

[文章编号] 1000-1182(2006)05-0466-03

体外培养观察人牙囊细胞中细胞程序性死亡 及其在不同流体静压力下的变化

金作林¹, 罗颂椒², 林 珠¹, 焦光海³, 王海雪¹

(1.第四军医大学口腔医院 正畸科, 陕西 西安 710032;

2.四川大学华西口腔医院 正畸科, 四川 成都 610041; 3.中国人民解放军总参谋部 测绘技术总站, 陕西 西安 710054)

[摘要] 目的 研究体外培养的人牙囊细胞的特征, 以及在不同流体静压力作用下细胞程序性死亡(PCD)的改变, 探讨PCD在牙齿萌出过程中的作用。方法 取12岁男孩埋伏阻生牙齿的牙囊进行人牙囊细胞培养, 将传代的培养细胞应用TUNEL的方法标记PCD细胞, 分别在50 kPa和100 kPa流体静压力作用1 h后观察PCD变化, 以不加压的人牙囊细胞作为对照。结果 体外培养的人牙囊细胞呈梭形、纺锤形或多角形, 具有成纤维细胞特征。在50 kPa流体静压力下人牙囊细胞PCD阳性细胞率与对照组无统计学差异($P>0.05$), 而100 kPa流体静压力下PCD阳性细胞率较对照组增加了31.65%, 有统计学差异($P<0.01$)。结论 流体静压力可以影响体外培养的人牙囊细胞的程序性死亡。

[关键词] 人牙囊细胞; 细胞程序性死亡; 流体静压力

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

Effects of Programmed Cell Death on Human Dental Follicle Cells and Changes of Programmed Cell Death under Different Hydrostatic Pressures JIN Zuo-lin¹, LUO Song-jiao², LIN Zhu¹, JIAO Guang-hai³, WANG Hai-xue¹. (1. Dept. of Orthodontics, Stomatological College, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 2. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. General Staff Mapping Techno-unit of PLA, Xi an 710054, China)

[Abstract] Objective Tooth eruption requires the presence of the dental follicle (DF) around the unerupted tooth. This study is to investigate programmed cell death on human dental follicle cells and changes of programmed cell death under different hydrostatic pressures: 0, 50 and 100 kPa. Methods Human dental follicles from third mandibular molars were surgically removed from adolescents who need for orthodontics treatment after informed content, then trypsinized and cultured. Human dental follicle cells were divided into three groups according to different hydrostatic pressures: 0, 50 and 100 kPa and their programmed cell death were labeled by using TdT-mediated-dUTP nick and labeling (TUNEL). Results Dental follicle cells cultured were elongate shape and exhibited fibroblastic characteristics. Compared with 0 kPa, programmed cell death cells on human dental follicle cells were increased 0.23% and 31.65% under 50 kPa and 100 kPa hydrostatic pressures respectively. 100 kPa group increased significantly ($P<0.01$). Conclusion It suggested that programmed cell death occurred in human dental follicle cells cultured in vitro and was influenced by different hydrostatic pressures. Hydrostatic pressure may improve tooth eruption through dental follicle.

[Key words] human dental follicle cells; programmed cell death; hydrostatic pressure

细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)是机体在正常生理状况下的一种细胞死亡, 是一种与有丝分裂功能相反的调节细胞群体的方式, 在机体发育中发挥重要的作用。目前对于牙囊细胞在牙

齿萌出过程中是否存在PCD, 以及牙囊细胞在牙齿萌出中的作用尚不清楚。本研究通过测定体外培养的人牙囊细胞在不同流体静压力作用下的细胞程序性死亡, 探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 人牙囊细胞体外培养^[1]

取因正畸需要拔除的12岁男孩埋伏阻生下颌第

[收稿日期] 2006-01-15; [修回日期] 2006-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30400510)

[作者简介] 金作林(1969-), 男, 辽宁人, 副教授, 博士

[通讯作者] 金作林, Tel: 029-84776136

三磨牙的牙囊组织,将牙囊组织用剪刀剪碎均匀铺于5 cm的培养皿中,置于CO₂孵箱中,3 h后加入少量MEM培养液,12 h后再加入MEM培养液,5 d后更换培养液,以后每3 d更换培养液,15-20 d细胞爬满培养皿,0.25%胰酶消化,按1:2比例进行传代。

1.2 流体静压力作用于牙囊细胞

将体外培养的第3代人牙囊细胞接种于3块24孔培养板中,每孔1×10⁴个细胞,培养3-5 d后,分为3组:不加压的对照组、加压50 kPa组和加压100 kPa组,在可控压力细胞加载装置中加载^[2],加力1 h后进行牙囊细胞程序性死亡的检测。

1.3 TUNEL法检测牙囊细胞程序性死亡

将培养的3组细胞用细胞离心机分离,收集细胞,涂片,采用ApopTag试剂盒(Oncor公司,美国)应用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)法标记牙囊细胞。细胞用5 g/L的Triton X-100处理10 min, PBS清洗3次,每次5 min,蛋白酶K 20 mg/L处理15 min后加50 μL平衡液1 min,用脱氧核糖核苷酸末端转移酶(terminal-deoxynucleotidyl transferase, TDT)反应液的复合液10 μL进一步处理30 min, A液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.15 mol/L NaCl)中漂洗2次,每次15 min。正常血清孵育后加标记碱性磷酸酶的抗地高辛抗体,湿盒内37℃孵育2 h。切片于A液和B液(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L MgCl₂)中分别振荡漂洗后,加新鲜配置的显色液(NBT/BCIP显色系统)暗处显色,2 h后中止反应。梯度酒精脱水后透明封片。

采用网筛(10×10)测试法,每片取3个高倍视野(40×),读取阳性细胞数目。PCD阳性细胞率=PCD阳性细胞/(PCD阳性细胞+PCD阴性细胞)×100%。

1.4 统计分析

采用SPSS 10.0统计软件对3组细胞的PCD阳性细胞率进行卡方检验。

2 结果

培养18 d,显微镜下观察可见培养的人牙囊细胞呈梭形、纺锤形或多角形,有2个或多个树突,具有成纤维细胞的特征,细胞核呈圆形或卵圆形,深染,胞浆呈多颗粒状物质。经TUNEL法标记后,牙囊细胞PCD阳性细胞出现紫蓝色颗粒,位于细胞核内,胞浆无染色(图1)。

经网筛(10×10)测试法读取PCD阳性细胞,经计算,50 kPa加力组PCD阳性细胞率为6.45%,100 kPa加力组为37.87%,对照组为6.22%。50 kPa加力组牙囊细胞PCD阳性细胞率与对照组相比无统计学差异

($P>0.05$);100 kPa加力组与对照组相比增加了31.65%,有统计学意义($P<0.01$)。

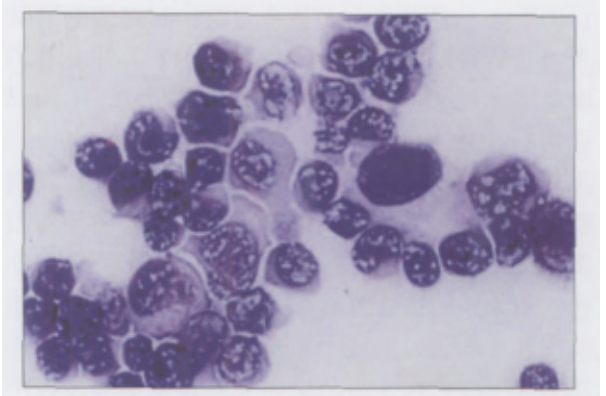


图1 人牙囊细胞中的PCD细胞 TUNEL染色 ×40
Fig 1 PCD cells in human dental follicle cells TUNEL staining ×40

3 讨论

1992年,Wise等^[3]首次成功培养出了出生5-6 d的大鼠的牙囊细胞,并通过组织学、免疫组织化学、扫描电镜和透射电镜以及蛋白分析技术等方法证明鼠牙囊细胞主要为成纤维细胞,这种成纤维细胞具有合成与分泌蛋白质的功能。本研究体外培养的人牙囊细胞,具有成纤维细胞特性,形态呈梭形或多角形,有2个或多个树突;波形蛋白染色阳性^[4]。波形蛋白是来源于外胚间充质细胞特有的中间纤维蛋白,说明细胞来源于外胚间充质。

细胞培养过程中应避免被其他细胞污染,而牙囊细胞的培养中被其他细胞(如上皮细胞、非牙囊成纤维细胞等)所污染的几率很小。首先,牙囊位于牙槽骨与造釉器之间,与牙囊相邻的牙槽骨在牙囊转化为牙周膜细胞之前无骨膜^[4],即牙囊与牙槽骨是分离的,牙囊又是牙槽骨与造釉器间的主要结缔组织,所以分离的牙囊上既无牙槽骨细胞也无造釉器细胞。虽然也可能有一些未分化的间充质细胞被作为成纤维细胞培养,但本实验所用的培养基主要适合培养成纤维细胞。实验中根据传代时成纤维细胞胰酶消化时间短而上皮细胞消化时间长的特点,通过缩短消化时间来分离提纯成纤维细胞,说明本实验所培养的细胞为牙囊细胞。

机体内细胞数量是细胞增殖和细胞死亡动态平衡的结果。细胞死亡可分为细胞坏死和细胞程序性死亡(亦称凋亡)两种。凋亡对后生动物门动物的发育和自身稳定起中心作用,是细胞数目精细调节的主要机制,是清除不需要的、已严重受损的和有潜在危险性细胞的一种防御性机制,如自身反应性淋巴细胞、病毒感染细胞及肿瘤细胞等^[5-6]。

除了在肿瘤发生中起作用外,在胚胎的正常发

育中也有PCD细胞的存在,提示PCD在生物体内作用的广泛性^[7-9]。凋亡在发育中的作用主要是塑造器官的形态,表现为除去多余的结构和对细胞数量和质量进行控制两方面^[10]。在牙胚的发育中,PCD细胞聚集在上皮内,有助于牙胚胎基的形成。Cerri等^[11]应用TUNEL法检测发现,胚胎14-29 d, Hertwig s 上皮细胞和牙周成纤维样细胞有典型的凋亡表现和卷曲的凋亡小体,说明细胞程序性死亡在牙周组织发育过程中起重要作用。本研究发现体外培养的牙囊细胞中也有PCD细胞存在,由于牙囊细胞在牙齿萌出和牙周组织形成中都起到重要作用,从而可以认为细胞凋亡在牙齿萌出和牙周组织形成过程中可能起到调节作用,但具体作用如何尚需深入研究。

PCD受到多种因素的调控,其中bcl-2、fas和转化生长因子-等因子是重要的调控因素。研究表明流体静压力对牙齿萌出具有重要的作用,那么流体静压力是否也对牙囊细胞中的PCD细胞有调控作用呢?本研究结果表明人牙囊细胞在流体静压力作用下PCD细胞数量有变化,50 kPa下PCD阳性细胞率变化不明显,说明此压力对牙囊细胞程序性死亡作用不明显;而100 kPa下PCD阳性细胞率变化明显,说明此压力对牙囊细胞程序性死亡作用明显,可促进牙囊细胞的PCD,部分导致细胞死亡。笔者认为流体静压力可以调节牙囊细胞的PCD,进而调节牙齿的萌出以及牙囊细胞向牙周膜细胞的转化,但其调节机制和作用尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 金作林,林 珠. 体外培养人牙囊纤维样细胞[J]. 口腔医学研究, 2002, 18(4): 236-238.
(JIN Zuo-lin, LIN Zhu. Cultures and characterization of dental follicle cells from human molars[J]. J Oral Sci Res, 2002, 18

(4): 236-238.)
[2] 金作林,林 珠. 流体静压力作用下人牙囊细胞CSF-1的表达[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(11): 664-666.
(JIN Zuo-lin, LIN Zhu. Expression of CSF-1 in cultured human dental follicle cells under different hydrostatic pressures[J]. J Clin Stomatol, 2003, 19(11): 664-666.)
[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] Melcher AH, McCulloch CAH. Periodontal ligament[M]//Bhaskar SN. Orban's oral histology and embryology. 11th ed. St Louis: Mosby-year Book, 1991: 203-238.
[5] Fadok VA, Henson PM. Apoptosis: Getting rid of the bodies[J]. Curr Biol, 1998, 8(19): 693-695.
[6] Barry M, Mcfadden G. Apoptosis regulators from DNA viruses[J]. Curr Opin Immunol, 1998, 10(4): 422-430.
[7] Poelmann RE, Mikawa T, Gittenberger-de Groot AC. Neural crest cells in outflow tract septation of the embryonic chicken heart: Differentiation and apoptosis[J]. Dev Dyn, 1998, 212(3): 373-384.
[8] Jernvall J, Aberg T, Kettunen P. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces P21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot[J]. Development, 1998, 126(2): 161-169.
[9] Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, et al. Correlation between apoptosis distribution and BMP-2 and BMP-4 expression in vestigial tooth primordia in mice[J]. Eur J Oral Sci, 1998, 106(2 Pt 1): 667-670.
[10] 金 岩,李 鑫,董绍忠,等. 细胞程序性死亡在颌面部细胞凝聚区形成中的作用[J]. 实用口腔医学杂志, 1999, 16(1): 42-44.
(JIN Yan, LI Xin, DONG Shao-zhong, et al. The effects of programmed cell death on the formation of cellular condensation in maxillofacial development[J]. J Pract Stomatol, 1999, 16(1): 42-44.)
[11] Cerri PS, Freymuller E, Katchburian E. Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars[J]. Anat Rec, 2000, 258(2): 136-144.

(本文编辑 吴爱华)

《华西口腔医学杂志》征订启事

《华西口腔医学杂志》系口腔医学专业性学术期刊。1983年8月创刊,由中华人民共和国教育部主管,四川大学主办,四川大学华西口腔医学院承办。其报道我国口腔医学工作者在防病治病、科学研究、教学等工作中取得的经验、科研成果、技术革新、学术动态等。设有临床研究、专栏论著、基础研究、短篇报道、病例报告、方法介绍、消息等栏目。主要文章除有英文题目外附英文摘要。可供从事口腔医学及相关学科的临床医务人员、教学、科研、情报人员及口腔医学专业的在校学生阅读。每期约16万字,A4开本,双月刊。创刊至今出刊24卷,是中国科技论文统计源期刊,列为中文核心期刊要目总览第一版至第四版核心期刊;被美国国家医学图书馆的医学索引(IM)和MEDLINE收录、《美国化学文摘》(CA数据库)收录、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)收录、美国ULRICH'S INTERNATIONAL PERIODICAL DIRECTORY(乌里希期刊指南)收录;被中文科技期刊数据库、中国科学引文数据库、中国科技期刊精品数据库、中文生物医学期刊文献数据库、中国期刊全文数据库、中国核心期刊数据库等收录。本刊获第二届国家期刊奖百种重点期刊,全国优秀科技期刊,四川省十佳期刊,是中国期刊方阵双百期刊。全国各地邮局公开发行。ISSN1000-1182, CN 51-1169/R, 邮发代号:62-162, 每册国内定价10.00元人民币。编辑部地址:四川省成都市人民南路三段十四号, 邮政编码:610041, 电话:028-85502414, 传真:028-85503479, E-mail: hxkqbj@huaxi.wcums.edu.cn.

《华西口腔医学杂志》编辑部