

猪釉基质蛋白对 MC3T3-E1 成骨细胞增殖分化的影响

束 蓉 刘 正 葛琳华

摘要 目的:探索釉基质蛋白(EMPs)促进成骨细胞增殖分化的作用,为进一步研究提供基本数据。方法:选择 MC3T3-E1 成骨细胞株,利用体外细胞培养方法,分别加入不同浓度的 EMPs -MEM 培养液,于培养 0、1、2、3、4、5、6 d 进行细胞计数,采用 SAS 软件对细胞计数数据作单因素方差分析。结果:EMPs 各组细胞计数均高于阴性对照(C)组($P < 0.01$)。第 2 天,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EMPs 组的细胞计数高于阳性对照(T)组($P < 0.01$);第 5 天,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EMPs 组的细胞计数不但高于 C、T 组,还明显高于其它 EMPs 浓度组。结论:釉基质蛋白可明显促进成骨细胞的增殖分化。

关键词 猪釉基质蛋白 MC3T3-E1 成骨细胞 增殖分化

Influences of Porcine Enamel Matrix Proteins on MC3T3-E1 Osteoblast Proliferation and Differentiation

Shu Rong, Liu Zheng, Ge Linhua

Department of Oral Medicine, the Ninth Affiliated Hospital of Shanghai Second Medical University

Abstract

Objective: Some research suggested that enamel matrix proteins(EMPs) not only induced formation of cementum, but also could promote regeneration of periodontal tissue and alveolar bone. In order to recognize the mechanisms of periodontal regeneration induced by EMPs and provide a basic data for further study, influences of EMPs on osteoblast proliferation and differentiation are explored in this study. **Methods:** Porcine enamel matrix proteins were extracted by using acetic acid. MC3T3-E1 osteoblasts were selected and cell culture was used in vitro. EMPs with different concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were added separately in -MEM culture medium and compared with negative group and positive group (TGF- β_1). The count of cell was recorded after 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 days, then the data were analysed statistically by using SAS. **Results:** The cell count of all EMPs groups were higher than that in the negative control group ($P < 0.01$), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ as well as 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EMPs groups were higher than the positive group (TGF- β_1) on the second day ($P < 0.01$). The cell count of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EMPs group was not only higher than C and T groups, but also higher than that of other EMPs dose groups on the fifth day. **Conclusion:** The proliferation and differentiation of osteoblasts can be promoted distinctly by enamel matrix proteins.

Key words: porcine enamel matrix proteins MC3T3-E1 osteoblast proliferation and differentiation

国外的一些研究表明,釉基质蛋白(enamel matrix proteins, EMPs)能有效诱导牙周组织的再生,且这种再生与这些组织的正常发育过程类似^{1~5}。这些报道和作者的研究结果均已肯定了 EMPs 对牙槽骨再生的生物活性,但诱导牙槽骨再生的机制不

甚明了。本实验的目的旨在通过体外细胞培养的方法,观察 EMPs 对 MC3T3-E1 成骨细胞株增殖分化的影响;以期对 EMPs 对成骨细胞的作用机制作一初步了解,为进一步研究提供基本数据。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

选择 6 月龄新鲜猪颌骨标本,用外科手术方法将埋于

上、下颌骨内的恒牙胚取出，-70℃低温保存备用。仔细分离奶酪样牙釉基质，采用乙酸提取法获得 EMPs，冷冻干燥备用⁶。

-MEM 培养液 (Gibco, 美国)，β-甘油磷酸钠 (Fluka AG)，HEPES (Nacalai, 日本)，胎牛血清 (Hyclone, 美国)，TGF- β_1 (Gibco, 美国)，二氧化碳培养箱 (SANYO, 日本)，倒置显微镜 (Nikon, 日本)，24 孔培养板 (Gibco, 美国)。

1.2 实验分组

阴性对照 (C) 组：-MEM 培养液；阳性对照组 (T) 组：上述 C 组培养液 + 1 ng/ml TGF- β_1 ；E1 组：上述 C 组培养液 + 50 μ g/ml EMPs；E2 组：上述 C 组培养液 + 100 μ g/ml EMPs；E3 组：上述 C 组培养液 + 150 μ g/ml EMPs。将如上培养液过滤消毒，备用。

1.3 细胞培养及计数

将 MC3T3-E1 成骨细胞株置于含 -MEM 培养液的培养瓶中，37℃，5% CO₂ 恒温环境中培养。在细胞尚未完全长满整个培养瓶底面时，以 0.25% 胰蛋白酶液 37℃ 消化 10 min，于倒置显微镜下观察细胞消化情况。细胞收缩成球形，基本呈单个分离状态时中止消化，分别置 5 支离心管中离心 1000 r/min × 5 min，弃上清液，加入 5 组不同的培养液各 4 ml，轻轻吹打后，吸取少量细胞悬液，在血球计数板上计数，按如下公式计算细胞数：细胞数/ml = (4 大格细胞数/4) × 10⁴

每组重复 2 次计数，计算平均数。将 5 组细胞分别加入 5 块 24 孔培养板中，使每孔的细胞数为 1 × 10⁴，然后补加培养液至每孔达 0.5 ml，37℃，5% CO₂ 恒温培养。每天每组随机取 3 个孔，轻轻吸去培养液，以 0.25% 胰蛋白酶液 37℃ 充分消化，中止消化后吸取少量消化液置于血球计数板计数细胞。

1.4 统计学分析

用统计分析系统 (statistical analysis system, SAS) 软件对细胞计数数据作单因素方差分析。

2 结 果

细胞计数结果见表 1，显示：C 组第 1 天细胞数下降，以后则呈指数上升，第 5 天达到顶峰，以后细胞数增长速率降低，但仍维持在一定水平；其余各组细胞增长趋势与 C 组相似。第 2 天，E1、E2、E3 各组细胞计数均较 C 组高，方差分析表明组间出现极显著差异 ($P < 0.01$)，而 E2、E3 两组细胞计数高于阳性对照 (T) 组 ($P < 0.01$)。第 3 至第 5 天，E2 组的细胞计数始终非常显著地高于 C 组 ($P < 0.01$)，在第 5 天达到顶峰 (图 1)，不但明显高于 C、T 组，还明显高于 E1、E3 两组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组细胞计数结果 (细胞均数/ml)

分组	0d	1d	2d	3d	4d	5d	6d
C	10000	5792	5889	14056	23083	68347	64222
T	10000	4542	9556	24778	50250	99945	99556
E1	10000	4500	12833	25500	45444	111778	101556
E2	10000	5333	17333	31833	71000	147889	91000
E3	10000	7083	15944	28250	65667	114111	89778

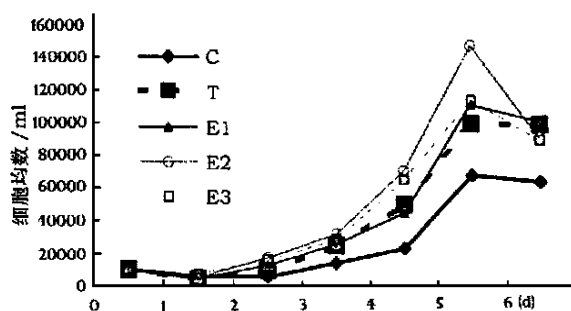


图 1 各组细胞计数结果比较

3 讨 论

MC3T3-E1 成骨细胞株采用 Wistar 大鼠胚胎颅骨成骨细胞来源，在体外培养中具有成骨细胞的表型特征，因而可作为一个良好的研究成骨细胞表型发骨的体外模型系统⁷。本研究在体外培养的第 1 天即呈现贴壁生长行为，并见有树枝状突起伸展；3 d 后大量细胞贴壁生长，细胞形态呈梭形、多角形，部分突起伸展明显，细胞互相接触，连成网和片；7 d 左右开始出现多层生长现象，聚集成团，逐渐形成细胞结节。表明具有一定的成骨细胞表型分化特征。因此，MC3T3-E1 细胞株可为体外研究模型提供一个良好的途径。骨组织是 TGF- β 最丰富的来源之一，通过对间质前体细胞、软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的协调作用，骨中 TGF- β 在骨形成和不断重建矿化组织中起着关键作用。有证据表明，TGF- β 在骨生长、重建以及损伤修复过程中同样起着重要作用，也是培养体系中成骨细胞的促有丝分裂剂^{8,9}。因此，本研究选择 TGF- β 作为 EMPs 对成骨细胞促增殖分裂作用的阳性对照，对判断 EMPs 的生物活性极有价值。

牙周病手术治疗后组织的愈合为创伤愈合。近年来现代细胞生物学和分子生物学研究的介入推动了创伤愈合研究的发展；大量的实验观察了创

伤愈合过程中的细胞活动及其影响因素,从细胞和分子水平解释和分析了可能的调控机理,丰富和深化了对创伤愈合的认识,逐步形成了创伤愈合的现代概念。其中重要的发现之一是多种体液介质和细胞介质影响炎症细胞和修复细胞的行为,从而参与调控创伤愈合过程。很多肽类生长因子在这些介质中占有关键地位,是影响创伤愈合的调控因素。它们诱导炎症细胞浸润;促进修复细胞的增殖分化;刺激肉芽组织的增生;影响伤口愈合和组织重建¹⁰。作为肽类生长因子,其产生的生物效应可分为趋化作用、合成分泌作用和增殖分化作用三类,它们构成了创伤愈合过程中生长因子影响的主要细胞活动,而创伤愈合过程中最重要的细胞活动之一就是增殖分化¹⁰。本实验体外细胞培养的结果显示,EMP_s 各组均对成骨细胞有强烈的分裂增殖效应,不仅与阴性对照组比较有极显著差异,而且 E₂、E₃ 组还明显高于阳性对照组,证实 EMP_s 促进骨组织再生的作用与直接促进骨细胞增殖的生物效应有关。为进一步研究 EMP_s 对牙槽骨再生的机制奠定了基础。

参考文献

1 Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(5):658 ~ 668

2 Hammarström L, Heijl L, Gestrelius S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(5):669 ~ 677

3 Gestrelius S, Andersson C, Lidström D, et al. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(5):685 ~ 692

4 Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect: A case report. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(5):693 ~ 696

5 Heijl L, Heden G, Svardström G, et al. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*, 1997, 24(5):705 ~ 714

6 束蓉,刘正,王洪海等.猪釉基质蛋白的提取及 N-末端氨基酸序列分析. *口腔医学纵横*, 1999, 15(2):67 ~ 68

7 张伟国,王丽珍,刘正.氟对鼠颅骨成骨细胞表型发育影响的体外研究. *上海口腔医学*, 1998, 7(2):88 ~ 93

8 Fiorelli G, Ballock RT, Wakefield LW, et al. Role for autocrine TGF- β 1 in regulation differentiation of a human leukemic cell line toward osteoclastlike cells. *J Cell Physiol*, 1994, 160(4):482 ~ 490

9 Anderson TJ, Lapp CA, Billman MA. Effects of transforming growth factor- α and platelet-derived growth factor on human gingival fibroblasts grown in serumcontaining and serum-free medium. *J Clin Periodontol*, 1998, 25(1):48 ~ 55

10 周廷冲主编.多肽生长因子基础与临床.北京:中国科学技术出版社, 1992:3 ~ 241

(1999-09-09 收稿,2000-05-25 修回)

《氟与口腔医学》出版发行

由郭媛珠、凌均棨和陈成章主编的《氟与口腔医学》是中国第一部由中山医科大学口腔医学和公共卫生学专家共同编写的有关氟与口腔医学和预防医学专著,全书共 13 章,30 多万字。本书根据中国国情,全面、系统、深入地介绍“除氟害,兴氟利”的最新国内外资料,并结合作者自己的实践经验和科研成果阐述了以下五个问题:氟的一般特性及其在自然界中的存在和分布,人体氟的分布、来源和代谢以及分析监测方法;氟的生理和毒理学;龋病和氟;氟牙症与地氟病的流行病学、发病机制、临床表现、诊断与防治的新动向,客观地论述饮水氟化的新观点;氟的临床应用。本书对口腔医学、公共卫生学、预防医学、儿童医学及药剂学专业人员,教学科研人员,医生、学生以及保健工作者,地氟病防治工作者和卫生政策的有关决策部门的人员等均有参考价值。本书将于 2000 年 8 月由科学技术文献出版社出版(北京复兴路 15 号,邮编 100038)出版发行,全国各地新华书店经销。