

## 体外培养的人牙囊细胞矿化相关标志物的表达

王 滇<sup>1</sup>, 刘宏伟<sup>1</sup>, 金 岩<sup>2</sup>, 刘 源<sup>2</sup>, 刘兰宁<sup>1</sup> (<sup>1</sup>南方医科大学南方医院口腔科, 广东 广州 510515; <sup>2</sup>第四军医大学口腔医学院病理科, 陕西 西安 710032)

**摘要:**目的 体外培养人牙囊细胞, 探讨牙囊细胞是否具成骨、成牙骨质细胞表型特征, 是否可作为牙骨质再生的种子细胞。方法 酶消化联合组织块法获得人牙囊细胞, 免疫细胞化学染色技术检测其 I 型胶原、III 型胶原、骨桥蛋白、骨粘连蛋白的表达, RT-PCR 技术检测细胞的骨涎蛋白、骨钙素、碱性磷酸酶的表达。矿化诱导并连续培养牙囊细胞, 行 Von kossa 染色检测体外矿化形成情况。结果 免疫组化结果: 牙囊细胞中 I 型胶原、III 型胶原、骨桥蛋白、骨粘连蛋白呈不同程度的阳性表达; RT-PCR 结果显示骨涎蛋白、骨钙素、碱性磷酸酶表达。经矿化诱导后的牙囊细胞在 20 d 时可形成矿化结节, von Kossa 染色阳性。结论 牙囊细胞具有成骨细胞、成牙骨质细胞的部分特性, 体外培养的人牙囊细胞具有分泌合成矿化组织的能力, 可试将其作为牙周组织再生的种子细胞。

**关键词:** 牙囊细胞; 体外培养; 免疫细胞化学; 反转录聚合酶链反应

中图分类号: R781.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)08-1020-03

## Expression of mineral-associated markers in human dental follicle cells *in vitro*

WANG Zhen<sup>1</sup>, LIU Hong-wei<sup>1</sup>, JIN Yan<sup>2</sup>, LIU Yuan<sup>2</sup>, LIU Lan-ning<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

<sup>2</sup>Department of Oral Histology and Pathology, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**Abstract: Objective** To culture human dental follicle cells *in vitro* and observe their mineralization characteristics. **Methods** Human dental follicle tissues were digested with bacterial collagenase and cultured to obtain dental follicle cells. Mineralization characteristics of these cells were identified by immunohistochemistry and reverse transcription (RT)-PCR. Dental follicle cells were incubated with mineralization-inducing agents to observe the formation of mineralized nodules. **Results** Immunohistochemistry staining revealed expressions of type I collagen, type III collagen, osteopontin and osteonectin in the cytoplasm of dental follicle cells cultured *in vitro*. Low levels of bone sialoprotein, osteocalcin and alkaline phosphatase mRNA were also detected by RT-PCR. Mineralized nodules were observed after 20 days of incubation with mineralization-inducing agents with positivity for von-Kossa staining. **Conclusion** Human dental follicle cells cultured *in vitro* show some features of osteoblasts or cementoblasts and can be used as the seed cells for periodontal tissue engineering.

**Key words:** dental follicle cells; *in vitro* culture; immunohistochemistry; reverse transcription-polymerase chain reaction

在牙齿发育及萌出过程中, 牙囊细胞在上皮根鞘及牙乳头细胞的诱导下分化形成成牙骨质细胞、成纤维细胞及成骨细胞, 分泌牙骨质基质、胶原纤维、骨基质, 最终形成牙周组织<sup>[1]</sup>。一些文献报道, 体外培养的牙囊细胞具有某些成牙骨质、成骨样细胞的表型<sup>[2,3]</sup>, 最近有学者从永生化的牙囊细胞中分离出了成牙骨质细胞的祖细胞成份<sup>[4]</sup>, 进一步说明其在牙骨质发育中的重要性。本文利用酶消化联合组织块培养法体外获得人牙囊细胞, 通过免疫细胞化学检测及反转录聚合酶链反应, 从蛋白和 mRNA 水平分别检测牙囊细胞中几种矿化相关蛋白的表达, 并通过体外矿化条件下连续培养观察细胞形成矿化结

节的能力, 观察细胞的生物学特性, 探讨是否可将其用作牙周组织工程研究的种子细胞。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料和试剂

低糖 DMEM 培养基 (Gibco 美国); 新生牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 胰蛋白酶; 胶原酶; 抗人波形丝蛋白单克隆抗体 (DAKO, 美国); 抗人 I 型、III 型胶原、骨桥蛋白、骨粘连蛋白多克隆抗体 (NIDCR, Dr. Fisher 惠赠);  $\beta$ -甘油磷酸钠 (Sigma, USA); 免疫 ABC 试剂盒 (DAKO, 美国); 引物合成 (上海生工); TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 2.1 试剂盒; CO<sub>2</sub> 培养箱; 超净工作台; 倒置相差显微镜 (Olympus, 日本)

#### 1.2 细胞的培养、纯化及鉴定

4~6 月龄合法引产胎儿, 沿上下颌牙槽嵴顶切开粘骨膜层, 小挖匙完整挖出乳磨牙胚, 可见成釉器已

收稿日期: 2004-09-02

作者简介: 王 滇 (1973-), 女, 1995 年毕业于江西医学院口腔系, 硕士在读, 主治医师, 工作单位: 江西南昌解放军第九四医院, E-mail: wangzhen924@hotmail.com

成形,部分钙化。分离牙胚根表面包裹的纤维样组织,625  $\mu\text{g/ml}$  胶原酶消化 1 h,离心收集细胞及消化松散的碎组织块,加入 2~3 ml 低糖 DMEM 培养液(含有 100 ml/L 的新生牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100  $\mu\text{g/ml}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  孵箱中孵育。约 7~14 d 细胞可长满达 80%左右。胰酶消化传代,利用细胞对胰蛋白酶消化时间的不同,排除其内上皮细胞的混杂。免疫细胞化学检测细胞波形丝蛋白(Vimentin, VIM)、角蛋白(CK)。取第 3~4 代细胞用于本实验。

## 2 矿化相关蛋白检测

### 2.1 免疫细胞化学检测

2.1.1 制备细胞爬片 取第 3 代生长状态良好的牙囊细胞,消化下来后制成细胞悬液,接种在消毒好的小载玻片上,待细胞贴壁伸展后用 4%多聚甲醛固定细胞爬片。

2.1.2 免疫酶细胞化学染色 细胞爬片用 PBS 振洗 5 min $\times$ 3 次后,0.25%的 Triton-100 滴在爬片表面 10 min 增加细胞通透性;3%双氧水滴在爬片表面 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱 20 min,阻断内源性过氧化物酶;滴加羊血清 37  $^{\circ}\text{C}$ 温箱封闭 30 min;滴加一抗后入湿盒 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜,一抗为兔抗人 I 型、III 型胶原、骨桥蛋白、骨粘连蛋白多克隆抗体;次日 37  $^{\circ}\text{C}$ 温箱复温 1 h,加二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;加入辣根过氧化物酶复合物 37  $^{\circ}\text{C}$ 下 30 min;DAB+3% $\text{H}_2\text{O}_2$  光镜下控制显色,经苏木精核复染,逐级脱水透明后封片。用 PBS 替代一抗设立空白对照,正常兔血清替代一抗设立阴性对照。

### 2.2 提取细胞总 RNA 及反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

将第 3 代的牙囊细胞约 106 细胞量消化下来,常规方法提取细胞的总 RNA,反转录合成 cDNA。PCR 引物序列:人骨涎蛋白(BSP):上游引物序列 5'-CTATGGAGAGGACGCCACGCCTGG-3',下游引物序列 5'-CATAGCCATCGTAGCCTTGTCCT-3'(600 bp);人骨钙素(OCN):上游引物序列 5'-CATGAGAGCCCTCACA-3',下游引物序列 5'-AGAGCGACACCCTAGAC-3'(400 bp);人碱性磷酸酶(ALP):上游引物序列 5'-ATCTTTGGTCTGGCCCCATG-3',下游引物序列 5'-ATGCAGGCTGCATACGCCAT-3'(287 bp)。PCR 反应体系:10 $\times$ buffer 5  $\mu\text{l}$ ,25 pmol/ml 上下游引物各 1  $\mu\text{l}$ ,cDNA 模板 2  $\mu\text{l}$ ,10 mmol/L dNTP 1  $\mu\text{l}$ ,ExTaqDNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{l}$ ,补无核酶水至 50  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,退火温度 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  5 min。取 10 ml PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶上样电泳,凝胶成像系统分析。

## 2.3 体外矿化实验

取生长良好的第 3 代人牙囊细胞,按每孔  $1\times 10^5$  个的细胞量接种于 24 孔培养板中,细胞贴壁后,次日更换为矿化诱导液(含 10 mmol/l $\beta$ -甘油磷酸钠、50  $\mu\text{g/ml}$  维生素 C、10 nmol/l 地塞米松、100 ml/L 新生牛血清的低糖 DMEM)。3 d 换液一次,逐日倒置显微镜下观察。培养 30 d 后,行 Von kossa 染色:95%乙醇固定细胞,50 g/L 硝酸银日光下暴晒还原 30 min,蒸馏水洗后中性红复染。

## 3 结果

### 3.1 细胞形态学观察

原代 24 h 后镜下观察可见散在的贴壁伸展细胞,组织块周围亦有细胞呈放射状爬出,72 h 可见组织块周围细胞生长旺盛,7~14 d 细胞可传代。牙囊细胞为典型的成纤维样细胞形态,呈长梭形、多角形、纺锤形(图 1)。原代时有部分牙源性上皮成分混杂,因上皮细胞和牙囊细胞对胰酶的耐受性不同,经差速消化法传代可纯化牙囊细胞。免疫细胞化学检测抗 VIM 染色阳性,抗 CK 染色阴性,说明细胞来源于外胚间充质。

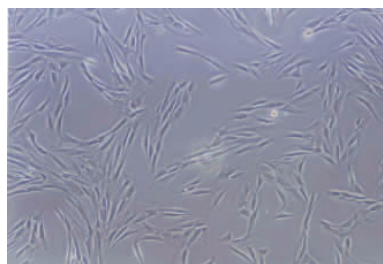


图 1 第 3 代 HDFC,成纤维细胞形态

Fig.1 Human dental follicle cells of the third passage with fibroblasts-like morphology (Original magnification:  $\times 100$ )

### 3.2 免疫酶细胞化学结果

I 型胶原、III 型胶原为中度阳性表达,骨桥蛋白、骨粘连蛋白染色均为弱阳性表达,定位于胞浆组织中。空白对照及阴性对照均不着色。

### 3.3 反转录聚合酶链反应结果

牙囊细胞中骨涎蛋白、骨钙素、碱性磷酸酶 mRNA 为低到中度水平表达,在不同分子量片段处呈现为不同灰度值的特异性条带(图 2)。

### 3.4 体外矿化实验

连续培养 7 d,显微镜下可见牙囊细胞呈复层化生长,培养至第 20 d,可观察到细胞密集区有散在较小的白色矿化结节形成,随时间延长,矿化结节逐渐变大,30 d 后行 von Kossa 染色结节呈棕黑色着色(图 3)。

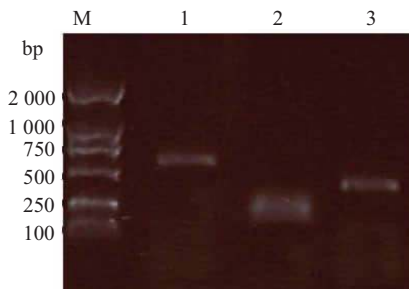


图 2 RT-PCR 结果

Fig.2 Results of RT-PCR

M: Marker; Lane 1: Bone sialoprotein; Lane 2: Alkaline phosphatase; Lane 3: Osteocalcin

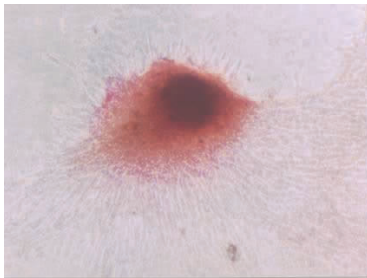


图 3 Von kossa 染色矿化结节呈棕黑色 Fig.3 A mineralized nodule positive for von Kossa staining

4 讨论

牙囊起源于外胚间充质组织,环状排列在成釉器和牙乳头的外周,目前认为牙周组织由牙囊发育分化而来。牙囊不仅在牙根发育中,而且在牙齿萌出过程起重要作用 [1], 其一系列的调控机制尚处于研究之中。因此,体外培养牙囊细胞对于研究牙胚特别是牙骨质的发育以及牙齿萌出的调控机制具有重要意义。根据牙囊在牙齿发育分化中的作用推测,牙囊细胞中应能检测到矿化相关蛋白的表达,在诱导条件下应具有形成矿化组织的能力。

本实验采用处于乳牙胚牙根发育期的合法引产胚胎为组织来源,利用酶消化结合组织块法成功获得了人牙囊细胞,为体外研究牙囊细胞在牙胚发育中的作用机制提供了细胞模型。相对组织块法而言[5],该方法培养成功率高,因胶原酶消化使组织块松散,细胞较易从组织块中爬出,生长传代快,仅 7~14 d 细胞即可传代,为研究牙囊细胞提供了较好的体外模型。

国外已有不少报道证实体外培养的牙囊细胞具有成骨、成牙骨质细胞表型特征。Handa 等[2]体外培养牛牙囊细胞并提取细胞总 mRNA 进行 RT-PCR 检测,结果表明,细胞表达低水平的碱性磷酸酶及骨钙素,表达骨桥蛋白和 I 型胶原的 mRNA。Hou 等[3]对小鼠牙囊细胞进行免疫组化检测亦发现其能表达 I 型、III 型胶原、纤维结合蛋白及骨涎蛋白、骨桥蛋白和碱性磷酸酶等与矿化密切相关的蛋白。I 型、III 型胶原是骨、牙骨质、牙本质等矿化组织中重要的胶原蛋白成份,而骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨钙素、骨粘连蛋白均为非胶原蛋白基质成分,均可由成骨、成牙骨

质细胞分泌并参与细胞的粘附和矿化。碱性磷酸酶是一种目前较为肯定的参与骨等钙化组织形成、代谢和再生的重要酶类,它在细胞中表达的多少,已作为标志用于反映细胞分化程度及其功能状态。上述几种蛋白分子目前认为是研究成骨、成牙骨质细胞等具有矿化功能的细胞分化的重要指标[6]。而细胞经体外连续培养矿化结节的形成情况能直观地反映细胞的矿化能力,是细胞具备成骨、成牙骨质特性的另一有力证据[7]。

本研究运用 RT-PCR 技术从 mRNA 水平检测到体外培养的牙囊细胞弱表达骨涎蛋白、骨钙素和碱性磷酸酶,运用免疫组化技术从蛋白水平检测到细胞 I 型、III 型胶原中度阳性表达,骨桥蛋白、骨粘连蛋白弱阳性表达。I 型、III 型胶原为成纤维细胞的主要分泌成分,而非胶原蛋白成分是成熟矿化细胞的主要分泌成分,因此根据实验结果可分析,牙囊细胞尚处在矿化前体细胞阶段,以成纤维细胞表型居多,其成骨、成牙骨质细胞的表型还不明显。细胞经体外矿化诱导 30 d 观察到了矿化结节的形成,说明在矿化诱导条件下牙囊细胞的成骨、成牙骨质细胞的表型可增强,从而形成矿化结节。以上结果证实体外培养的人牙囊细胞在一定条件下具有合成矿化组织的能力。

目前临床上促进牙周再生的效果不佳,主要原因之一为局部再生细胞成份在数量和质量上的欠缺,而用组织工程的方法有望改观目前牙周治疗的现状。牙周组织工程种子细胞需具有矿化能力,如牙周膜细胞、骨髓基质细胞、成牙骨质细胞等。本研究证明体外培养的牙囊细胞具有矿化能力,可试将其用于牙周组织工程研究。

参考文献:

[1] Moon IC, Philias RG. Development and general structure of the periodontium[J]. Periodontology, 2000, 24(1): 9-27.

[2] Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells[J]. Bone, 2002, 31(5): 606-11.

[3] Hou LT, Liu CM, Chen YJ, et al. Characterization of dental follicle cells in developing mouse molar[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44(9): 759-70.

[4] Saito M, Handa K, Kiyono T, et al. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(1): 50-7.

[5] 金作林,林 珠. 人牙囊细胞的培养及其特性[J]. 口腔医学研究, 2002, 18(4): 236-8.

Jin ZuoLin, Lin Zhu. Cultures and characterization of dental follicle cells from human molars[J]. J Oral Sci Res, 2002, 18(4): 236-8.

[6] D'Errico JA, MacNeil RL, Takata T, et al. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro[J]. Bone, 1997, 20(2): 117-26.

[7] Liu HW, Yacobi R, Savion N, et al. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(10): 1691-9.