間和功能特性有關，包括牙齒萌出前後管狀牙本質沉積的形成作用及其前後礦化的控制(Linde and Goldberg 1993)。神經嵴細胞的衍生(Ruch, Lesot and Begue-Kirn 1995)和形成特殊的細胞屏障，將牙髓與礦化的牙本質和/或口腔分離，藉由許多間隙連接將這一層中的細胞連接起來(Turner, Marfurt and Sattelberg 1989)。

有研究指出 NGFR-IR 存在於中央牙髓中的神經束和亞成牙本質區(pre-odontoblast)的小纖維。這可以解釋牙齒萌出後朝向成牙本質細胞層和牙本質的定向神經發育變得明顯。因此，牙本質母細胞層的獨特性質與其特殊 NGF 的表達可以提示它們對牙髓細胞和神經供應的控制。(Mahdee et al. 2019)

神經細胞凋亡期間，在小鼠中發生在 E13-E18(Davies 1988)，神經元需要較多的 NGF 用於存活。隨後的成熟期間，感覺神經元對神經營養蛋白的依賴性較小，但在某些情況下它們需要神經營養蛋白(Davies 1997, Lewin and Barde 1996)。例如，NGF 和 BDNF 可能參與外周軸突發芽和再生的調節(Diamond et al. 1987, Lindsay 1988)。

在形成牙髓神經支配期間和之後，NGF 存在於發育中的大鼠白齒牙髓中。(Byers et al. 1990, Mitsiadis et al. 1992, Naftel, Shamssoolari and Thueson 1992, Nosrat et al. 1998, Nosrat et al. 1997)

其他幾項研究也得出結論，NGF 對於牙髓神經發育至關重要。(Byers et al. 1990, Byers et al. 1992, Mitsiadis et al. 1993, Mitsiadis et al. 1992, Naftel et al. 1994, Naftel et al. 1992, Qian and Naftel 1996)。(Fried et al. 2000)

神經纖維滲入牙髓被認為涉及各種神經營養因子(Fried et al. 2000)，在這之中，神經生長因子(NGF)指導早期牙髓神經支配，因為當老鼠 *trkA* 神經生長因子缺乏時，白齒和門牙牙髓中會缺乏感覺神經。.(Matsuo et al. 2001)

4. 幹細胞表面標記

4.1 CD146

CD146 (分化簇 146) 也稱為黑素瘤細胞粘附分子 (MCAM) 或細胞表面糖蛋白(MUC18)。在人類中，CD146 蛋白由 MCAM 基因編碼。(Kuske and Johnson 1999)

MCAM 作為層粘連蛋白 $\alpha 4$ 的受體起作用，層粘連蛋白 $\alpha 4$ 是在血管壁內廣泛表達的基質分子。因此，MCAM 由作為血管壁成分的細胞高度表達，包括血管內皮細胞，平滑肌細胞和周細胞。(Flanagan et al. 2012)已經證明 CD146 出現在健康個體周圍血中的一小部分 T 和 B 淋巴細胞上。CD146 + T 細胞顯示與效應記憶細胞一致的免疫表型，並具有與 CD146-T 細胞不同的基因譜。(Elshal et al. 2007, Elshal et al. 2005)

研究結果顯示人類間質幹細胞(Mesenchymal stem cell(MSC))和周細胞是位於細胞內的相似細胞血管壁，它們作為修復和組織維持的細胞來源，而成纖維細胞是分化程度更高且有更限定分化潛力的分化細胞(Covas et al. 2008)

CD146 是表現效力的細胞表面標記。辨認間質幹細胞表面表現效力的抗原相當困難。起初的間質細胞株的抗原表型鑑定顯示三次效力株比單次效力株有較高的 CD146 量。CD146 (MCAM, Mel-CAM, S-Endo-1, A32 antigen, and MUC18)在多種細胞上皆有表現(MSCs, endothelial cells, and melanoma cells)且有參與在 heterotypic intercellular adhesion。CD146 在快速增殖的間質幹細胞表現量增加，且有三系分化(trilineage differentiation)的能力(Russell et al. 2010)



5. 神經表面標記

5.1 巢蛋白(Nestin)

巢蛋白(Nestin)是首先在神經上皮細胞發現的一種 type VI Intermediate filament(Guerette et al. 2007)，在胚胎形成期，巢蛋白(Nestin)在遷徙和增殖的細胞上表現，在成熟的組織則表現在有再生之處。

巢蛋白(Nestin)是在多系前驅細胞上的一個特色標記，細胞若有這個標記表示有多潛力和再生潛力。(Wiese et al. 2004)

巢蛋白(Nestin)是一種在中樞神經系統、周邊神經系統、肌原組織和其他組織早期生長中的分裂細胞表現的中間纖維(intermediate filament)蛋白。在非健康情況下，在成人中重新誘導巢蛋白表達，例如在 CNS 損傷後和損傷的肌肉組織再生期間形成神經膠質瘢痕；雖然 Nestin 巢蛋白(Nestin)是用來當增殖和遷徙細胞的標記，但不太知道其功能和調節。有研究指出若在有絲分裂活躍的細胞表現巢蛋白(Nestin)，表示在調中間纖維(intermediate filament)蛋白的集合與分散時其有較複雜的身分；同時也與其他結構性蛋白參與細胞的重塑。(Michalczyk and Ziman 2005)

神經管中的多潛能幹細胞產生了大腦中發現的不同神經絲類型。中間絲基因表達的突然變化伴隨著前體狀態的轉變：中間絲巢蛋白的轉錄被神經絲的轉錄所取代是為了識別人類神經前體細胞，並進一步了解中間細胞的進化。

三個內含子位置中的兩個也由神經絲分享，但不是由其他類別的中間元素共享。這意味著巢蛋白(Nestin)和神經元在從其他類別的中間細胞分支後具有共同的祖先，並且在不同的神經元基因分裂之前巢蛋白與神經元分支分離。(Dahlstrand, Collins and Lendahl 1992)

在臨床方面，巢蛋白(Nestin)是神經幹細胞的蛋白質標記物，也在卵泡幹

細胞及其直接分化後代中表達。毛囊凸起區域是豐富，易獲得活躍生長的多能成體幹細胞的來源。毛囊幹細胞提供了一種有效的，可獲得的自體幹細胞來源，用於治療周圍神經損傷。(Hoffman 2007)

最近發現 Nestin 作為檢測新形成的內皮細胞的標記受到關注。Nestin 是結直腸癌組織中增殖內皮細胞的血管生成標誌物。(Teranishi et al. 2007)

6. 神經介紹

牙髓含有兩種感覺神經纖維：有髓（A 纖維）和無髓（C 纖維）。兩者之間存在一些功能重疊，因為兩種纖維類型都可以是傷害感受器。A 纖維包括 A- β 和 A- δ 纖維。A- β 纖維可能比 A- δ 纖維稍微敏感，但功能上這些纖維在牙髓中聚集在一起，因為兩者都支配牙本質小管，兩者都受到牙本質流體運動刺激。大約 90% 牙髓中的 A 纖維是 A- δ 纖維。

在牙齒發育的鐘形階段，“先鋒”神經纖維沿血管進入牙乳頭(Dental papilla)。雖然只在牙乳頭觀察到無髓纖維，這些纖維的比例可能是已經失去或未發展髓鞘的 A 纖維。有髓纖維是最後出現在發展的人類牙髓中的主要結構。神經纖維數量逐漸增加，並且纖維接近牙本質時開始成束。在鐘形階段，很少有纖維進入前期牙本質。(Berman and Hargreaves 2016)

7. Growth associated protein(GAP-43):

GAP-43 是細胞內生長相關蛋白(Growth associated protein-43)。通過整合質膜和細胞骨架對細胞外信號反應，參與發育和再生過程中的神經元尋路和分支。GAP-43 的染色允許在軸突尖端可辨認生長錐。更令人驚訝的是，GAP-43 也由許旺細胞在大鼠白齒中表達。體外和體內觀察顯示，當與許旺細胞(schwann cell)相關時，GAP-43 表達在其前驅細胞和非髓鞘成熟細胞。(Kökten et al. 2014a)

許旺細胞中在年輕成體樣本的成牙本質下層 subodontoblast layer 內 S100 和 GAP43 的部分共存。而在年紀較長的成人樣本中，較少的 GAP43 標記在牙本質

- 牙髓界面與大量減少的無髓鞘許旺細胞有關。

許旺細胞是神經膠質細胞，支持周圍神經系統的軸突發育，維持，防禦和再生。目前對成人永久性牙髓中的組織許旺細胞，可塑性和老化的知識有限。此篇研究試圖找出年輕人和老年人牙齒中許旺細胞表型模式的變化、牙髓的神經，免疫和血管成分之間的關係。許旺細胞顯示在牙本質處- 牙髓界面形成突出的神經膠質網絡，由非髓鞘和髓鞘表型組成，形成與神經纖維和樹突狀細胞有關的多細胞神經免疫界面。許旺細胞表型被 S100，膠質原纖維酸性蛋白的表達識別（GFAP），髓鞘鹼性蛋白（MBP），Sox10，GAP43 和 p75NTR 標記。

在年輕的成年人牙齒中，與感覺神經末梢密切相關的密集無髓鞘許旺細胞通過成牙本質細胞層，進入鄰近前牙本質/牙本質區域。雖然 GAP43 和 p75NTR 在來自年輕成年牙齒的非髓鞘許旺細胞有很高的表現，但是在老年人的牙齒中這些標記顯著下降。有髓鞘軸突主要存在 Raschkow 神經叢和牙髓中的神經束內，但他們的密度在老年人中顯著減少。這些數據揭示了牙髓的神經膠質網絡與年齡相關的變化，伴隨著冠狀面牙髓神經支配在老年人牙齒較少。顯著的許旺細胞作為牙本質 - 牙髓界面支持它們與感覺神經末梢和免疫系統成分的關聯構成了一部分用於防禦病原體和牙本質修復的整合多細胞屏障的概念。(Couve et al. 2018)使用針對 S100 β 的抗體檢測神經膠質細胞以檢測許旺細胞(schwann cell)和膠質原纖維酸性蛋白（GFAP）以檢測衛星神經膠質細胞。(S. Jose Flavio A-Bopp 2017)。

Gap43 是一種有助於監測神經元生長和突觸發生的標記物，也反映了特定神經元突觸活動的特定模式(Rosskoth-Kuhl and Illing 2014)。GAP-43（F1，B-50 或神經調節素）的作用在調節軸突末端的生長狀態。在培養細胞操作 GAP-43 表達的同樣對神經突向外生長具有深遠的影響。GAP-43 似乎參與轉導細胞內和細胞外信號調節神經末梢的細胞骨架組織。蛋白激酶 C 的磷酸化在這方面尤為重要，並且與神經末梢發芽和長期增強有關。(Benowitz and Routtenberg 1997)

在發育和再生過程中的軸突引導可以在很大程度上歸因於稱為生長錐的神經突遠端的特殊結構(1966)。結構上，這些高度動態的膨脹可以分為三個不同的區域：基地、中心區域和周邊區域。生長錐到神經突在基地過度形成，其中

微管束髮散並延伸到細胞內中央區域。生長錐的扁平前緣，周邊區域，充滿了肌動蛋白絲的密集網狀物，實際上沒有微管和細胞器。生長錐和神經突結構和運動由細胞粘附分子，微管，肌動蛋白，中間絲和特異性相互作用的調節蛋白 (Aarts et al. 1998)

8. AM1-43 mechanism:

AM1-43 是感覺神經的優秀標記物，可用於進一步研究牙齒神經支配和探索新的鎮痛藥治療牙齒疼痛(Nishikawa 2006)

AM1-43 可以標記感覺神經纖維和感覺神經元。神經細胞膜的非選擇性陽離子通道的滲透是負責標記的機制。TRPV2 通道，非 TRPV1 通道，有助於牙髓中 AM1-43 的螢光標記(Nishikawa 2008)。體內 AM1-43 的廣泛組織標記模式經過簡單的皮下注射提供了新穎性標記牙齒神經支配的方法，有幾個優勢分別為（1）螢光是明亮且特定的；（2）醛固定和 EDTA 脫礦之後仍然觀察到螢光和（3）螢光可以薄切片檢查(Nishikawa 2006)。有研究使用 AM1-43 在齧齒動物，周緣乳頭(Circumvallate papilla (CVP))及其潛在的小唾液腺，根據這些形態學和免疫組化結果，我們認為神經支配和細胞增殖在 CVP 中的味蕾定位和舌頭中馮埃伯納腺體(Von Ebner's gland(VEG))的分支形態發生中起重要作用(Sohn et al. 2011)。也有研究使用 AM1-43 dye 在斑馬魚上研究胞吞作用(endocytosis)，因這個 dye 是藉著胞吐胞吞作用的 (Walters et al. 2012)。從許多研究發現神經的發育生成與神經相關因子的表現可能具有相關性而值得進一步探討。

第二章 實驗假說，實驗目的，特定目標



實驗假說:

牙齒神經的生長隨著牙冠與牙根的形成而出現在牙髓腔之內，因此我們推測神經的生長可能與牙髓腔內的牙髓幹細胞有相關係

實驗目的:

本實驗之目的乃是想研究和觀察牙髓幹細胞在牙齒神經支配中的角色

特定目標:

1. 研究和觀察小鼠牙胚不同階段（P4，P8 ICR 小鼠）的牙齒神經支配
2. 探討牙髓幹細胞在小鼠牙胚不同階段（P4，P8 ICR 小鼠, P1 Wistar 大鼠）分化能力的可能性與神經相關因子的表現

第三章 材料與方法



1. 實驗流程圖

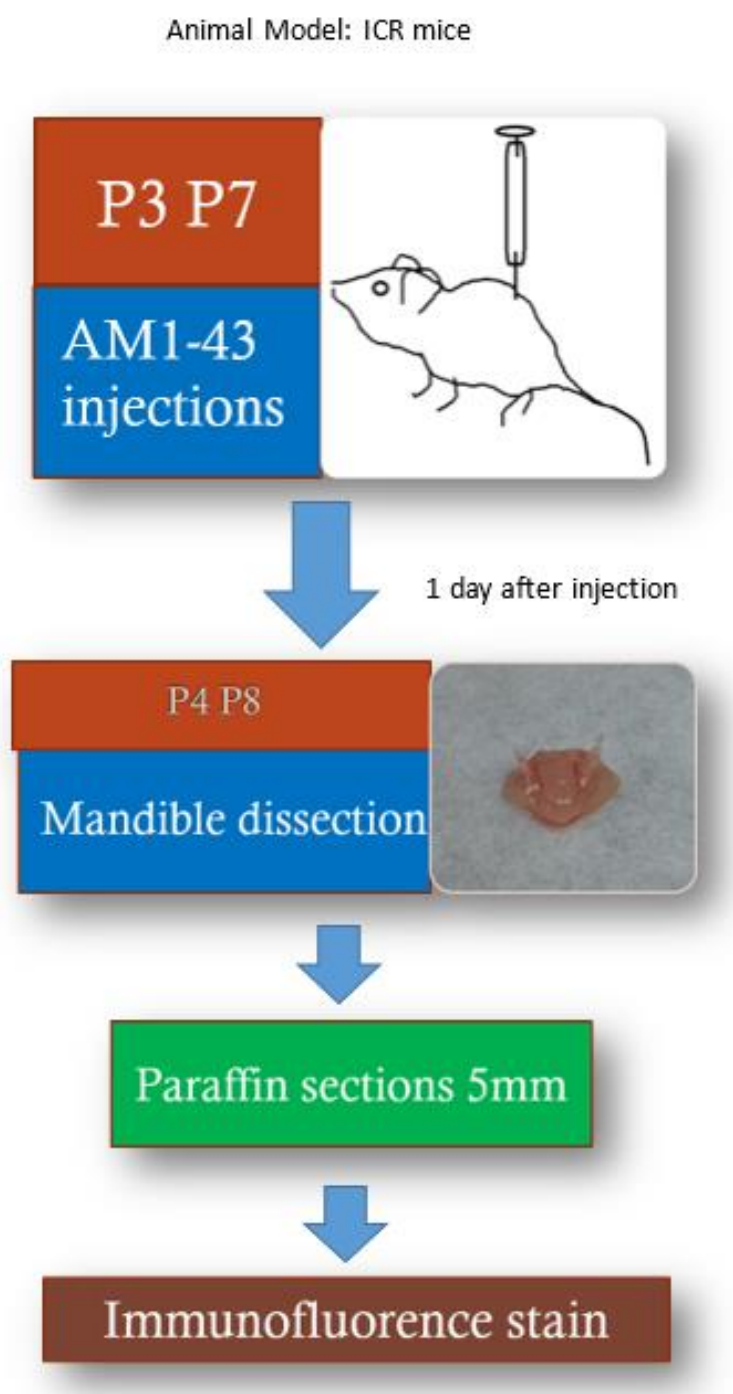


圖 3-1 實驗流程圖



2. AM1-43，石蠟包埋

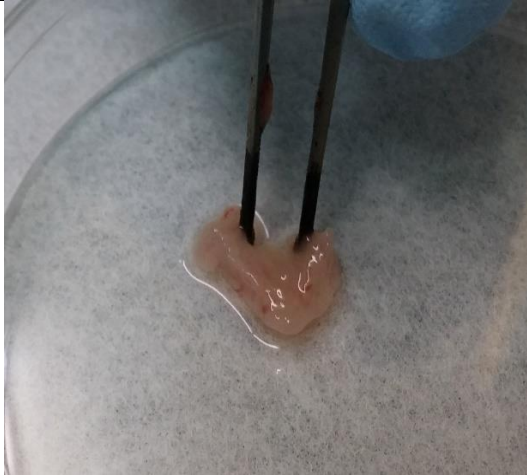
(1)以注射法標定神經纖維分佈:

研究和觀察小鼠牙胚不同階段 (P4, P8 ICR 小鼠) (圖 3-3)的牙齒神經支配, 使用 AM1-43 注射的染劑。AM1-43 是感覺神經的優秀標記物, 可以標記感覺神經纖維和感覺神經元。體內 AM1-43 的廣泛組織標記模式經過簡單的皮下注射提供了新穎性標記牙齒神經支配的方法, 有幾個優勢分別為 (1) 螢光是明亮且特定的; (2) 醛固定和 EDTA 脫礦之後仍然觀察到螢光和 (3) 螢光可以薄切片檢查 (Nishikawa 2006)。

本實驗為了探討牙齒神經生長, 利用注射法標定神經纖維的分佈在不同時期的情形, 將不同時期的老鼠下頷固定包埋。

ICR mouse 出生第三天和第七天數隻以皮下注射以 1mg / mL 的濃度溶解在磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 中的 AM1-43 (Biotium, Hayward, CA, USA; 2 μ g / g 體重) 的背部皮膚中。對照大鼠僅注射相同量的 PBS。注射後一天, 藉由吸入二氧化碳 (Nembutal; Abbot, North Chicago, IL, USA) 麻醉動物並斷頭處死。(因此實驗鼠牙胚分別為第四天和第八天的結果)

解剖下頷骨(圖 3-4)並用 4% 多聚甲醛的 PBS 溶液在 4°C 下固定 9-24 小時。下頷骨在沒有脫礦質的情況下進行處理。組織拿出福馬林後:

圖 3-3  圖 3- 2 ICR mouse	圖 3-4  圖 3- 3 ICR mouse 解剖下頷
--	--

(2)石蠟切片處理方式:

福馬林放一小時，接著 95%酒精共換三缸，每缸各一小時，加起來共三小時；接著 100%酒精共換三缸，每缸各一小時，加起來共三小時；接著二甲苯三十五度一缸一小時，二甲苯四十度一缸一小時，二甲苯四十五度一缸一小時；接下來溫度六十度石蠟，共換三缸，每缸各一小時，加起來共三小時；接下來溫度五十五度石蠟一缸，放一小時。 打開冷凝機，將脫水好的檢體盒放入預熱盒中。

包埋盒由組織包埋機中檢體槽移出，打開包埋盒取出檢體，包埋模先注入石蠟液約 3 分滿，將檢體切面朝下置於包埋模內，並留下包埋盒備用。

將包埋模再注入石蠟溶液，使其液面高度達到包埋模內之凹痕處，將備用包埋盒底朝下置於包埋模的上方處再注入石蠟約 8 分滿後將其移至大冷凍盤上，使石蠟完全凝固。待臘凝固了就可將鐵盒除下。



探討神經細胞之分佈：

探討牙髓幹細胞在小鼠牙胚不同階段（P4，P8 ICR 小鼠，P1 Wistar 大鼠）分化能力的可能性與神經相關因子的表現，為了探討在牙髓內幹細胞和神經相關因子之分佈，將利用免疫細胞螢光染色法探討幹細胞和神經相關因子包括 CD146，Nestin，Growth associated protein(GAP-43)，NGF 在牙髓細胞之表現。

3. 免疫螢光染色

將 5 微米切片空氣乾燥，在 60°C 培養箱中乾燥切片至少 2 小時（塑料玻片架中放置最多 24 個切片）。將玻片架放入染色皿中，並加入足夠的 Trilogy™ 溶液，使玻片上的所有組織浸沒。準備第二個充滿約 350ml Trilogy™ 的工作溶液（這將在第一染色皿中的處理時間之後用熱沖洗）電壓力鍋方法：在底部放置 700 毫升水。將兩個染色盤放入高壓鍋內。將壓力鍋蓋鎖在壓力鍋頂上，並確保位於蓋手柄上的排氣開關處於關閉位置。確保旋轉壓力重量直到其完全就位於其容器中，否則壓力鍋將無法產生壓力。（壓力鍋方法通常產生更一致的結果）。當達到正確的壓力和溫度時（兩條白線），計時器將開始倒計時。等待約 7 分鐘，然後將排氣開關從關閉位置移開，以釋放壓力。當所有壓力釋放時，蓋子頂部的藍色按鈕將下降，因此可以安全地取下蓋子。將蓋子旋轉到打開位置。使用鑷子將載玻片從第一容器轉移到熱沖洗液（第二容器），將玻片架非常緩慢地降低到熱沖洗溶液中。（注意：由於熱沖洗液過熱，因此快速浸入滑動架可能會導致熱溶液突然沸騰）。上下震動玻片架 5 分鐘（可以丟棄第一種溶液，下次進行操作時，可以在第一個容器中重複使用熱沖洗液。）用 PBS 或 TBS IHC 洗滌緩衝液沖洗載玻片，然後進行染色。用 PBS 或 TBS IHC 洗滌緩衝液清洗 Trilogy™。現在必須丟棄最初放置玻片架染色盤中的 Trilogy™。第二次（熱沖洗）染色盤中的 Trilogy™ 可以在下次重複該過程時重新用作初始 Trilogy™。以 1XTBS 清洗三次，每次五分

鐘。於保濕暗盒中以 10% Normal goat serum 室溫 blocking 0.5 小時以減少抗體非特异性結合。加入以 10% Normal goat serum 稀釋好的一級抗體稀釋液，於保濕暗盒中以 4°C 作用隔夜。以 1XTBS 清洗三次，每次五分鐘。加入以 10% Normal goat serum 稀釋好的二級抗體稀釋液，於保濕暗盒中與冷凍組織切片或細胞室溫作用 2 小時(此步驟開始均需避光)。

以 1XPBS 清洗三次，每次五分鐘。以 1 μ g/ml DAPI 於室溫下作用 15 分鐘以進行細胞核染色。以 1XPBS 清洗三次，每次五分鐘。以含螢光保護劑的封片膠進行封片以降低螢光衰退。

4. 材料

(1) 耗材：22×22mm 或 24×40 的蓋玻片(厚度 No.1.5；0.17mm)、76×26mm 的載玻片(silane or poly-L lysine coated)、微量吸管(10 μ l、200 μ l、1000 μ l)、1.5ml 微量離心管、15ml 離心管、10ml 吸管、pipette、鑷子、染缸、保濕暗盒、擦手紙、拭鏡紙、冰桶及離心管架、指甲油、1000ml 燒杯、1000ml 量筒、振盪器、加熱器、高壓鍋、壓克力容器兩個、玻片架、二次水。

(2) 試劑(廠牌僅供參考)：

- A. 10X TBS(Cis-Bio；D437-1L)
- B. Antibody diluent: 10% Normal goat serum (100% diluted with 1X PBS)
- C. Blocking buffer：10% Normal goat serum (100% diluted with 1X PBS)
- D. DAPI(Sigma)
- E. Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen；P36934)
- F. Paraformaldehyde Solution, 4% (w/v) in Aqueous Phosphate Buffer (Cis-bio: D460-1L)

G. Primary antibodies

- i. Nestin: Abcam, ab6142 1:20-1:200
- ii. CD146: Abcam, ab75769 1:250
- iii. GAP43: Abcam, ab52918 1:500
- iv. NGF: Abcam, ab52918 1:100

H. Secondary antibodies:

- i. Alexa Fluor 647:
- ii. Abcam, ab150115 1:200
- iii. Abcam, ab150083 1:200

I. Antigen retrieval buffer : Trilogy: cell marque

5. 共軛焦顯微鏡

(1) Zeiss LSM 510 Meta :

The images of Confocal Microscopy were acquired by Zeiss LSM 510 Meta and analyzed by LSM Image Browser software (Carl ZEISS, Jena, Germany)

(2) Carl Zeiss ZEN:

巢蛋白(Nestin)，CD146 的免疫螢光染色陽性反應面積是由此軟體藉由分析螢光的閾值測量所得。



第四章 結果



AM1-43 可以標記感覺神經纖維和感覺神經元。神經細胞膜的非選擇性陽離子通道的滲透是負責標記的機制。在本實驗中的出生後四天牙胚中結果顯示被 AM1-43 標記的神經纖維在牙胚外，未進入牙髓中。出生後八天在牙胚內外都有 AM1-43 標記的神經纖維，且已進入牙髓中。

巢蛋白(Nestin)是首先在神經上皮細胞發現的一種中間絲(intermediate filament)，在胚胎形成期，巢蛋白(Nestin)在遷徙和增殖的細胞上表現，在成熟的組織則表現在有再生之處。巢蛋白(Nestin)是在多系前驅細胞上的一個特色標記，細胞若有這個標記表示有多潛力和再生潛力(Wiese et al. 2004)。

在本實驗中的出生第四天的牙胚中結果顯示巢蛋白(Nestin)免疫反應陽性出現在牙本質母細胞和其突觸的位置；牙胚內免疫染色反應陽性的面積占牙胚內整個面積的 5.8%(圖 4-2~圖 4-4)。在本實驗中出生第八天的牙胚中結果顯示巢蛋白(Nestin)免疫染色反應陽性出現在牙本質母細胞和其突觸的位置；免疫染色反應陽性的面積占整個牙胚的 0.8% (圖 4-5~圖 4-9)。

CD146 是表現效力的細胞表面標記。辨認間質幹細胞表面表現效力的抗原相當困難。在本實驗中的出生後第四天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫染色反應陽性。牙胚內免疫反應陽性的面積占整個牙胚內面積的 4.7%(圖 4-10~圖 4-14)。在本實驗中的出生後第八天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。牙胚內免疫反應陽性的面積占整個牙胚內面積的 4.1% (圖 4-15~圖 4-20)。

細胞內生長相關蛋白 Growth associated protein-43(GAP-43)通過整合質膜和細胞骨架對細胞外信號反應，參與發育和再生過程中的神經元尋路和分支。細胞內生長相關蛋白 GAP-43 的染色允許在軸突尖端可辨認生長錐(nerve growth cone)。出生後第四天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙胚牙囊(dental follicle)周圍是免疫染色反應陽性(圖 4-21~圖 4-25)。出生後第八天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙胚牙囊(dental follicle)周圍，牙胚齒

頸部和牙胚內是免疫染色反應陽性。(圖 4-26~圖 4-30)

可發現出生後第四天至第八天的白齒牙胚神經原本在牙胚外，後來進入牙髓。巢蛋白(Nestin)在第四天和第八天都出現在牙本質母細胞和其突觸的位置，牙胚內免疫染色反應陽性的面積占整個牙胚內的面積比例在出生後第四天比出生後第八天高不少(出生後第四天是出生後第八天的 4.64 倍)。出生後第四天和出生後第八天也都有幹細胞出現在牙胚內和牙胚外的微血管周圍內皮細胞中，牙胚內免疫染色反應陽性的面積占整個牙胚內的面積比例在出生後第四天和出生後第八天沒有很明顯的差別。神經生長錐(Nerve growth cone)(由生長相關蛋白(GAP-43)標記)在出生後第四天時在牙胚牙囊(dental follicle)外，在出生後第八天除了牙胚牙囊(dental follicle)外也可在牙胚齒頸部和牙胚內觀察到。(圖 4-1)

CD146 的 Positive control 組免疫螢光染色是染人類牙髓中的微血管內皮細胞(圖 4-20)。細胞內生長相關蛋白 Growth associated protein-43(GAP-43) 的 Positive control 組免疫螢光染色是染的人類牙髓中的 Raschkow plexus(圖 4-31)

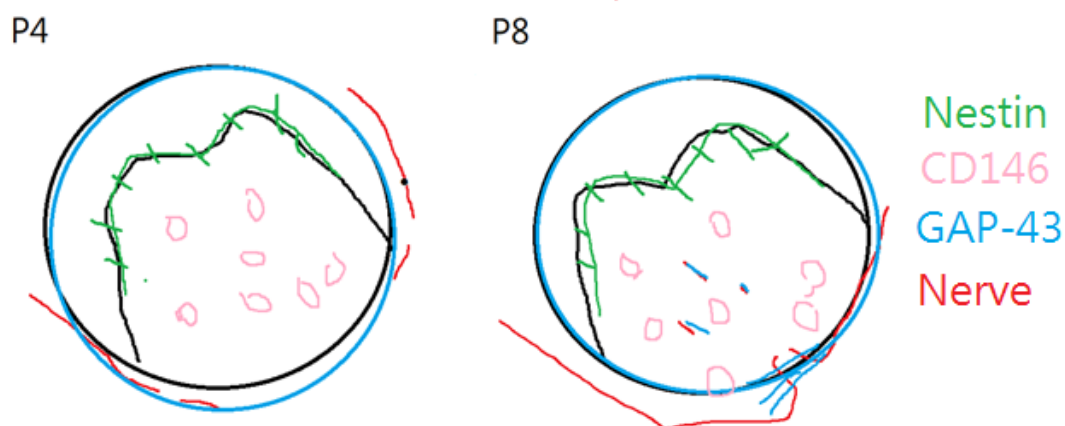


圖 4- 1 Nestin 、 CD146 、 GAP-43 、 Nerve 的 P4 和 P8 比較圖

第五章 討論



1. AM1-43 反應陽性的時間和位置

AM1-43 可以標記感覺神經纖維和感覺神經元。神經細胞膜的非選擇性陽離子通道的滲透是負責標記的機制。TRPV2 通道，非 TRPV1 通道，有助於牙髓中 AM1-43 的螢光標記。(Nishikawa 2008)

在本實驗中的出生後四天牙胚中結果顯示被 AM1-43 標記的神經纖維在牙胚外，未進入牙髓中。出生後八天在牙胚內外都有 AM1-43 標記的神經纖維，且已進入牙髓中。

根據研究指出，出生第三天的老鼠中，第一和第二白齒在原始牙周韌帶的感覺神經纖維中被強烈標記，但在牙髓沒有標記。出生第七天老鼠的門牙，AM1-43 陽性標記的纖維沿著血管進入牙髓中，且沿著血管。這個時候還沒有神經纖維進到牙本質母細胞層和牙本質。在同時期白齒的牙髓中，神經纖維接近牙本質母細胞層但也沒有穿透到牙本質母細胞層，前牙本質或是牙本質內。(Nishikawa 2007)

2. 巢蛋白(Nestin)反應陽性的時間和位置

巢蛋白(Nestin)是首先在神經上皮細胞發現的一種中間絲(intermediate filament)，在胚胎形成期，巢蛋白(Nestin)在遷徙和增殖的細胞上表現，在成熟的組織則表現在有再生之處。

巢蛋白(Nestin)是在多系前驅細胞上的一個特色標記，細胞若有這個標記表示有多潛力和再生潛力。(Wiese et al. 2004)

在本實驗中出生後四天和八天的牙胚中結果顯示巢蛋白(Nestin)免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。

根據研究指出，出生後第三天的老鼠，在中間層(stratum intermedium)的細胞，成釉細胞的跟端部分以及成牙本質細胞及其突起中可見巢蛋白(Nestin)。延伸到成形牙本質中。(CI 裂隙中排列的成牙本質細胞顯示出比牙尖中的成牙本質

細胞表現更低的免疫反應性。中間層(stratum imermedium)是免疫陽性，而成釉細胞是陰性。出生後第三天的老鼠，巢蛋白(Nestin)分佈僅位於牙髓的成牙本質細胞內。更高的放大倍數顯示巢蛋白(Nestin)在成牙本質細胞及其突起，從牙髓延伸到牙本質呈現線狀結構。

在胚胎牙齒發育期，小鼠胚胎的牙齒芽（E13）中，巢蛋白(Nestin)首先在增殖的牙板中央核心中檢測到免疫反應性；後來(E14)，巢蛋白在未來的內部牙齒上皮。巢蛋白免疫染色也在牙乳頭形成時的凝聚的外胚層中有免疫反應性。

在 E15，巢蛋白(Nestin)表達均見於發展釉質器官和緻密外胚層。星狀網免疫性陽性染色弱，而發育中的牙乳頭顯示強烈免疫反應。牙乳頭中的染色強度接近內牙上皮（IDE）。可以檢測到明顯的免疫標記在乳突（成牙本質細胞層）和內牙上皮 IDE 邊緣處之間。外牙上皮的基底膜也是巢蛋白陽性。

當白齒達到鐘形階段（E18）時，牙囊，中間層和牙髓顯示出明顯的巢蛋白免疫反應性。這個階段可以觀察到上皮細胞有很高的免疫反應性。在牙髓角和底部的發展裂縫免疫染色陽性較牙髓中強烈。

產後牙齒發育期:

細胞分化期間，在出生後第 3 天，巢蛋白(Nestin)表達發現於成釉細胞，中間層 SI 和成牙本質細胞層，信號最強烈。在牙尖，中間層 SI 細胞和成釉細胞均為巢蛋白免疫反應陽性，成釉細胞主要位於其跟端部位。在發展裂隙中 developing fissures，只有中間層(stratum imermedium)顯示巢蛋白(Nestin)免疫標記。

出生後第五天，牙髓中心巢蛋白(Nestin)表達減少。染色現在局限於成牙本質細胞層和它們的突觸，延伸到牙本質的整個寬度。牙本質母細胞旁邊的一些環狀和線狀結構及其突觸，可能是神經細胞，對於巢蛋白(Nestin)免疫反應為陽性。在第 12 天和第 28 天，牙本質母細胞在仍沒有萌發下頷白齒的細胞層仍是巢蛋白(Nestin)免疫反應陽性。

來自 5.5 個月大的成年大鼠完全萌發的牙齒，成牙本質和它們的突觸顯示巢蛋白(Nestin)免疫反應陽性。(Terling et al. 1995)

巢蛋白(Nestin)首先在神經上皮細胞發現的一種中間絲(intermediate filament)，胚胎形成期時，巢蛋白(Nestin)在遷徙和增殖的細胞上表現，在成熟

的組織則表現在有再生之處。

Nestin 是在多系前驅細胞上的一個特色標記，細胞若有這個標記表示有多潛力和再生潛力。(Wiese et al. 2004)

在本實驗中，出生後四天和八天的牙胚中結果顯示 Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。

根據研究指出，出生後第三天的老鼠，在中間層(stratum intermedium)的細胞，成釉細胞的跟端部分以及成牙本質細胞及其突起中可見 Nestin。延伸到成形牙本質中。(CI 裂隙中排列的成牙本質細胞顯示出比牙尖中的成牙本質細胞表現更低的免疫反應性。中間層(stratum intermedium)是免疫陽性，而成釉細胞是陰性。出生後第三天的老鼠，Nestin 分佈僅位於牙髓的成牙本質細胞內。更高的放大倍數顯示 Nestin 在成牙本質細胞及其突起，從牙髓延伸到牙本質呈現線狀結構。

3. CD146 免疫反應陽性的時間和位置:

CD146 是表現效力的細胞表面標記。辨認間質幹細胞表面表現效力的抗原相當困難；起初的間質細胞株的抗原表型鑑定顯示三次效力株比單次效力株有較高的 CD146 量。CD146 (MCAM, Mel-CAM, S-Endo-1, A32 antigen, and MUC18) 在多種細胞上皆有表現(MSCs, endothelial cells, and melanoma cells)且有參與在 heterotypic intercellular adhesion。CD146 在快速增殖的間質幹細胞表現量增加，且有三系分化(trilineage differentiation)的能力(Russell et al. 2010)。

本實驗中出生後四天和八天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。

根據研究指出，CD146 是內皮細胞和周細胞的標記物(Kökten et al. 2014b)。

幹細胞標記物 CD146 在成牙本質細胞附近和沿著血管呈現。免疫染色顯示間質細胞標記物 STRO-1 和 CD146 (也是無血管標記物) 均沿血液表達。根據研究證明了成人牙髓含有表達 STRO-1 的細胞 (最著名的間質幹細胞標記物)，CD146 (內皮細胞和間質幹細胞標記物) 和 P75 (神經嵴幹細胞標記物)。STRO-1 和 CD146 均沿血管表達。CD146 也在富含細胞的區域中表達。P75 主要在牙



髓核心中表達。這一發現表明成人牙髓含有不同類型的間質幹細胞/祖細胞 (Li Xiao 2017)



4. 生長相關蛋白 43 (GAP-43) 免疫反應陽性的時間和位置:

GAP-43 是細胞內生長相關蛋白。通過整合質膜和細胞骨架對細胞外信號反應，參與發育和再生過程中的神經元尋路和分支。GAP-43 的染色允許在軸突尖端可辨認生長錐。

本實驗中出生後四天(圖 12-14)牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙 dental follicle 外圍是免疫反應陽性。出生後八天(圖 8-11)的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙胚齒頸部是免疫反應陽性。

根據研究指出，GAP-43 在健康牙本質 - 牙髓複合體內主要在牙髓內拉士豪神經叢(Raschkow plexus)軸突中有稀疏的表現。

另外有研究指出，在一個嚴重齲齒的白齒，牙髓內拉士豪神經叢(Raschkow plexus)的軸突對 GAP-43 具有高度反應性，標記包括突出的精細軸突，經過一個變薄的成牙本質細胞層進入反應牙本質(reactionary dentin matrix)。因為 GAP-43 在再生過程中受傷的神經纖維發芽是必需的，GAP-43 在穿過牙髓的軸突中的表達符合這個概念。此外，生長相關蛋白 43 (GAP-43) 的表達為一般神經可塑性標誌物(Couve and Kittler 2014)。

在出生後 0 天的老鼠，生長相關蛋白 43(GAP-43)與陽性 CD34 血管相關，大部分位於基部牙髓。其中一些位於成牙本質細胞附近(Kuchler-Bopp et al. 2017)

第六章 結論



在本實驗中出生後四天牙胚中結果顯示被 AM1-43 標記的神經纖維在牙胚外，未進入牙髓中。Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙囊(dental follicle)外圍呈免疫反應陽性。

出生後八天在牙胚內外都有 AM1-43 標記的神經纖維，且已進入牙髓中。

Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙胚齒頸部是免疫反應陽性。

從以上本實驗結果可以得到以下結論:

經第四天至第八天的白齒牙胚觀察到神經慢慢從牙胚外進入牙髓。神經幹細胞一直出現在成牙本質細胞和其突觸的位置，也一直有幹細胞出現在牙髓中。神經生長錐則由牙胚外慢慢往牙胚齒頸部移動。可以推測幹細胞和神經向牙髓內生長的能力有極大的相關性，且牙髓內具有神經分化潛力的類神經幹細胞。

第七章 未來研究方向



未來研究方向；

1. 找出神經和牙髓幹細胞間是否有吸引的關係
2. 做出更多時間點的巢蛋白(Nestin)，CD146，生長相關蛋白(GAP-43)染色結果以獲得更進一步的資訊

P4 Nestin

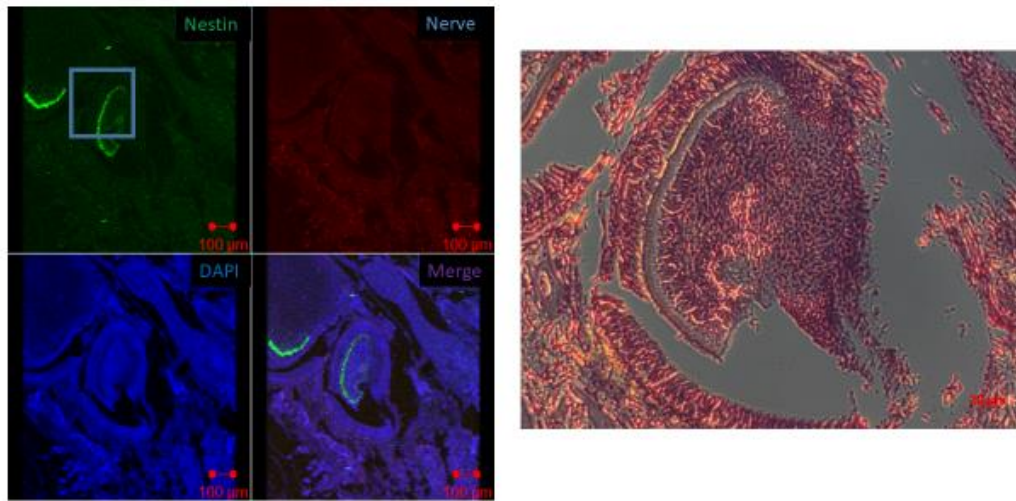


圖 4- 2 P4 Nestin

在本實驗中出生第四天的牙胚中結果顯示 Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置；免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 5.8%。

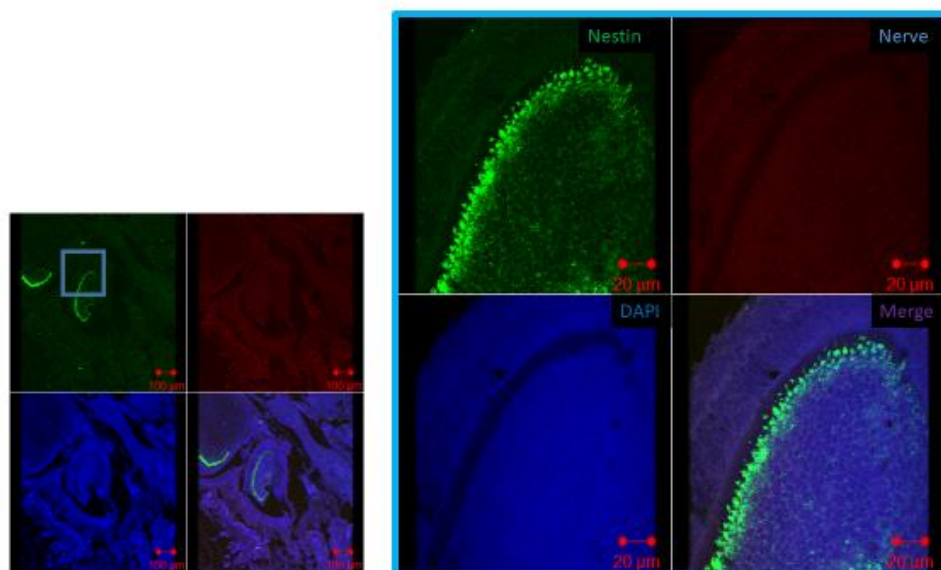


圖 4- 3 P4 Nestin

在本實驗中出生第四天的牙胚中結果顯示 Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置；免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 5.8%。

P4 Nestin control

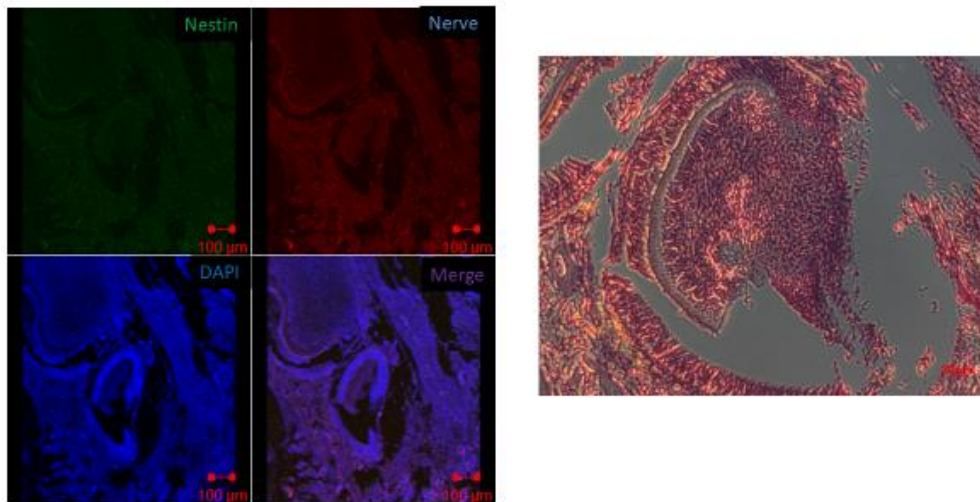


圖 4- 4 P4 Nestin control

在本實驗中出生第四天的牙胚中結果顯示 Nestin 對照組沒有免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。

P8 Nestin

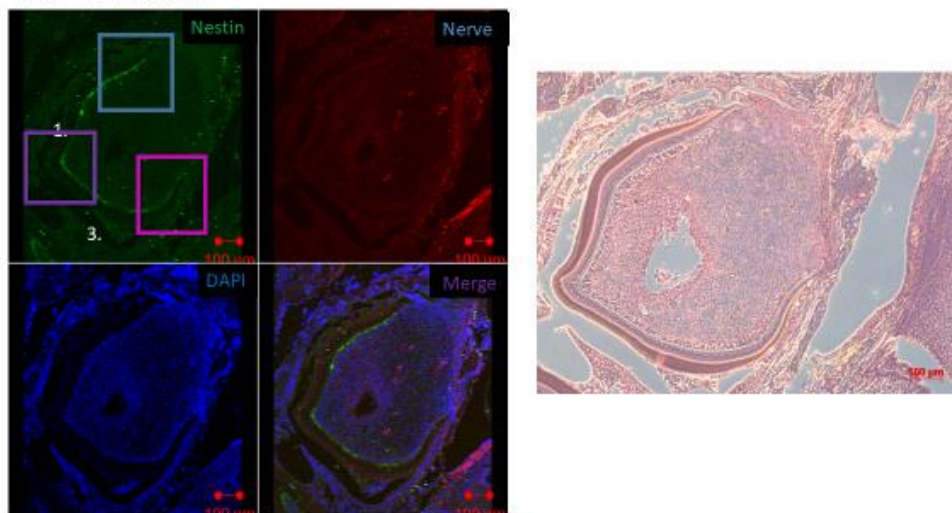


圖 4- 5 P8 Nestin

在本實驗中出生第八天的牙胚中結果顯示 Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置；免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 0.8%。

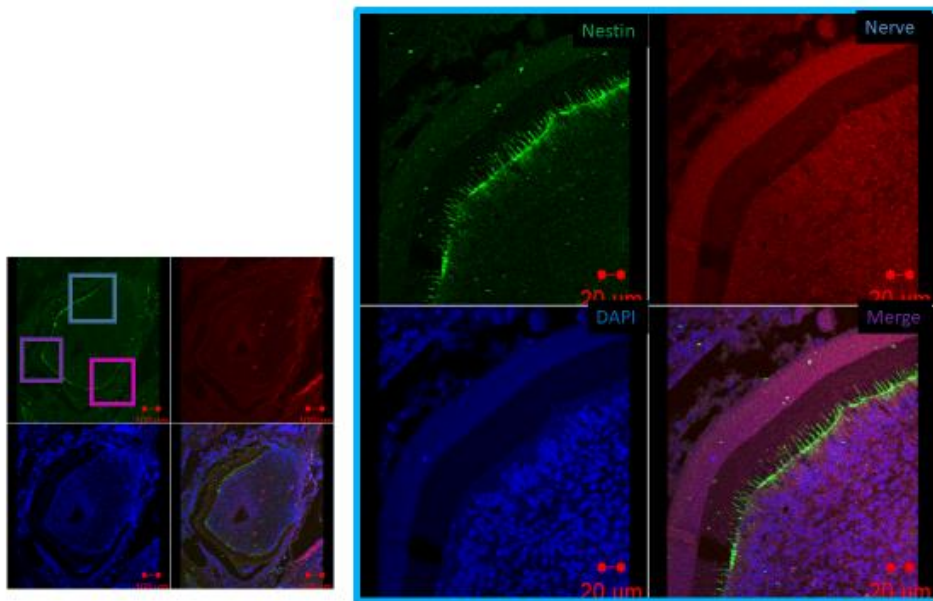


圖 4- 6 P8 Nestin(1)

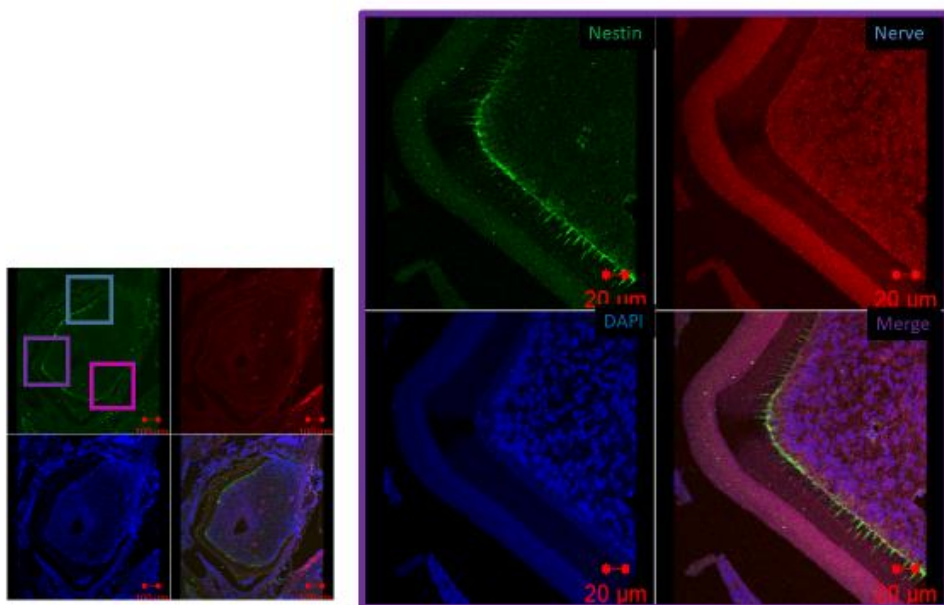


圖 4- 7 P8 Nestin(2)

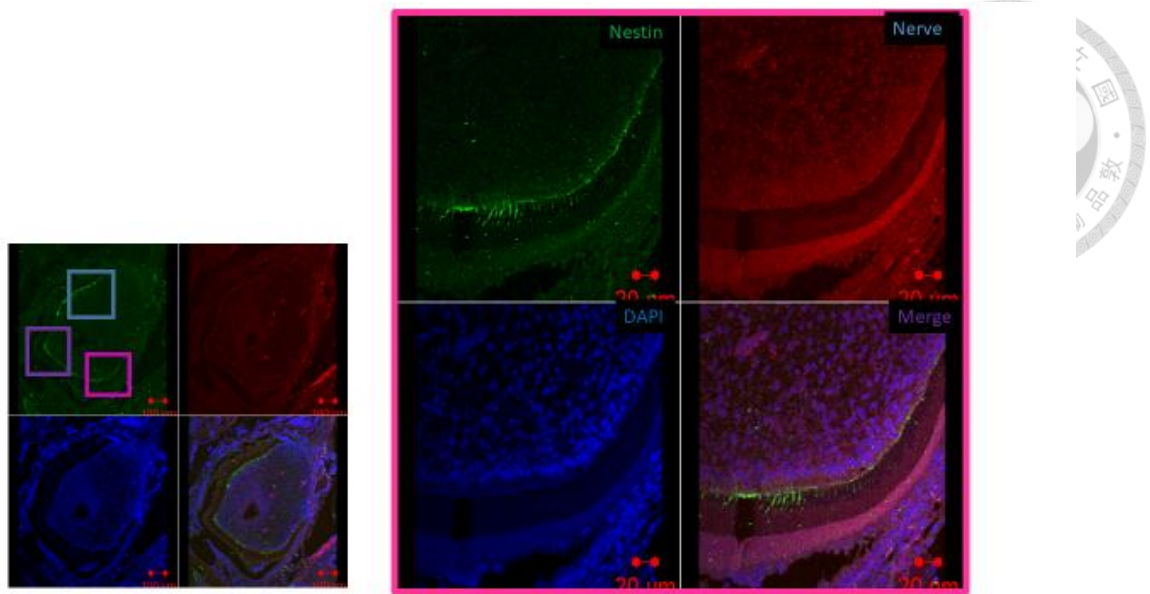


圖 4- 8 P8 Nestin(3)

圖 4-6,7,8: 在本實驗中出生第八天的牙胚中結果顯示 Nestin 免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置；免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 0.8%。

P8 Nestin control

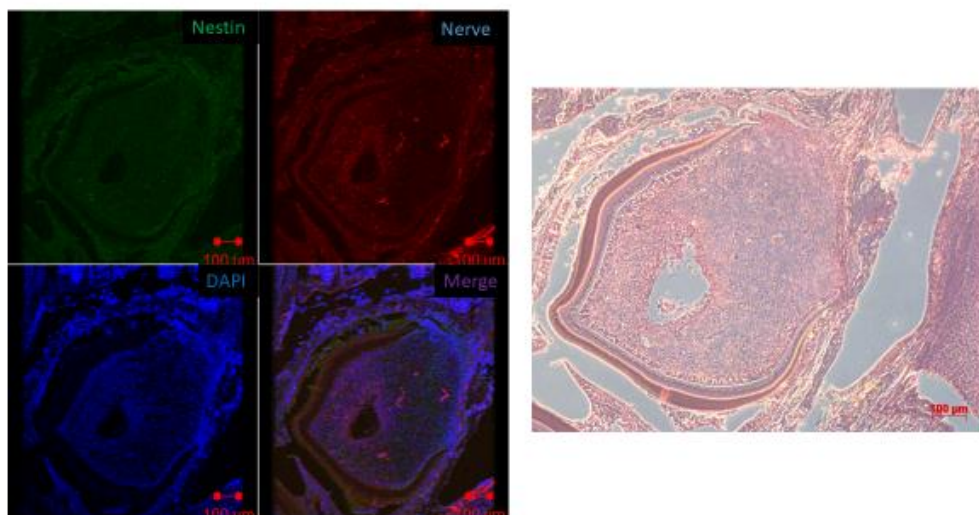


圖 4- 9 P8 Nestin control

在本實驗中出生第八天的牙胚中結果顯示 Nestin 對照組沒有免疫反應陽性出現在成牙本質細胞和其突觸的位置。

P4 CD146

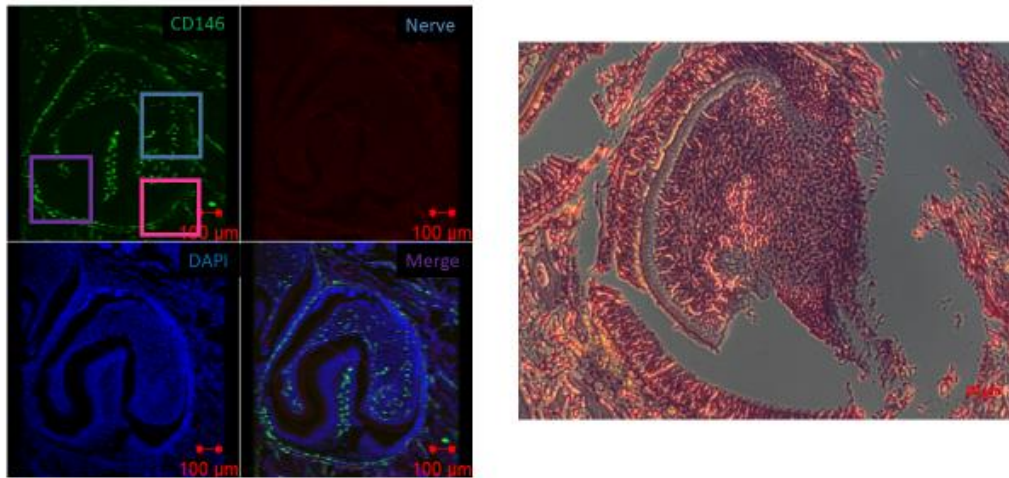


圖 4- 10 P4 CD146

在本實驗中出生後四天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 4.7%。

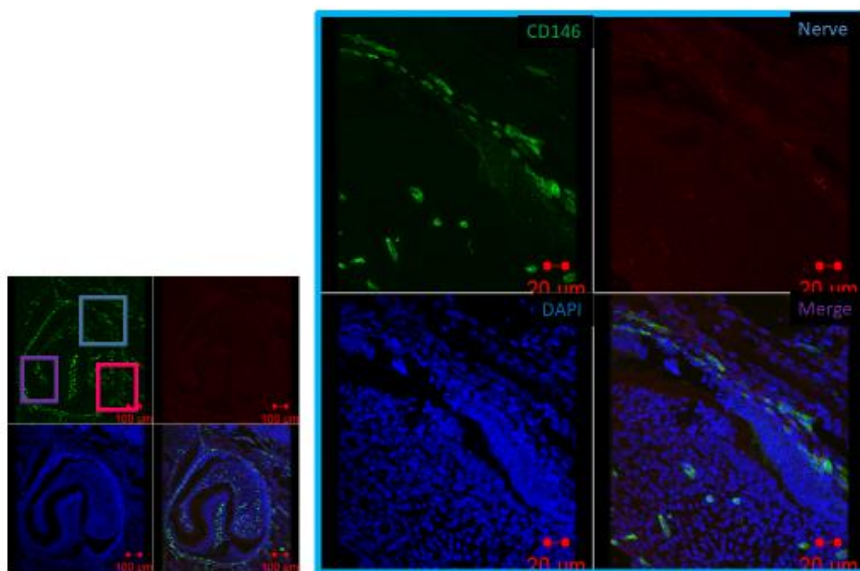


圖 4- 11 P4 CD146(1)

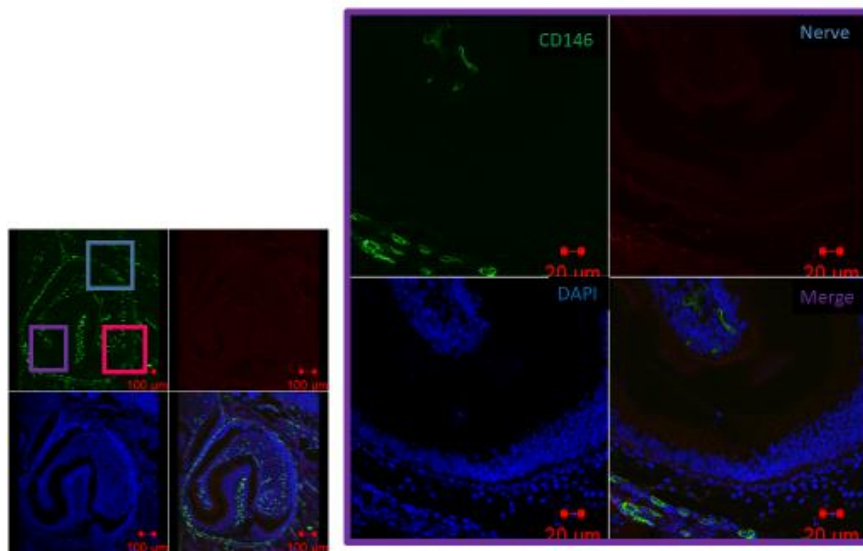


圖 4- 12 P4 CD146(2)

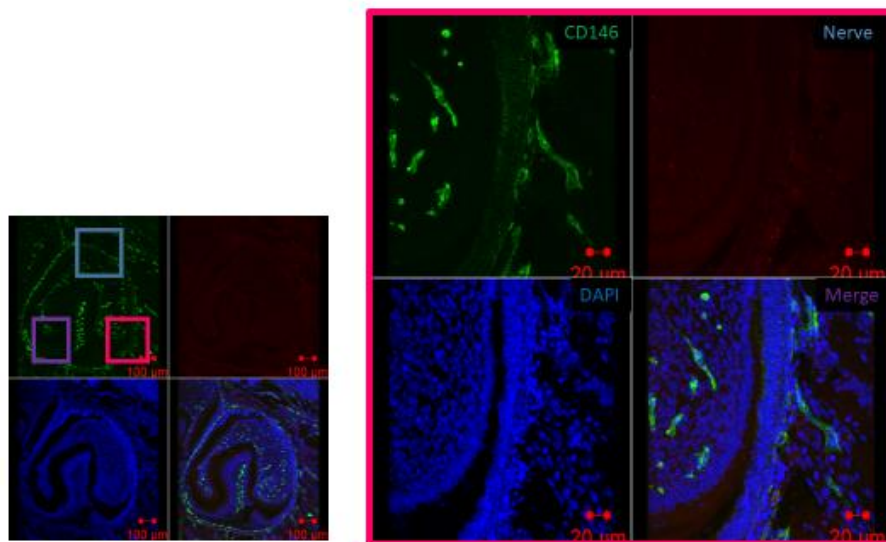


圖 4- 13 P4 CD146(3)

圖 4-11,12,13: 在本實驗中出生後四天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 4.7%。

P4 CD146 control

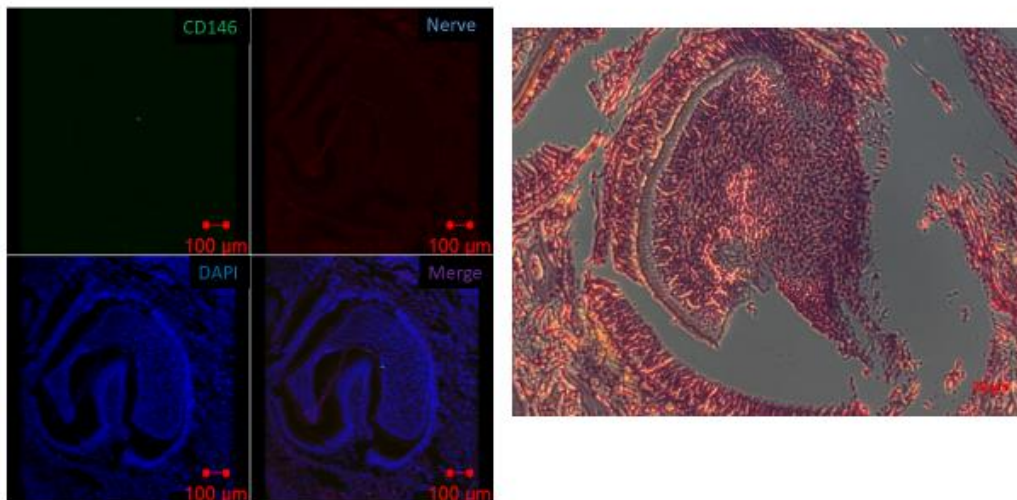


圖 4- 14 P4 CD146 control

在本實驗中出生後四天的牙胚中結果顯示對照組 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陰性。

P8 CD146

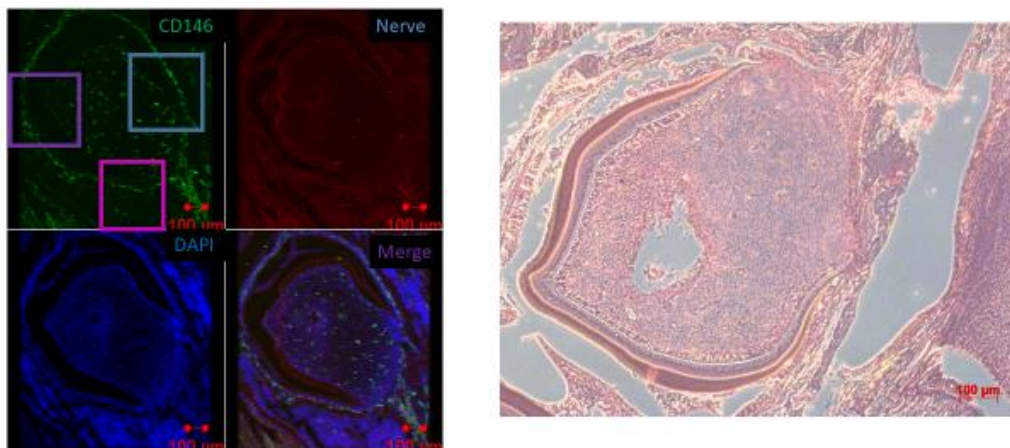


圖 4- 15 P8 CD146

在本實驗中出生後八天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 4.1%。

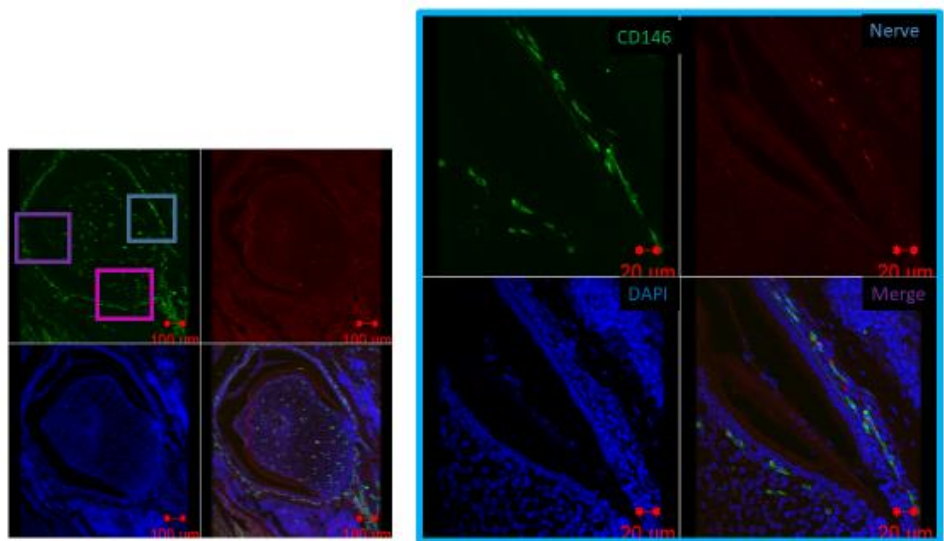


圖 4- 16 P8 CD146(1)

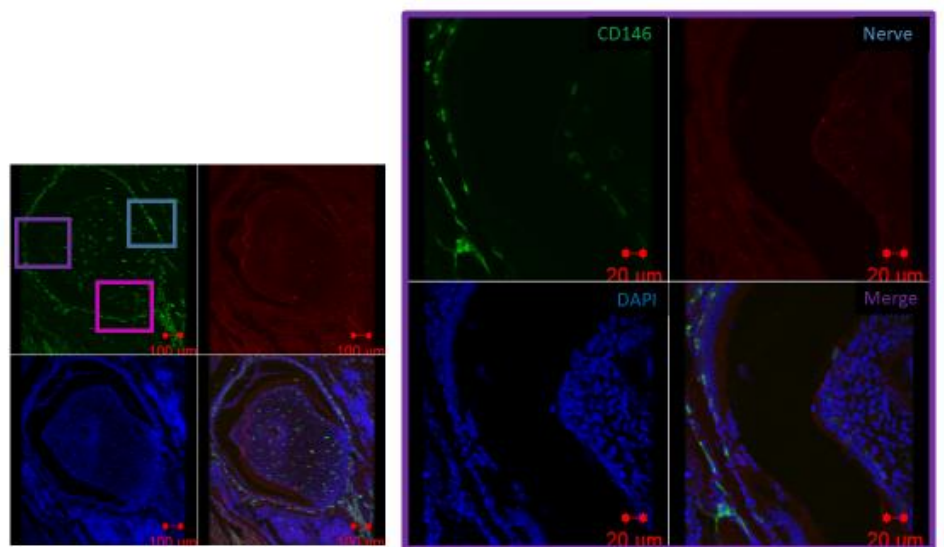


圖 4- 17 P8 CD146(2)

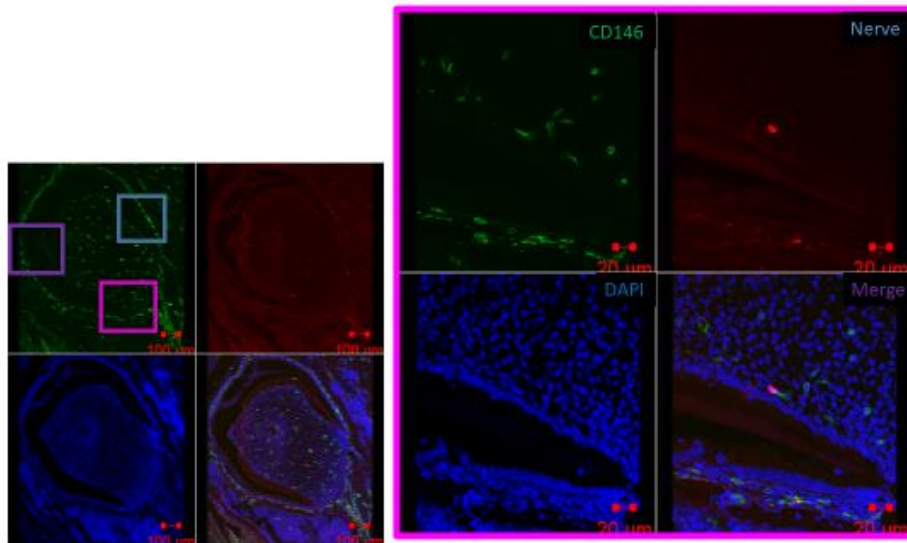


圖 4- 18 P8 CD146(3)

圖 4-16,17,18: 在本實驗中出生後八天的牙胚中結果顯示 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陽性。免疫反應陽性的面積占整個牙胚的 4.1%。

P8 CD146 control

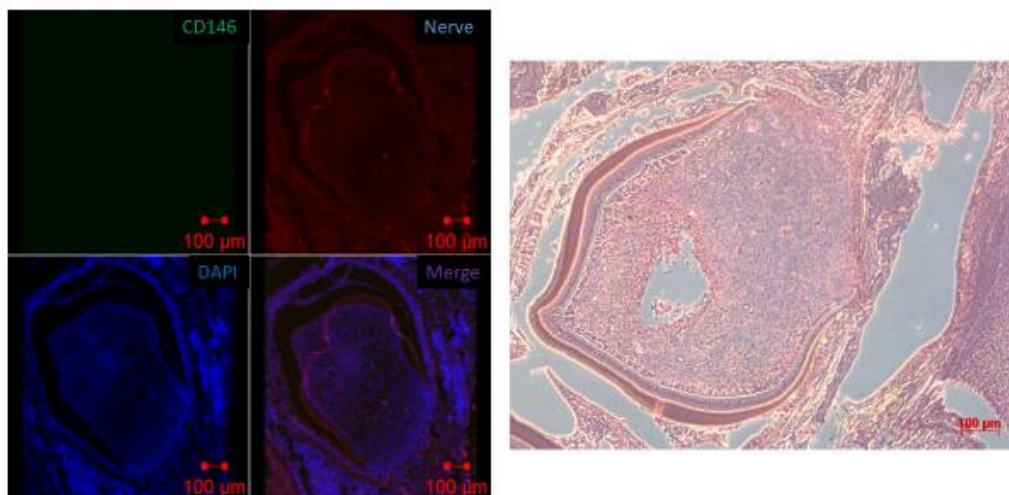


圖 4- 19 P8 CD146 Control

在本實驗中出生後八天的牙胚中結果顯示對照組 CD146 在牙胚牙髓中微血管內皮細胞和牙胚外微血管內皮細胞是免疫反應陰性。

CD146 positive control:
blood vessels in human pulp

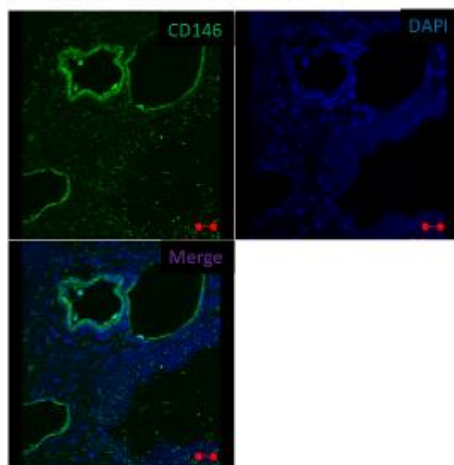


圖 4- 20 CD146 positive control: blood vessels in human pulp

在本實驗中結果顯示 CD146 在牙髓中微血管內皮細胞是免疫反應陽性。

P4 GAP-43

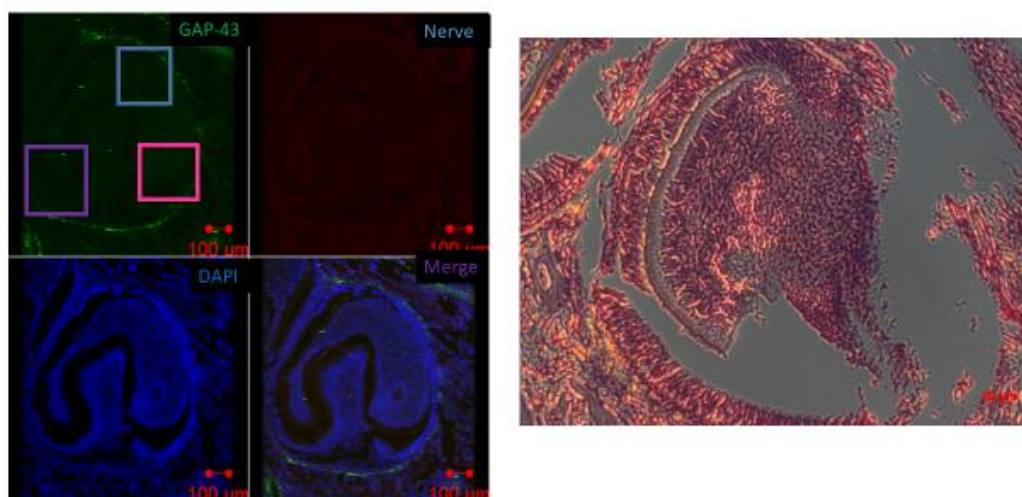


圖 4- 21 P4 GAP-43

出生後四天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43（GAP-43）在牙胚周圍是免疫反應陽性。

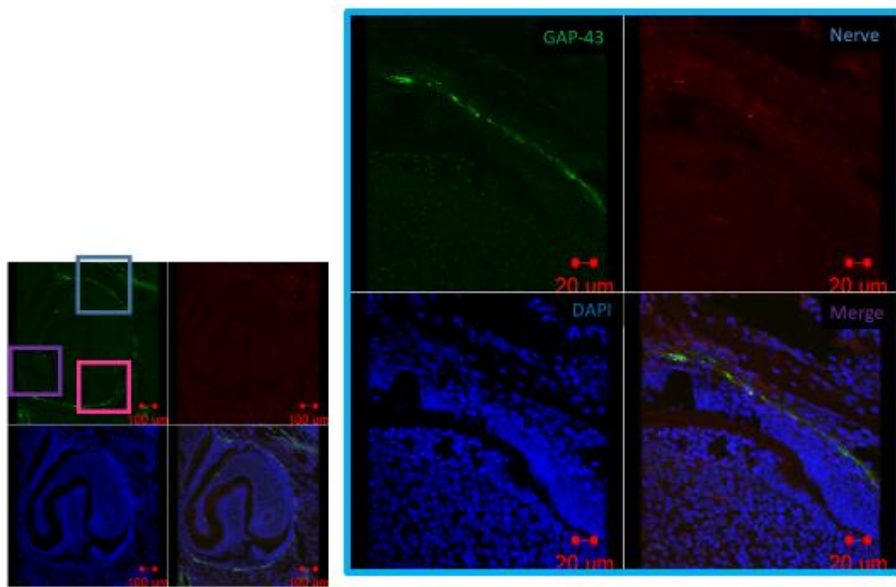


圖 4- 22 P4 GAP-43(1)

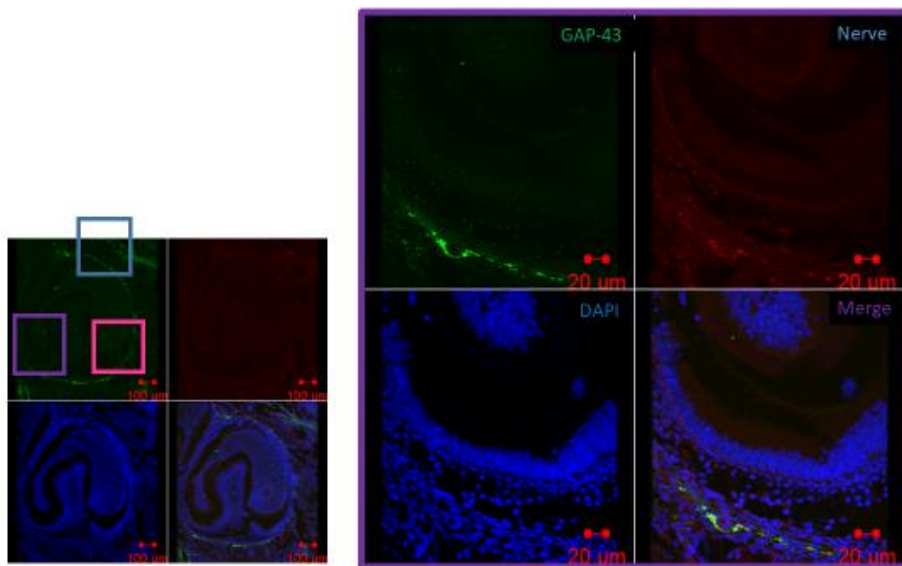


圖 4- 23 P4 GAP-43(2)

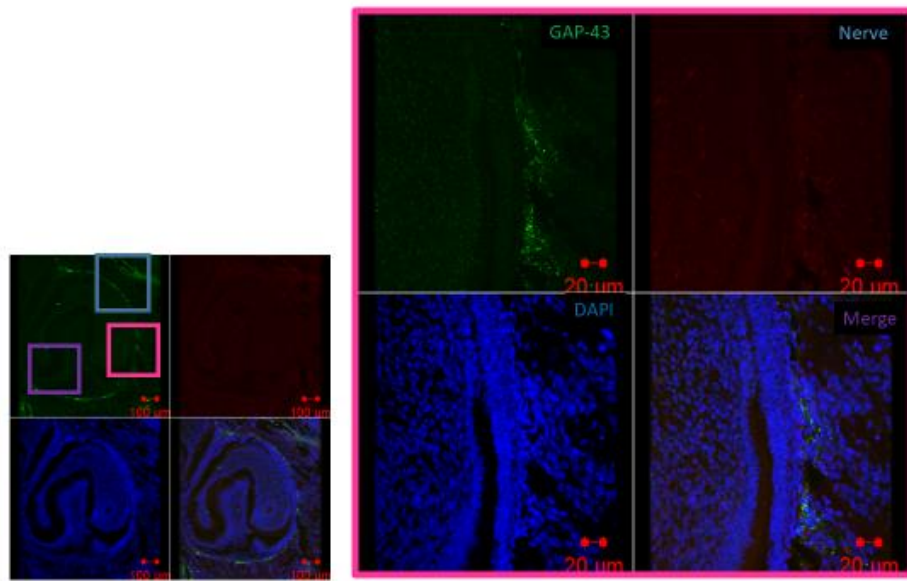


圖 4- 24 P4 GAP-43(3)

圖 4-22,23,24：出生後四天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43（GAP-43）在牙胚周圍是免疫反應陽性。

P4 GAP-43 control

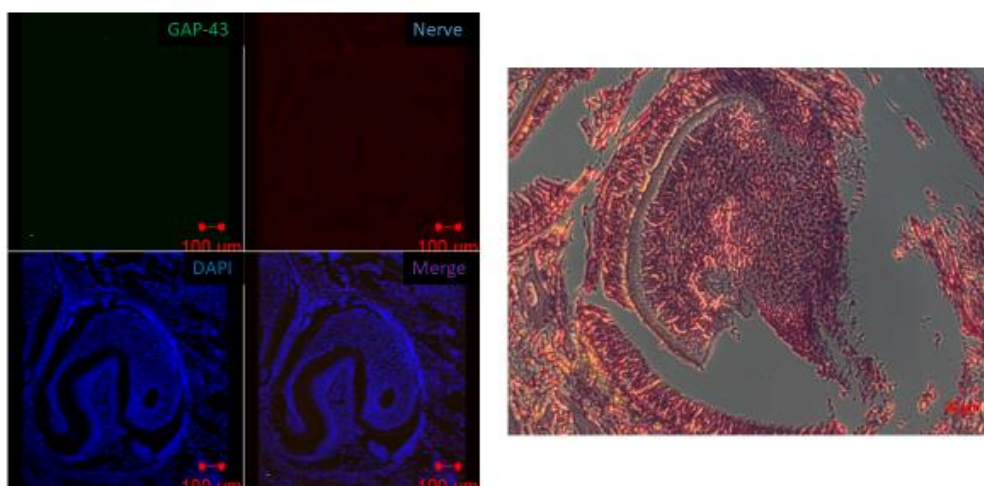


圖 4- 25 P4 GAP-43 Control

出生後四天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43（GAP-43）對照組在牙胚周圍是免疫反應陰性。

P8 GAP 43

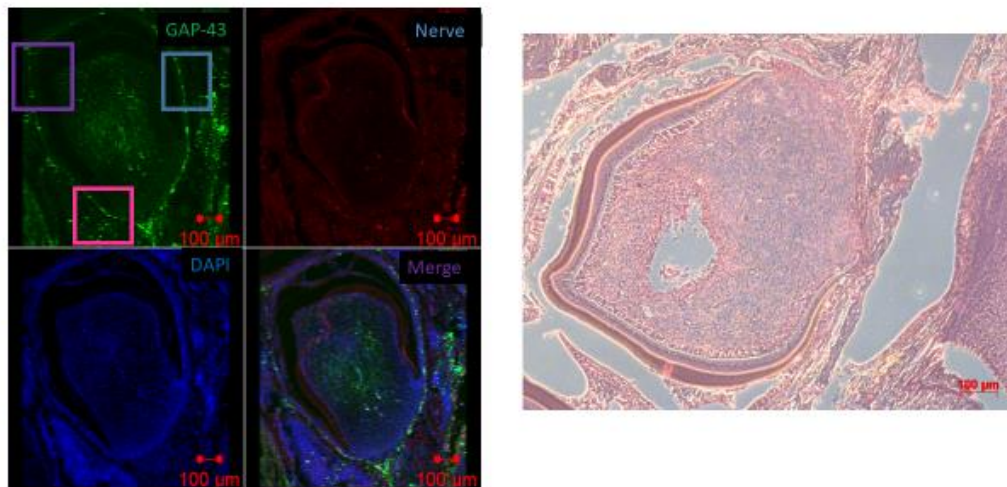


圖 4- 26 P8 GAP-43

出生後八天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43（GAP-43）在牙胚周圍，牙胚齒頸部和牙胚內是免疫反應陽性。

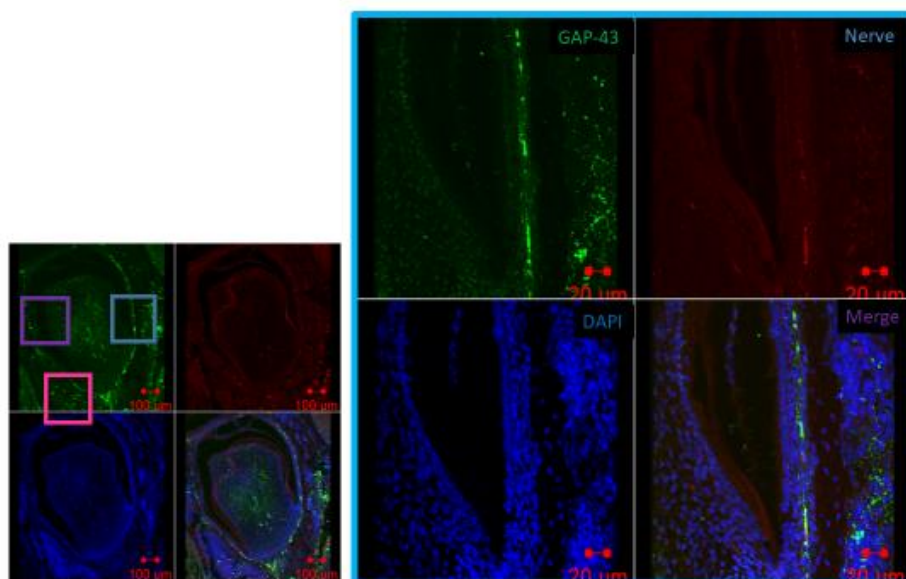


圖 4- 27 P8 GAP-43(1)

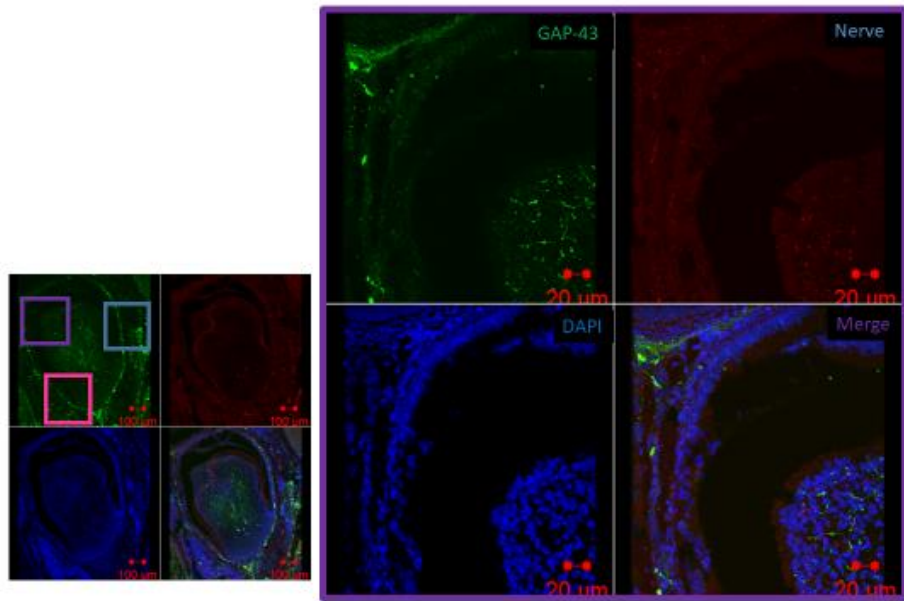


圖 4- 28 P8 GAP-43(2)

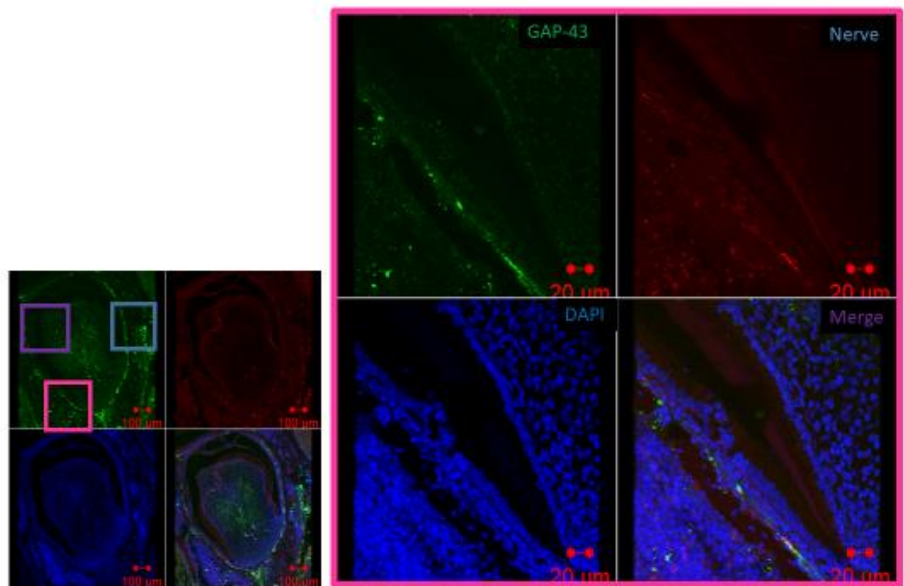


圖 4- 29 P8 GAP-43(3)

圖 4-27,28,29 :出生後八天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43 (GAP-43) 在牙胚周圍，牙胚齒頸部和牙胚內是免疫反應陽性。

P8 GAP 43 control

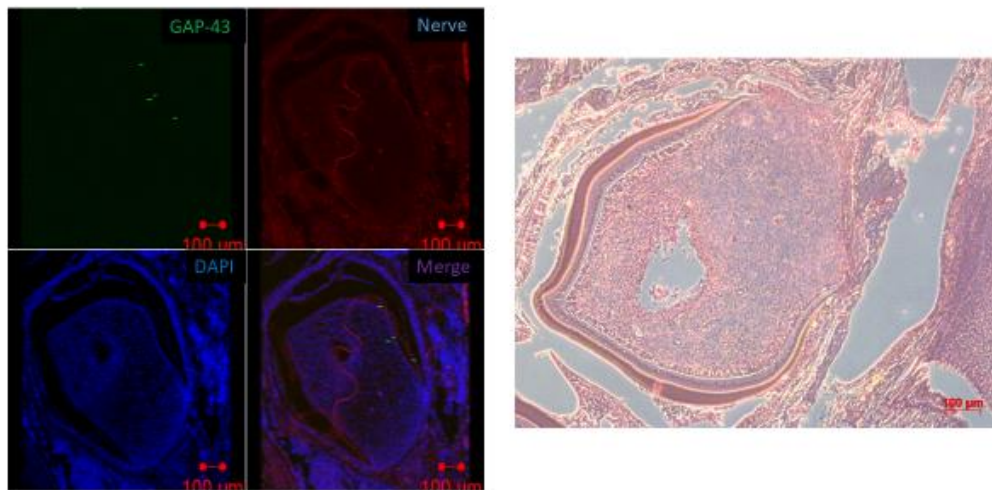


圖 4- 30 P8 GAP-43 Control

出生後八天的牙胚中結果顯示生長相關蛋白 43（GAP-43）對照組在牙胚周圍，牙胚齒頸部和牙胚內是免疫反應陰性。

GAP-43 Positive control: human pulp Raschkow plexus

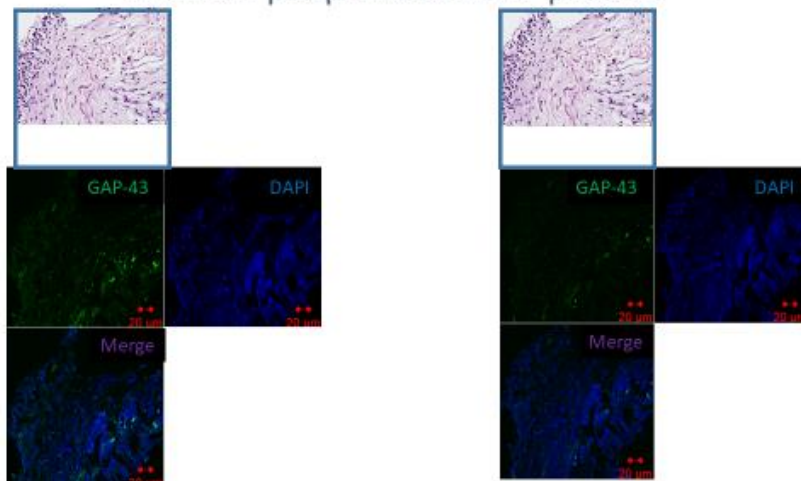


圖 4- 31 GAP-43 Positive Control: human pulp Raschkow plexus

細胞內生長相關蛋白 Growth associated protein-43(GAP-43) 的 Positive control 組免疫螢光染色是染的人類牙髓中的 Raschkow plexus(圖 4-31)

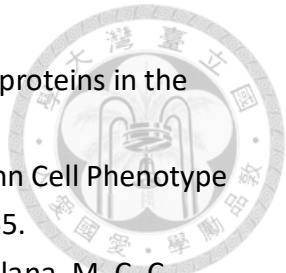
第八章 參考書目



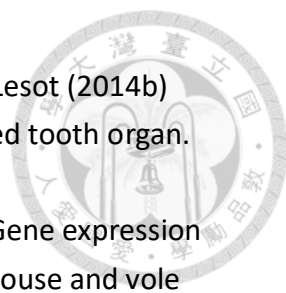
Uncategorized References

- (1966) Ramon y Cajal. *New England Journal of Medicine*, 274, 1508-1508.
- Aarts, L. H., P. Schotman, J. Verhaagen, L. H. Schrama & W. H. Gispen (1998) The role of the neural growth associated protein B-50/GAP-43 in morphogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 446, 85-106.
- Abd-Elmeguid, A. & D. C. Yu (2009a) Dental pulp neurophysiology: part 1. Clinical and diagnostic implications. *J Can Dent Assoc*, 75, 55-9.
- (2009b) Dental pulp neurophysiology: part 2. Current diagnostic tests to assess pulp vitality. *J Can Dent Assoc*, 75, 139-43.
- Avery, J. K. & D. J. Chiego. 2006. *Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach*. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier.
- Balic, A. & I. Thesleff (2015) Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Curr Top Dev Biol*, 115, 157-86.
- Benowitz, L. I. & A. Routtenberg (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci*, 20, 84-91.
- Berman, L. H. & K. M. Hargreaves. 2016. *Cohen's Pathways of the Pulp*. Elsevier.
- Bernick, S. (1959) Innervation of the developing molar teeth of rats. *The Anatomical Record*, 133, 91-103.
- Biggs, L. C. & M. L. Mikkola (2014) Early inductive events in ectodermal appendage morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 25-26, 11-21.
- Byers, M. R. (1980) Development of sensory innervation in dentin. *J Comp Neurol*, 191, 413-27.
- (1984) Dental sensory receptors. *Int Rev Neurobiol*, 25, 39-94.
- Byers, M. R., S. J. Neuhaus & J. D. Gehrig (1982) Dental sensory receptor structure in human teeth. *Pain*, 13, 221-35.
- Byers, M. R., G. C. Schatteman & M. Bothwell (1990) Multiple functions for NGF receptor in developing, aging and injured rat teeth are suggested by epithelial, mesenchymal and neural immunoreactivity. *Development*, 109, 461-71.
- Byers, M. R., E. F. Wheeler & M. Bothwell (1992) Altered expression of NGF and P75 NGF-receptor by fibroblasts of injured teeth precedes sensory nerve sprouting. *Growth Factors*, 6, 41-52.
- Chao, M. V. (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many

- signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 4, 299-309.
- Couve, A. & J. T. Kittler (2014) Preface. Trafficking of organelles and proteins in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol*, 27, 1-2.
- Couve, E., M. Lovera, K. Suzuki & O. Schmachtenberg (2018) Schwann Cell Phenotype Changes in Aging Human Dental Pulp. *J Dent Res*, 97, 347-355.
- Covas, D. T., R. A. Panepucci, A. M. Fontes, W. A. Silva, Jr., M. D. Orellana, M. C. C. Freitas, L. Neder, A. R. D. Santos, L. C. Peres, M. C. Jamur & M. A. Zago (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146⁺ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, 36, 642-654.
- Dahlstrand, J., V. P. Collins & U. Lendahl (1992) Expression of the Class VI Intermediate Filament Nestin in Human Central Nervous System Tumors. *Cancer Research*, 52, 5334-5341.
- Dassule, H. R. & A. P. McMahon (1998) Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol*, 202, 215-27.
- Davies, A. M. (1988) Role of neurotrophic factors in development. *Trends Genet*, 4, 139-43.
- (1997) Neurotrophin switching: where does it stand? *Curr Opin Neurobiol*, 7, 110-8.
- Diamond, J., M. Coughlin, L. Macintyre, M. Holmes & B. Visheau (1987) Evidence that endogenous beta nerve growth factor is responsible for the collateral sprouting, but not the regeneration, of nociceptive axons in adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 6596-600.
- Elshal, M. F., S. S. Khan, N. Raghavachari, Y. Takahashi, J. Barb, J. J. Bailey, P. J. Munson, M. A. Solomon, R. L. Danner & J. P. McCoy, Jr. (2007) A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile. *BMC Immunol*, 8, 29.
- Elshal, M. F., S. S. Khan, Y. Takahashi, M. A. Solomon & J. P. McCoy, Jr. (2005) CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*, 106, 2923-4.
- Flanagan, K., K. Fitzgerald, J. Baker, K. Regnstrom, S. Gardai, F. Bard, S. Mocci, P. Seto, M. You, C. Larochelle, A. Prat, S. Chow, L. Li, C. Vandever, W. Zago, C. Lorenzana, C. Nishioka, J. Hoffman, R. Botelho, C. Willits, K. Tanaka, J. Johnston & T. Yednock (2012) Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One*, 7, e40443.
- Fraser, G. J., C. D. Hulsey, R. F. Bloomquist, K. Uyesugi, N. R. Manley & J. T. Streelman

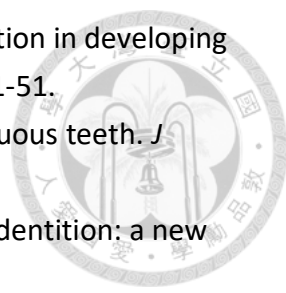


- (2009) An ancient gene network is co-opted for teeth on old and new jaws. *PLoS Biol*, 7, e31.
- Fried, K. & C. Hildebrand (1981a) Developmental growth and degeneration of pulpal axons in feline primary incisors. *J Comp Neurol*, 203, 37-51.
- (1981b) Pulpal axons in developing, mature, and aging feline permanent incisors. A study by electron microscopy. *J Comp Neurol*, 203, 23-36.
- Fried, K., C. Nosrat, C. Lillesaar & C. Hildebrand (2000) Molecular signaling and pulpal nerve development. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11, 318-32.
- Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-8.
- Gronthos, S., J. Brahimi, W. Li, L. W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P. G. Robey & S. Shi (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81, 531-5.
- Guerette, D., P. A. Khan, P. E. Savard & M. Vincent (2007) Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. *BMC Evol Biol*, 7, 164.
- Haara, O., E. Harjunmaa, P. H. Lindfors, S. H. Huh, I. Fliniaux, T. Aberg, J. Jernvall, D. M. Ornitz, M. L. Mikkola & I. Thesleff (2012) Ectodysplasin regulates activator-inhibitor balance in murine tooth development through Fgf20 signaling. *Development*, 139, 3189-99.
- Hildebrand, J. D., M. D. Schaller & J. T. Parsons (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell*, 6, 637-47.
- Hoffman, R. M. (2007) The potential of nestin-expressing hair follicle stem cells in regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*, 7, 289-91.
- Jernvall, J. & I. Thesleff (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 92, 19-29.
- (2012) Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*, 139, 3487-97.
- Johnsen, D. C. (1985) Innervation of teeth: qualitative, quantitative, and developmental assessment. *J Dent Res*, 64 Spec No, 555-63.
- Johnsen, D. C. & U. L. Karlsson (1974) Electron microscopic quantitations of feline primary and permanent incisor innervation. *Arch Oral Biol*, 19, 671-8.
- (1977) Development of neural elements in apical portions of cat primary and permanent incisor pulps. *Anat Rec*, 189, 29-43.
- Jussila, M. & I. Thesleff (2012) Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a008425.
- Kökten, T., T. Bécavin, L. Keller, J. L. Weickert, S. Kuchler-Bopp & H. Lesot (2014a) Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ.

- 
- PLoS One*, 9, e86011.
- Kökten, T., T. Bécavin, L. Keller, J.-L. Weickert, S. Kuchler-Bopp & H. Lesot (2014b) Immunomodulation stimulates the innervation of engineered tooth organ. *PLoS one*, 9, e86011-e86011.
- Keränen, S. V., P. Kettunen, T. Aberg, I. Thesleff & J. Jernvall (1999) Gene expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions. *Dev Genes Evol*, 209, 495-506.
- Kettunen, P., B. Spencer-Dene, T. Furmanek, I. H. Kvinnsland, C. Dickson, I. Thesleff & K. Luukko (2007) Fgfr2b mediated epithelial-mesenchymal interactions coordinate tooth morphogenesis and dental trigeminal axon patterning. *Mech Dev*, 124, 868-83.
- Kollar, E. & A. Lumsden (1979a) Tooth morphogenesis: the role of the innervation during induction and pattern formation. *Journal de biologie buccale*, 7, 49-60.
- Kollar, E. J. & A. G. Lumsden (1979b) Tooth morphogenesis: the role of the innervation during induction and pattern formation. *J Biol Buccale*, 7, 49-60.
- Kuchler-Bopp, S., A. Larrea, L. Petry, Y. Idoux-Gillet, V. Sebastian, A. Ferrandon, P. Schwinte, M. Arruebo & N. Benkirane-Jessel (2017) Promoting bioengineered tooth innervation using nanostructured and hybrid scaffolds. *Acta Biomater*, 50, 493-501.
- Kuske, M. D. & J. P. Johnson (1999) Assignment of the human melanoma cell adhesion molecule gene (MCAM) to chromosome 11 band q23.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*, 87, 258.
- Lee, J. H., S. Um, I. S. Song, H. Y. Kim & B. M. Seo (2014) Neurogenic differentiation of human dental stem cells in vitro. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*, 40, 173-80.
- Lewin, G. R. & Y. A. Barde (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19, 289-317.
- Linde, A. & M. Goldberg (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4, 679-728.
- Lindsay, R. M. (1988) Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci*, 8, 2394-405.
- Lumsden, A. (1982) The developing innervation of the lower jaw and its relation to the formation of tooth germs in mouse. *Teeth; from, function and evolution*, 32-43.
- Luukko, K. (1997) Immunohistochemical localization of nerve fibres during development of embryonic rat molar using peripherin and protein gene product 9.5 antibodies. *Arch Oral Biol*, 42, 189-95.
- Luukko, K. & P. Kettunen (2014) Coordination of tooth morphogenesis and neuronal

- development through tissue interactions: lessons from mouse models. *Exp Cell Res*, 325, 72-7.
- Luukko, K., I. H. Kvinnsland & P. Kettunen (2005) Tissue interactions in the regulation of axon pathfinding during tooth morphogenesis. *Dev Dyn*, 234, 482-8.
- Luukko, K., M. Moshnyakov, K. Sainio, M. Saarma, H. Sariola & I. Thesleff (1996) Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. *Dev Dyn*, 206, 87-99.
- Luukko, K., K. Sainio, H. Sariola, M. Saarma & I. Thesleff (1997) Localization of nerve cells in the developing rat tooth. *J Dent Res*, 76, 1350-6.
- Mahdee, A., J. Eastham, J. M. Whitworth & J. I. Gillespie (2019) Evidence for changing nerve growth factor signalling mechanisms during development, maturation and ageing in the rat molar pulp. *Int Endod J*, 52, 211-222.
- Marrelli, M., F. Paduano & M. Tatullo (2015) Human periapical cyst-mesenchymal stem cells differentiate into neuronal cells. *J Dent Res*, 94, 843-52.
- Martens, W., A. Bronckaers, C. Politis, R. Jacobs & I. Lambrichts (2013) Dental stem cells and their promising role in neural regeneration: an update. *Clin Oral Investig*, 17, 1969-83.
- Matsuo, S., H. Ichikawa, T. A. Henderson, I. Silos-Santiago, M. Barbacid, J. J. Arends & M. F. Jacquin (2001) trkA modulation of developing somatosensory neurons in oro-facial tissues: tooth pulp fibers are absent in trkA knockout mice. *Neuroscience*, 105, 747-60.
- Michalczyk, K. & M. Ziman (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*, 20, 665-71.
- Mitsiadis, T. A., P. Couble, E. Dicou, B. B. Rudkin & H. Magloire (1993) Patterns of nerve growth factor (NGF), proNGF, and p75 NGF receptor expression in the rat incisor: comparison with expression in the molar. *Differentiation*, 54, 161-75.
- Mitsiadis, T. A., E. Dicou, A. Joffre & H. Magloire (1992) Immunohistochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor (NGF-R) in the developing first molar tooth of the rat. *Differentiation*, 49, 47-61.
- Mitsiadis, T. A. & P. Pagella (2016) Expression of Nerve Growth Factor (NGF), TrkA, and p75(NTR) in Developing Human Fetal Teeth. *Front Physiol*, 7, 338.
- Moe, K., P. Kettunen, I. H. Kvinnsland & K. Luukko (2008) Development of the pioneer sympathetic innervation into the dental pulp of the mouse mandibular first molar. *Arch Oral Biol*, 53, 865-73.
- Mohamed, S. S. & M. E. Atkinson (1982) The ontogeny of substance P-containing

- nerve fibres in the developing mouse dentition. *Anatomy and embryology*, 164, 153-159.
- Mohamed, S. S. & M. E. Atkinson (1983) A histological study of the innervation of developing mouse teeth. *J Anat*, 136, 735-49.
- Mohiuddin, A. (1950) The fate of the nerves of the deciduous teeth. *J Anat*, 84, 319-23.
- Mucchielli, M. L., T. A. Mitsiadis, S. Raffo, J. F. Brunet, J. P. Proust & C. Goridis (1997) Mouse *Otlx2*/RIEG expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Dev Biol*, 189, 275-84.
- Naftel, J. P., X. B. Qian & J. M. Bernanke (1994) Effects of postnatal anti-nerve growth factor serum exposure on development of apical nerves of the rat molar. *Brain Res Dev Brain Res*, 80, 54-62.
- Naftel, J. P., A. Shamssoolari & R. K. Thueson (1992) Immunoassay evidence for a role of nerve growth factor in development of dental innervation. *Proc Finn Dent Soc*, 88 Suppl 1, 543-9.
- Nanci, A. 2008. Ten Cate's oral histology: development, structure, and formation. St. Louis, MO, Mosby.
- Nishikawa, S. (2006) Systemic labeling and visualization of dental sensory nerves by the novel fluorescent marker AM1-43. *Anat Sci Int*, 81, 181-6.
- (2007) Developmental changes in pulpal sensory innervation of rat incisors and molars shown on a single injection of the fluorescent dye AM1-43. *Anat Sci Int*, 82, 227-32.
- (2008) Histochemistry of nerve fibres double labelled with anti-TRPV2 antibodies and sensory nerve marker AM1-43 in the dental pulp of rat molars. *Arch Oral Biol*, 53, 859-64.
- Nosrat, C. A., K. Fried, T. Ebendal & L. Olson (1998) NGF, BDNF, NT3, NT4 and GDNF in tooth development. *Eur J Oral Sci*, 106 Suppl 1, 94-9.
- Nosrat, C. A., K. Fried, S. Lindskog & L. Olson (1997) Cellular expression of neurotrophin mRNAs during tooth development. *Cell Tissue Res*, 290, 569-80.
- Nourbakhsh, N., M. Soleimani, Z. Taghipour, K. Karbalaie, S. B. Mousavi, A. Talebi, F. Nadali, S. Tanhaei, G. A. Kiyani, M. Nematollahi, F. Rabiei, M. Mardani, H. Bahramiyan, M. Torabinejad, M. H. Nasr-Esfahani & H. Baharvand (2011) Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int J Dev Biol*, 55, 189-95.
- Nuti, N., C. Corallo, B. M. Chan, M. Ferrari & B. Gerami-Naini (2016) Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev*, 12, 511-523.

- 
- Pagella, P., L. Jimenez-Rojo & T. A. Mitsiadis (2014) Roles of innervation in developing and regenerating orofacial tissues. *Cell Mol Life Sci*, 71, 2241-51.
- Pearson, A. A. (1977) The early innervation of the developing deciduous teeth. *J Anat*, 123, 563-77.
- Peterkova, R., M. Peterka & H. Lesot (2003) The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 453-66.
- Qian, X. B. & J. P. Naftel (1996) Effects of neonatal exposure to anti-nerve growth factor on the number and size distribution of trigeminal neurones projecting to the molar dental pulp in rats. *Arch Oral Biol*, 41, 359-67.
- Ratajczak, J., A. Bronckaers, Y. Dillen, P. Gervois, T. Vangansewinkel, R. B. Driesen, E. Wolfs, I. Lambrichts & P. Hilken (2016) The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering. *Stem Cells Int*, 2016, 9762871.
- Rosskoth-Kuhl, N. & R.-B. Illing (2014) Gap43 transcription modulation in the adult brain depends on sensory activity and synaptic cooperation. *PloS one*, 9, e92624-e92624.
- Ruch, J. V., H. Lesot & C. Begue-Kirn (1995) Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*, 39, 51-68.
- Russell, K. C., D. G. Phinney, M. R. Lacey, B. L. Barrilleaux, K. E. Meyertholen & K. C. O'Connor (2010) In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*, 28, 788-98.
- Sasano, T., N. Shoji, S. Kuriwada, D. Sanjo, H. Izumi & K. Karita (1995) Absence of parasympathetic vasodilatation in cat dental pulp. *J Dent Res*, 74, 1665-70.
- Shirokova, V., M. Jussila, M. K. Hytonen, N. Perala, C. Drogemuller, T. Leeb, H. Lohi, K. Sainio, I. Thesleff & M. L. Mikkola (2013) Expression of Foxi3 is regulated by ectodysplasin in skin appendage placodes. *Dev Dyn*, 242, 593-603.
- Sohn, W. J., G. J. Gwon, C. H. An, C. Moon, Y. C. Bae, H. Yamamoto, S. Lee & J. Y. Kim (2011) Morphological evidences in circumvallate papilla and von Ebners' gland development in mice. *Anat Cell Biol*, 44, 274-83.
- Taylor, P. E. & M. R. Byers (1990) An immunocytochemical study of the morphological reaction of nerves containing calcitonin gene-related peptide to microabscess formation and healing in rat molars. *Arch Oral Biol*, 35, 629-38.
- Teranishi, N., Z. Naito, T. Ishiwata, N. Tanaka, K. Furukawa, T. Seya, S. Shinji & T. Tajiri (2007) Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol*, 30, 593-603.
- Terling, C., A. Rass, T. A. Mitsiadis, K. Fried, U. Lendahl & J. Wroblewski (1995) Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth

- development. *Int J Dev Biol*, 39, 947-56.
- Thesleff, I. (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*, 116, 1647-8.
- (2018) From understanding tooth development to bioengineering of teeth. *Eur J Oral Sci*, 126 Suppl 1, 67-71.
- Thesleff, I. & M. Mikkola (2002) The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol*, 217, 93-135.
- Tsuzuki, H. & H. Kitamura (1991) Immunohistochemical analysis of pulpal innervation in developing rat molars. *Arch Oral Biol*, 36, 139-46.
- Tummers, M. & I. Thesleff (2009) The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 312b, 309-19.
- Turner, D. F., C. F. Marfurt & C. Sattelberg (1989) Demonstration of physiological barrier between pulpal odontoblasts and its perturbation following routine restorative procedures: a horseradish peroxidase tracing study in the rat. *J Dent Res*, 68, 1262-8.
- Walters, J. W., J. L. Anderson, R. Bittman, M. Pack & S. A. Farber (2012) Visualization of lipid metabolism in the zebrafish intestine reveals a relationship between NPC1L1-mediated cholesterol uptake and dietary fatty acid. *Chemistry & biology*, 19, 913-925.
- Wassermann, F. (1939) The Innervation of Teeth. *The Journal of the American Dental Association*, 26, 1097-1109.
- Wiese, C., A. Rolletschek, G. Kania, P. Blyszczuk, K. V. Tarasov, Y. Tarasova, R. P. Wersto, K. R. Boheler & A. M. Wobus (2004) Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*, 61, 2510-22.
- Winkler, L. A., J. H. Schwartz & D. R. Swindler (1991) Aspects of dental development in the orangutan prior to eruption of the permanent dentition. *American Journal of Physical Anthropology*, 86, 255-271.