

DẤU ẤN THỜI GIAN CỦA TỦY RĂNG

Mai Bá Hoàng Anh

Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

TÓM TẮT

Tủy răng là mô liên kết giàu mạch máu nằm trong trong khoang răng, nó có những những đóng góp quan trọng trong lĩnh vực vi sinh liên quan khảo cổ học trong hơn 20 năm qua. Proteomics đã xác định tủy răng cổ vẫn còn chứa đựng các protein. Chúng tôi tiến hành khảo sát dấu ấn thời gian thông qua xác định các protein ở các răng có niên đại khác nhau bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ. Kết quả chỉ ra rằng, nồng độ protein trong các răng cổ là 0,29 - 0,92 g/L, trong các răng hiện tại là 1,58 - 2,9 g/L. Albumin chỉ có trong các răng hiện tại, collagen alpha-1 hiện diện không ổn định trong khi đó collagen alpha-2 có tính ổn định với thời gian.

Từ khóa: Albumin, collagen, protein, sắc ký lỏng khối phổ, tủy răng.

MỞ ĐẦU

Sự hiện diện của các phân tử sinh học trong các mẫu vật khảo cổ có vai trò quan trọng trong việc tìm hiểu và phục hồi thông tin trước đây. Năm 1980, lần đầu tiên kĩ thuật miễn dịch đã phát hiện collagen có trong các mẫu hóa thạch của con người (Lowenstein, 1980). Phương pháp giải trình tự mới tiết lộ rằng collagen có tính đặc trưng hơn so với những gì đã biết trước đây và chứa giá trị lớn để tìm hiểu phát sinh loài (Buckley *et al.*, 2009). Gần đây, phần lớn các nghiên cứu đã tập trung vào các protein cụ thể, sau đó là các hỗn hợp protein trong xương khảo cổ, nhưng sự thoái hóa của mô khảo cổ là trở ngại chính cho phân tích và cho ra kết quả xác thực (Schmidt-Schultz *et al* 2004; Dobberstein *et al.*, 2009). Các protein như collagens, protein miễn dịch, protein non-collagen được phân lập từ xương cổ qua hàng ngàn năm đã dần được tiết lộ bằng một số kỹ thuật phân tích (Schmidt-Schultz, Schultz, 2004). Mặc dù xương chứa hàng ngàn protein khác nhau nhưng hầu hết không thể tồn tại lâu dài trong điều kiện chôn cất và sự giảm chất lượng của protein liên quan với thời gian. Collagen type 1 có cấu trúc ổn định với hai chuỗi alpha-1 và một chuỗi alpha-2 đã chứng tỏ khả năng tồn tại lâu hơn so với các protein non-collagen (Wadsworth, Buckley, 2014). Tủy răng là mô liên kết nằm bên trong khoang tủy răng, được bảo vệ với bên ngoài bởi men răng và ngà răng, tủy răng cổ ngày càng có nhiều đóng góp cho ngành vi sinh liên quan khảo cổ học (paleomicrobiology) và nhiều protein đã được phát hiện (Barbieri *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, kỹ thuật proteomics được sử dụng để khảo sát dấu ấn thời gian thông qua xác định các protein có trong tủy răng.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Răng cổ - địa điểm nghiên cứu

Các răng cổ được khai quật từ các ngôi mộ đơn lẻ hay tập thể trên nước Pháp được bảo quản ở các trung tâm khảo cổ học của nước Pháp được cấp phép chuyển đến trung tâm bệnh lý truyền nhiễm IHU-Méditerranée Infection, Marseille, Pháp để nghiên cứu. Chúng tôi chọn các răng có niên đại chôn cất khác nhau cùng với răng hiện tại được lấy từ khoa Răng - bệnh viện Timone - Marseille để đưa vào nghiên cứu, các răng này đều là răng vĩnh viễn và thuộc người châu Âu. Các tiêu chuẩn về răng: không có tổn thương hay bệnh lý bề mặt, đỉnh răng kín để hạn chế tối đa sự nhiễm tác nhân bên ngoài vào bên trong khoang tủy răng. Chi tiết về răng trong Bảng 1.

Bảng 1. Danh sách các răng và số thứ tự

Địa điểm	Niên đại	Số thứ tự răng
Viotte - Besançon, Pháp	Thế kỉ 1 - 3	1, 2, 3
ZAC Pasteur - Besançon, Pháp	Thế kỉ 7 - 10	4, 5, 6
La Maladrerie des Templiers, Pháp	Thế kỉ 11 - 13	7, 8, 9
Auxi - le - Château, Pháp	Thế kỉ 17	10, 11
Timone - Marseille, Pháp	Năm 2018	12, 13

Thu thập tủy răng và chiết xuất protein

Sau khi rửa sạch bằng nước chưng cất và để khô tự nhiên, chúng tôi dùng răng cửa điện trong nha khoa để cắt đôi răng, sau đó dùng que nạo để lấy và hứng tủy răng vào trong tuýp eppendorf 1,5mL (Hình 1). Thêm 200 μ L EDTA 0,5M (pH 8) vào mỗi tuýp, sau đó được ủ trên khay lắc và để qua đêm. Hỗn hợp này sau đó được quay ly tâm ở 4°C trong 15 phút ở 15000g, lấy phần dung dịch ra và bảo quản ở -20°C (Dung dịch 1). Phần lắng đọng còn lại được rửa hai lần với 200 μ L nước chưng cất, sau đó thêm vào 100 μ L dung dịch amoni bicarbonate 50 mM (pH 7,4), ủ ở 75°C trong 24 giờ, sau đó lại quay ly tâm trong 15 phút ở 15000g, lấy phần dung dịch này ra (Dung dịch 2). Dung dịch 1 và 2 được thẩm tách bằng hệ thống Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette 2K MWCO (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) với 2 L dung dịch chứa 50 mM ammonium bicarbonate (pH 7,4) trong 24 giờ. Các phần được thẩm tách được thu thập vào một tuýp Eppendorf cho mỗi răng và nồng độ protein được xác định theo công thức Bradford. Sau đó, các dung dịch này được ủ trong một giờ ở 30°C với 5 mM dithiothreitol (50 g protein được xử lý với 1 μ L dithiothreitol), sau đó được kiểm hóa trong 1 giờ trong bóng tối với 15 mM iodoacetamide (50 g protein được xử lý 2 μ M dithiothreitol). Độ pH cuối cùng được điều chỉnh trong khoảng từ 7,4 - 7,6. Dung dịch protein được phân tách bằng cách sử dụng trypsin (Agilent Technologies, CA, US) với tỷ lệ 1 μ L trypsin cho 25 μ g protein ở 37°C và ủ qua đêm. Nhóm chứng được làm đồng thời với quá trình trên nhưng không chứa tủy răng.



Hình 1. Quy trình lấy tủy răng

Phân tích bằng Sắc Ký Lông Khối Phổ (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry)

Các protein tinh khiết được phân giải bằng trypsin và sau đó được phân tích bằng hệ thống nanoAcquity UPLC, kết nối với máy quang phổ ion Synapt G2Si Q-TOF. Phương pháp sắc ký được sử dụng là pseudo1D-LC được thực hiện với cách dựng 2D. Các peptide được đặt trên cột phân tích (nanoAcquity UPLC 2D-V/M Trap 5 μ m Symmetry C18 180 μ m x 20mm, Waters) để cô đặc và khử muối, ở mức 20 μ L/phút với 99,9% của axit formic 0,1% và 0,1% của acetonitril-axit formic 0,1%. Các peptide này sau đó được tách trên cột phân tích C18 (nanoAcquity UPLC 1,8 mm HSS C18 75 mm x 250 mm, Waters) và pha loãng với độ dốc 90 phút từ 0,5 đến 50% acetonitril với 0,1% axit formic ở tốc độ 300 nL / phút.

Phân tích khối phổ được thực hiện trong chế độ Data Dependant Acquisition (DDA), với chế độ này, 12 peptid được chọn rồi tiếp tục được phân mảnh. Cường độ ngưỡng chọn cho các peptide này là 5000. Cực tính dương, điện áp mao quản 3 kV, 40 V đối với chóp lấy mẫu, nhiệt độ nguồn được đặt ở 90°C, nhiệt độ cô lập đặt ở 150°C và lưu lượng khí từ chóp là 50L/Hr. Cửa sổ khối được ghi là 300-1600 m/z, bắt đầu sau 5 phút và kết thúc sau 110 phút.

Các dốc năng lượng va chạm là 14-19 eV cho khối lượng thấp và 50-64 eV cho khối lượng cao. Dữ liệu MS thô được xử lý bằng phần mềm Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc, Waterloo, Canada). Các tham số xử lý dữ liệu được sử dụng là: tải lượng peptide tối thiểu là 1+, dung sai khối lượng đối với các peptide gốc là 15 ppm và 0,6 Da đối với các đoạn thiếu sót của sự phân cắt enzyme được chấp nhận có giá trị tối đa 3. Carbamidomethylation C như là sửa đổi cố định duy nhất, khử amin trong NQ và oxy hóa trong M là biến đổi thay đổi, giá trị của Peptide -10lgP được ủy quyền cố định ở ≥ 30 , (protein -10lgP ≥ 20 , de novo chỉ TLC 3, ALC 50). Trình tự protein lý thuyết được sử dụng trong các tài liệu fasta để nhận dạng được lấy trực tuyến trên các trang web NCBI và Swissprot.

KẾT QUẢ

Sau khi chiết xuất protein, nồng độ protein trong răng cổ dao động từ 0,29 - 0,92 g/L và hai răng hiện tại là 1,58 và 2,9 g/L. Các răng cổ cũng không có albumin, trái ngược với hai răng hiện tại khi albumin có số lượng peptid là 19 và 33. Đối với collagen alpha-1, số lượng peptide có trong các răng: 1, 2, 3, 7, 8, 12. Đối với collagen alpha-2, số lượng peptid có trong tất cả các răng (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả nồng độ protein và số lượng peptid trong các protein

Niên đại	Răng	Nồng độ protein g/L	Số lượng peptid		
			Albumin	Collagen alpha-1	Collagen alpha-2
Thế kỉ 1 - 3	1	0.92	0	24	20
	2	0.51	0	38	27
	3	0.36	0	20	19
Thế kỉ 7 – 10	4	0.36	0	0	34
	5	0.39	0	0	16
	6	0.5	0	0	26
Thế kỉ 11 - 13	7	0.6	0	18	19
	8	0.53	0	19	16
	9	0.53	0	0	19
Thế kỉ 17	10	0.29	0	0	19
	11	0.63	0	0	13
Năm 2018	12	1.58	19	18	19
	13	2.9	33	0	18

THẢO LUẬN

Vào năm 2017, lần đầu tiên proteomics được áp dụng trên tủy răng cổ từ những người chết cách đây 300 năm thông qua chẩn đoán bệnh dịch hạch bằng cách xác định các peptid đặc trưng của vi khuẩn *Yersinia pestis* có trong tủy răng (Barbieri *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng LC/MS để khảo sát các protein có trong tủy răng được lấy từ niên đại khác nhau, có nhiều protein đã được xác định trong tủy răng cổ và cả răng hiện tại, tuy nhiên chúng tôi tập trung vào albumin và collagen vì nhận thấy có sự khác biệt rõ giữa các răng. Rõ ràng nồng độ protein có trong răng hiện tại là cao hơn so với răng cổ vì liên quan đến hiện tượng thoái hóa theo thời gian của protein (Schmidt-Schultz *et al.* 2004; Wadsworth *et al.*, 2014). Albumin là một protein huyết thanh, nó đã được phát hiện trong các mẫu xương cách đây hàng ngàn năm nhưng khả năng tồn tại không ổn định và phụ thuộc vào nhiều yếu tố hóa lý (Cattaneo *et al.*, 1995; Wadsworth and Buckley, 2014). Trong nghiên cứu trước, albumin có mặt hai trên mười sáu răng cổ nhưng trong nghiên cứu này nó không hiện diện (Barbieri *et al.*, 2017), điều này có thể liên quan đến đặc điểm albumin, cách thức phân lập protein và phương pháp xác định protein khác nhau. Khả năng tồn tại kéo dài của collagen chủ yếu là do đặc điểm cấu trúc, trong đó một số lượng lớn các phân tử collagen xoắn ba được liên kết chéo thành các sợi ổn định (Knott *et al.*, 1998). Các không gian bên trong và giữa các sợi collagen chứa đầy khoáng chất hydroxyapatite, một chất giúp tăng cường hơn nữa sự ổn định cấu trúc nhằm chống lại tác dụng không mong muốn của môi trường chôn cất (Weiner and Traub, 1986). So với chuỗi alpha-1, chuỗi alpha-2 thể hiện sự biến đổi trình tự lớn hơn và độ ổn định cao hơn, do đó các phương pháp proteomics phân tích chuỗi alpha-2 để xác định các loài trong khảo cổ học và cổ sinh vật học (Buckley *et al.*, 2014). Những đặc điểm này giúp thể giải thích rằng không phải alpha-1 mà là alpha 2 có trong tất cả các răng cổ.

KẾT LUẬN

Albumin xuất hiện ở trong tủy răng hiện tại, collagen alpha-1 có sự hiện diện trong tủy răng cổ trong không ổn định. Collagen alpha-2 có mặt trong tủy răng và tồn tại theo thời gian. Nghiên cứu này đã chỉ ra được tủy răng được xem như một vật liệu để khảo sát dấu ấn về thời gian.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Barbieri R, Mekni R, Lévassieur A, Chabrière E, Signoli M, Tzortzis S, et al. (2017) Paleoproteomics of the Dental Pulp: The plague paradigm. *PLoS ONE* 12: e0180552

Buckley M, Collins M, Thomas-Oates J, Wilson JC (2009) Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 23: 3843-3854.

- Buckley M, Fraser S, Herman J, Melton ND, Mulville J, Pálsdóttir AH (2014) Species identification of archaeological marine mammals using collagen fingerprinting. *J Archaeol Sci* 41: 631-641.
- Cattaneo C, Gelsthorpe K, Phillips P, Sokol RJ (1995) Differential Survival of Albumin in Ancient Bone. *J Archaeol Sci* 22: 271-276.
- Dobberstein RC, Collins MJ, Craig OE, Taylor G, Penkman KEH, Ritz-Timme S (2009) Archaeological collagen: Why worry about collagen diagenesis? *Archaeol Anthropol Sci* 1: 31-42.
- Knott L, Bailey AJ (1998) Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22: 181-187.
- Lowenstein JM (1980) Species-specific proteins in fossils. *Naturwissenschaften* 67: 343-346.
- Schmidt-Schultz TH, Schultz M (2004) Bone protects proteins over thousands of years: extraction, analysis, and interpretation of extracellular matrix proteins in archeological skeletal remains. *Am J Phys Anthropol* 123: 30-39.
- Wadsworth C, Buckley M (2014) Proteome degradation in fossils: investigating the longevity of protein survival in ancient bone. *Rapid Commun Mass Spectrom* 28: 605-615.
- Weiner S, Traub W (1986) Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett* 206: 262-266.

Lời cảm ơn: Chân thành cảm ơn đến nhóm nghiên cứu Paleomicrobiology của IHU, Marseille, Pháp đã giúp đỡ và hỗ trợ tôi trong quá trình làm đề tài này.

MARK TIME OF DENTAL PULP

Mai Ba Hoang Anh

University of Medicine and Pharmacy, Hue University

SUMMARY

The dental pulp is a high vascular connective tissue located in the dental cavity, it has important contributions in the paleomicrobiology over the past 20 years. Proteomics demonstrated that the ancient dental pulp contained proteins. We conduct a survey of the mark time through the identification of proteins in different chronological teeth by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry. Our results showed that the protein concentration of the ancient teeth was 0.29 - 0.92 g/L, of the current teeth is 1.58 - 2.9 g/L. Albumin was only present in current teeth, collagen alpha-1 had unstable property and collagen alpha-2 was stable over time.

Keywords: Albumin, collagen, protein, Liquid Chromatography / Mass Spectrometry, dental pulp.