

[文章编号 1000-1182(2005)05-0415-03]

· 专栏论著 ·

# 小鼠牙囊细胞的体外培养及表型特征

葛少华, 杨丕山, 赵宁, 李纾

(山东大学口腔医院 牙周病科, 山东 济南 250012)

**[摘要]** 目的 建立小鼠牙囊细胞(DFC)的体外分离培养方法,研究牙囊细胞的表型特征。方法 用1%的胰蛋白酶消化分离9 d龄 Balb/c 小鼠的下颌第一磨牙牙胚的牙囊组织进行体外培养,倒置显微镜下观察细胞的形态,扫描电镜观察细胞的表面形貌,SP免疫组化法检测细胞碱性磷酸酶(ALP)、骨涎蛋白(BSP)、骨桥蛋白(OPN)的表达。结果 分离培养的细胞有3种类型:立方形或多角形;长梭形;非常细长的细胞形状。扫描电镜下细胞具有多形性,有大量的线状胞浆突和微绒毛;根据细胞表面有无纤维细丝覆盖,可将细胞分为有纤维细丝、无纤维细丝两个亚群。免疫组化染色显示部分牙囊细胞的ALP、BSP、OPN的表达阳性。结论 牙囊细胞具有多种细胞的表型特征,有分化为成牙骨质细胞、牙周膜细胞和成骨细胞的潜能。

**[关键词]** 牙囊; 碱性磷酸酶; 骨桥蛋白; 骨涎蛋白

**[中图分类号]** R 781.4 **[文献标识码]** A

**Culture and Phenotype Characteristics of Mouse Dental Follicle Cells** GE Shao-hua, YANG Pi-shan, ZHAO Ning, LI Shu. (Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for isolating and culturing mouse dental follicle cells and to study the phenotype characteristics of dental follicle cells. **Methods** Mandibular first molars from 9 day old Balb/c mice were digested with 1% trypsin, subsequently, and the dental follicle was enucleated from the tooth germ and cultured. The shape and ultrastructural appearance of dental follicle cells were observed under phase-contrast microscope and scanning electron microscope(SEM). Immunocytochemistry was used to detect the expression of alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein(BSP) and osteopontin(OPN). **Results** Three types of cells were isolated: some were cuboidal/polygonal; some were elongated, spindle-shaped, fibroblast-like cells; and a minor, third cell type was very thin and elongated. The cytoplasm of the first two cell types was filled with abundant granules. The cells were pleomorphism under SEM and had many filipodia and microvilli. According to whether there were filaments overlying the surface, the cells could be divided into two subtypes. Some but not all follicle cells expressed ALP, BSP and OPN. **Conclusion** The cultured dental follicle cells consisted of several cell phenotypes and had the potential of differentiating in to cementoblasts, periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts.

**[Key words]** dental follicle; alkaline phosphatase; bone sialoprotein; osteopontin

牙囊(dental follicle, DF)起源于外胚层间充质,是包绕在发育中牙胚的一层疏松的纤维结缔组织,含有成牙骨质细胞、牙周膜细胞、成骨细胞的前体细胞,在牙齿萌出后期由其形成牙骨质、牙周膜和固有牙槽骨<sup>1</sup>。这一始于牙囊细胞的牙周组织的发育是通过上皮-间充质或细胞外基质-间充质之间的相互作用进行的<sup>2</sup>,然而,确切的机制并不清楚,并且缺乏来自细胞学的直接证据。本实验拟在体外培养发育中小鼠的牙囊细胞,并进行形态学和扫描电镜观察,用免疫组化染色法检测牙囊细胞碱性磷酸酶(alkaline

phosphatase, ALP)和骨基质蛋白骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达情况,从而探讨牙囊细胞的表型特征,为进一步阐明牙周组织发育过程中的细胞分化奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 小鼠牙囊细胞的体外分离、培养、形态观察及起源鉴定

取出生后9 d的SPF级 Balb/c 小鼠,参照 Wise等<sup>3</sup>方法进行分离培养。即将小鼠引颈处死后,在体视显微镜下(OLYMPUS公司,日本)分离出下颌第一磨牙的牙胚放入1%的胰蛋白酶(Sigma公司,美国)中1.5 h后,再次在体视显微镜下用显微外科镊和探针将牙囊与冠方的成釉器及根方的牙乳头分离。分离时应仔细,切忌用力撕扯组织。随后用小吸管将分

[收稿日期 2005-02-27; 修回日期 2005-06-21]

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30371537);山东省优秀中青年科学家奖励基金资助项目(02BS096)

[作者简介]葛少华(1973-),女,山东人,讲师,硕士

[通讯作者]杨丕山, Tel: 0531-88382368

离的牙囊组织置入预铺有盖玻片的6孔板中,加入含15%胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公司)的MEM(Gibco公司,美国),在5%CO<sub>2</sub>及37℃的饱和湿度下培养,每天在倒置显微镜下严密观察细胞的生长状况,待细胞长满盖玻片时,用SP免疫组化法检测波形蛋白和角蛋白的表达,确定细胞起源。

### 1.2 小鼠牙囊细胞的扫描电镜观察

弃培养液,PBS冲洗3次,用2.5%的戊二醛固定12h,0.1mol/L的磷酸缓冲液清洗2.5h后,1%的锇酸固定1.5h,用双蒸水清洗2h以上至无锇酸气味后,经上升梯度乙醇脱水,醋酸异戊酯置换,常规临界点干燥,IB-5离子溅射仪中镀铂,日立S-570扫描电镜观察并拍照。

### 1.3 SP免疫组化法检测小鼠牙囊细胞ALP及骨基质蛋白的表达

PBS冲洗细胞爬片,4%的多聚甲醛固定20min,30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇灭活内源性过氧化物酶30min,滴加按1:200稀释的山羊抗小鼠的ALP多克隆抗体(美国NIH的Larry W. Fisher馈赠),37℃湿盒中孵育1h后,再滴加兔抗山羊的二抗(北京中山生物技术有限公司),孵育20min,滴加DAB显色剂,显微镜下控制显色时间。苏木素复染,常规脱水,透明,封片。阴性对照组不滴加山羊抗小鼠的ALP一抗,其余处理同实验组。骨基质蛋白的表达检测步骤同上,但滴加的一抗分别为山羊抗小鼠的BSP和OPN的多克隆抗体(美国NIH的Larry W. Fisher馈赠)。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学观察及起源鉴定

牙囊组织块12h后贴壁,24h后可见少数细胞从组织块中爬出,呈贴壁型生长;也有细胞零散长出,而周围并未见组织块。细胞呈明显的多形性,大致有3种类型,一种细胞呈立方型和多角形,中央有卵圆形核,且该种细胞在倒置显微镜下极度透亮;一种细胞呈典型的成纤维细胞样形态:长梭形或纺锤形,核呈长圆形;另外一种细胞数量较少,其形态极度细长。前两种细胞占大多数,胞浆内有大量的颗粒样物质。免疫组化法检测显示细胞的波形蛋白表达阳性,角蛋白的表达阴性,表明了细胞源自间充质。

### 2.2 扫描电镜观察

扫描电镜下,细胞呈现多形性,展现出较多的线状胞浆突,细胞表面有较多的微绒毛。有的细胞呈现典型的成骨细胞的形貌(图1)。据细胞表面有无纤维细丝覆盖可将细胞分为两亚群:一种细胞群表面有大量的纤维细丝覆盖,而另一种细胞群则无纤维细丝的覆盖。

### 2.3 ALP及骨基质蛋白的表达

ALP免疫组化染色显示,大多数牙囊细胞的胞浆染色强阳性,呈棕黄色,中间可间杂有染色阴性的细胞(图2);也有成片的染色阴性细胞,且和染色阳性细胞之间有一分界。据ALP的表达情况可将牙囊细胞分为ALP阳性和ALP阴性两种细胞亚型。同样的,根据OPN、BSP的表达情况,细胞也可分为骨基质蛋白表达阳性和表达阴性两种亚型,只是阳性细胞的数量相对较少(图3,4)。

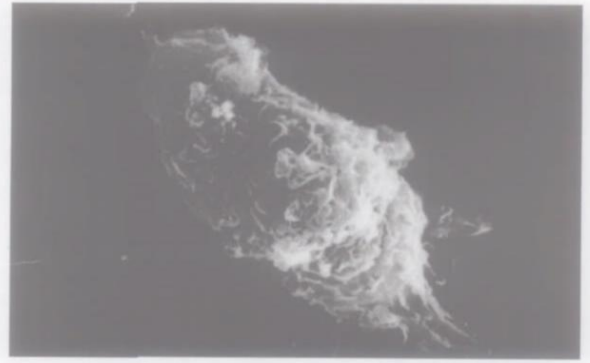


图1 体外培养的小鼠牙囊细胞形貌似成骨细胞 SEM ×4 000  
Fig 1 Some cells had the appearance of osteoblast-like cells SEM ×4 000

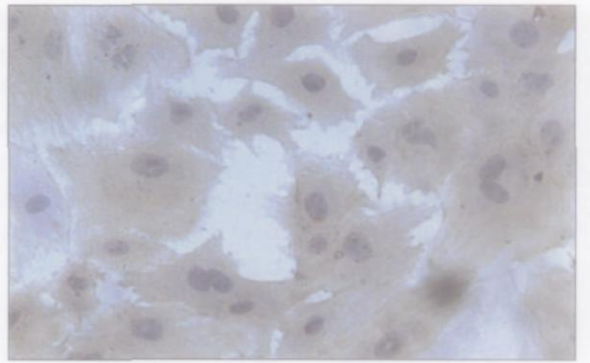


图2 大多数牙囊细胞呈ALP的强阳性表达 DAB ×100  
Fig 2 The majority of dental follicle cells expressed ALP positively DAB ×100

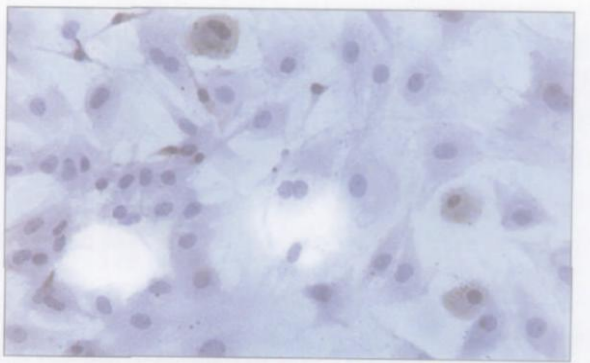


图3 少量牙囊细胞呈BSP的阳性表达 DAB ×100  
Fig 3 Only a few dental follicle cells expressed BSP positively DAB ×100

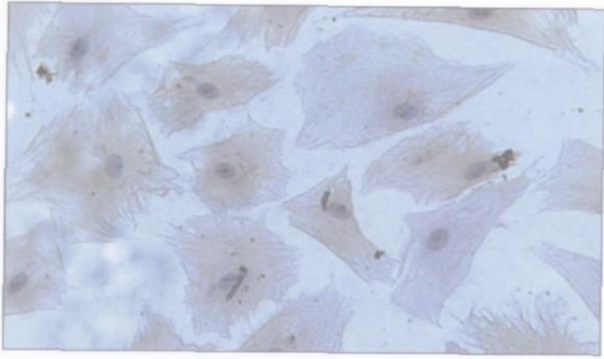


图4 部分牙囊细胞呈OPN的阳性表达 DAB ×100  
Fig 4 Only a part of dental follicle cells expressed OPN positively DAB ×100

### 3 讨论

用1%的胰蛋白酶处理牙胚1.5 h后可消化基底膜,从而有利于上皮与间充质成分的分离,并且可以分散牙囊组织,有利于细胞从组织块长出。在成纤维细胞培养基中生长的牙囊细胞呈现明显的多形性,除了有典型的呈纺锤形的成纤维样细胞的形态外,还有与成牙骨质细胞和成骨细胞形态相似的立方形或多角形的细胞及一些非常细长的细胞,但所有这些细胞类型均表现出波形蛋白阳性和角蛋白阴性,表明了其间充质来源。Hou等<sup>4</sup>的研究与本实验结果近似。扫描电镜的结果进一步证实了细胞的多形性,并且可以根据有无纤维细丝覆盖将细胞分为两个亚群,这些纤维细丝实际上是细胞分泌的胶原蛋白在培养基中形成的原纤维样结构<sup>5</sup>。

ALP和骨基质蛋白的表达作为细胞分化的表型标志,被广泛应用于成骨细胞及成牙骨质细胞分化的检测中。ALP作为骨分化的酶标志,主要由骨形成细胞和一些牙周韧带细胞表达<sup>6</sup>,而BSP和OPN是骨及其他矿化结缔组织如牙本质、牙骨质及钙化的软骨组织中的主要非胶原蛋白,BSP发育表达的高峰期出现在妊娠的晚期及出生后的早期发育阶段,且BSP mRNA特异性地表达于分化的成骨细胞、成牙骨质细胞中<sup>7</sup>,而OPN表达于矿化的胶原基质形成之前,但在骨形成后浓度更高<sup>8</sup>。据ALP、BSP和OPN的表达情况,可将细胞分为两种亚型:阳性细胞和阴性细胞。结合形态学的结果,提示分离培养的小鼠牙囊细胞中至少有两种细胞亚型:成纤维细胞和成骨细胞样细胞,后者中可能包括有成骨细胞和成牙骨质细胞,因为牙骨质和牙槽骨组成近似,且成牙骨质细胞和成骨细胞是密切相关的细胞类型,在基质产生和矿化时表达相同的蛋白。至于ALP阳性的细胞较多而BSP和OPN阳性的细胞较少,原因可能有以下2种:一是只有成骨细胞和成牙骨质细胞才能表达BSP和OPN,而

对于ALP,除了上两种细胞外,部分牙周膜细胞亦能表达ALP;二是发育阶段的原因。在牙齿发育的早期阶段,BSP mRNA由牙槽骨细胞表达,但在牙根形成时期,BSP位于形成牙根表面的细胞中<sup>9</sup>,并且也发现由牙囊细胞表达BSP mRNA的时间位点与在牙根表面最初牙骨质的形成阶段是相吻合的<sup>10</sup>。在6 d龄CD-1鼠的大多数牙囊细胞中ALP的表达为强阳性,而BSP、OPN为微弱表达<sup>4</sup>。至8 d龄时,牙根牙本质开始形成,在牙囊细胞中BSP转录子仍为微弱表达<sup>9</sup>。以上的结果表明牙囊细胞中可能含有成牙骨质细胞和成骨细胞的前体细胞。总之,在发育的牙囊细胞中ALP及骨基质蛋白BSP和OPN的普遍表达提供了这样一个证据,即这些细胞拥有了成骨细胞表型和成牙骨质细胞表型的某些特征。

从9 d龄小鼠中分离培养的牙囊细胞,包含有立方形、多角形的细胞及纺锤形纤维细胞样细胞;在扫描电镜下可见有纤维细丝覆盖的细胞和无纤维细丝覆盖的细胞;有ALP的显著表达及伴随有BSP、OPN信号的出现,这些均提示牙囊细胞中拥有成牙骨质细胞、成纤维细胞和成骨细胞表型的某些特征,是牙周组织发育的重要组分。

### [参考文献]

- 1] Ten Cate AR, Millers C. The development of the periodontium: The origin of alveolar bone J. *Anat Rec*, 1972, 173(1):69-77.
- 2] Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, et al. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions in root development J. *Anat Rec*, 1996, 245(2):151-161.
- 3] Wise GE, Lin F, Fan W. Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars J. *Cell Tissue Res*, 1992, 267(3):483-492.
- 4] Hou LT, Liu CM, Chen Y, et al. Characterization of dental follicle cells in developing mouse molar J. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(9):759-770.
- 5] Goldberg B, Green H, Todaro G. Collagen formation *in vitro* by established mammalian cell lines J. *Exp Cell Res*, 1963, 31(2):444-447.
- 6] Arceo N, Sauk JJ, Møhring J, et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro* J. *J Periodontol*, 1991, 62(8):499-503.
- 7] Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues J. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(8):987-997.
- 8] Yao KL, Todescan R Jr, Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture J. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(2):231-240.
- 9] Macneil RL, Berry J, Strayhorn C, et al. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis J. *Arch Oral Biol*, 1996, 41(8-9):827-835.
- 10] Macneil RL, Sheng N, Strayhorn C, et al. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis J. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(10):1597-1606.