

[文章编号 1000-1182(2004)01-0019-04

# 大鼠牙囊细胞体外培养技术的建立及其鉴定

凌均<sup>焱</sup>, 谷海晶, 高 燕, 王阿丹

(中山大学光华口腔医院 牙体牙髓科, 广东 广州 510055)

[摘要] 目的 建立体外培养大鼠牙囊细胞的方法, 观察牙囊细胞体外生长的生物学特性。方法 分离乳鼠下颌第一、第二磨牙牙胚的牙囊组织, 应用组织培养的方法进行牙囊细胞原代和传代培养。显微镜观察培养细胞的形态, 电镜观察体内牙囊组织和体外培养的牙囊细胞的超微结构。免疫组化法检测细胞波形蛋白、Ⅰ型胶原、纤维连接蛋白的表达。结果 分离组织培养 24 h 后, 梭形细胞和多角形细胞从组织块中游出, 经消化排除法获得纯化的牙囊细胞。显微镜下牙囊细胞为成纤维细胞样, 电镜下牙囊细胞无桥粒, 胞浆中含有高密度电子颗粒和大量粗面内质网(RER)。免疫组化染色显示牙囊细胞表达波形蛋白、Ⅰ型胶原和纤维连接蛋白。结论 运用组织培养和细胞生物学技术可以成功获得原代和传代培养的大鼠牙囊细胞, 体外培养的细胞具有与正常大鼠牙囊细胞相一致的生物学特性。

[关键词] 牙囊; 细胞培养; 成纤维细胞; 牙齿萌出

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

**Establishment of Cultivating Technology of Dental Follicle Cells of Rat and Their Identifying** LING Jun-qi, GU Hai-jing, GAO Yan, WANG A-dan. (Dept. of Operative and Endodontics, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for culturing dental follicle cells of rat and observe the growth characteristics of the cultured cells *in vitro*. **Methods** Dental follicle and associated enamel organs were dissected from the first and second mandibular molars of 6-7-day-old rats, and then cultured *in vitro*. Purified dental follicle cells derived from the third or the fourth passage cells were utilized in the following experiments. The shape and ultrastructure of dental follicle cells were observed by light-microscopy and transmission electron microscopy. Immunocytochemistry was used to detect the expression of vimentin, type I collagen and fibronectin. **Results** The cultured cells were fibroblastic in shape, elongate with processes, and transmission electron microscopy revealed that they contained electron-dense granules, an abundant rough endoplasmic reticulum, but did not form desmosomes. Vimentin, type I collagen and fibronectin were present in dental follicle cell. **Conclusion** The dental follicle cells of rat could be successfully cultured *in vitro* and the cultured cells had the same characteristics of dental follicle cells of normal rat.

[Key words] dental follicle; cell culture; fibroblasts; tooth eruption

牙囊(dental follicle, DF)起源于外胚间充质,是包绕在成釉器外围的一层致密结缔组织,在牙齿萌出后期由其形成牙骨质、牙周膜和固有牙槽骨。牙齿萌出依赖牙囊的存在<sup>1</sup>,牙囊从组织、细胞和分子水平上对牙齿的萌出起到重要的调控作用<sup>2~4</sup>。国内尚未见有关牙囊细胞培养的报道。本实验对大鼠牙囊进行原代细胞培养,经消化排除法分离、纯化牙囊细胞,用苏木精—伊红染色、免疫组化染色和电镜观察等方法对培养的细胞进行形态学检查和鉴定,为进一步利用体外培养的牙囊细胞研究牙齿萌出过程中分子调控作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 牙囊细胞的分离和培养

1.1.1 牙囊细胞的分离与获取 取 10 只新生 6 或 7 d 的 SD 乳鼠,引颈法处死,解剖显微镜下分离出下颌第一、第二磨牙牙胚。在解剖显微镜下分离牙囊与成釉器,将分离出的牙囊组织立即置入改良伊格尔氏培养基(modified Eagle's medium, MEM)中。将组织块切成 1~2 mm 大小,离心 5 min,弃上清液,0.125%胰蛋白酶消化 5 min,再次离心 5 min,弃上清液,加入 12% MEM 培养基液 0.5 ml,转入培养瓶,5% CO<sub>2</sub> 及 37℃ 饱和湿度条件培养。

1.1.2 牙囊细胞的原代培养与纯化 将所得的细胞悬液和组织团块接种于培养瓶 12 h 后,补加 12% MEM 培养液 3 ml,于相差显微镜下观察。

[收稿日期 2002-10-10; 修回日期 2003-06-23

[作者简介] 凌均<sup>焱</sup> (1953-),女,四川人,教授,博士

[通讯作者] 谷海晶, Tel: 020-83822804

1.1.3 牙囊细胞的传代培养 培养6~7 d原代细胞生长晕形成后,将细胞进行传代。弃培养瓶内培养液,D-Hanks平衡盐溶液洗涤细胞。加入0.125%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 1:1配制的消化液2 ml。在倒置显微镜观察到梭形细胞在1~2 min内收缩变圆,细胞相互分离,立即吸出消化液时,加入4 ml 12% MEM培养液终止消化。弯头吸管吸取瓶内培养液,反复吹打10次左右,使细胞脱离瓶底形成细胞悬液。将细胞悬液按1:2进行培养,培养条件与原代相同。

1.1.4 细胞爬片的制作 将消毒后的盖玻片平放于培养板的6个孔内,细胞悬液滴于盖玻片上,置培养箱内培养2~3 d,待细胞爬满盖玻片时进行鉴定。

## 1.2 牙囊细胞的鉴定

1.2.1 细胞形态观察 HE染色细胞爬片,普通显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 细胞超微结构观察 弃培养液,加入2.5%戊二醛(0.1 mol/L磷酸缓冲液,pH 7.4,含有2.5 mmol/L的氯化钙)固定15 min。将全部细胞收集在锥形离心管内,经2 000 r/m离心15 min成团。将团块转移至1.5 ml EP管内,3 000 r/m离心10 min使细胞沉淀结块。用冷蔗糖缓冲液洗团块组织1 h,4℃下1%锇酸固定1~2 h;50%、70%、90%丙酮脱水各10~15 min,100%丙酮脱水30~45 min。浸入1:1丙酮包埋剂混合液,室温下放置1 h。浸入环氧树脂37℃ 24 h,60℃ 固化48 h。AO切片机做超薄切片,制备电镜标本。标本用饱和醋酸铀水溶液染色10~15 min,柠檬酸盐染色5~10 min。透射电镜下观察、拍照。

1.2.3 牙囊和成釉器的观察 取1只新生6或7 d的SD乳鼠,引颈处处死,取出下颌骨,置入D-Hanks平衡盐溶液中,解剖显微镜下去除下颌第一磨牙牙胚舌侧牙槽骨,挖出牙胚,分离出附有成釉器的牙囊,4℃条件2.5%戊二醛固定1 h。组织水洗、脱水等步骤同2.2.1。

## 1.3 免疫化学法检测细胞抗原物质

1.3.1 波形蛋白的检测 D-Hanks缓冲液冲洗细胞爬片,10%中性福尔马林固定10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤3次,每次3 min,0.2% Triton X-100 孵育5 min, PBS冲洗后,室温饱和湿度条件下20%胎牛血清孵育20 min。去除胎牛血清,滴加小鼠抗大鼠波形蛋白单克隆抗体,37℃饱和湿度条件下孵育1 h, PBS洗涤3×3 min,滴加异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记羊抗小鼠IgG抗体孵育1 h,37℃饱和湿度下孵育1 h, PBS洗涤3次,每次3 min,50%甘油封片。置540 nm光源荧光显微镜下观察、拍照。阴性对照组不加小鼠抗大

鼠波形蛋白抗体,其余方法同实验组。

1.3.2 型胶原和纤维连接蛋白的检测 采用免疫荧光染色法,检测型胶原及纤维连接蛋白的步骤同1.3.1,但滴加的一抗分别为兔抗大鼠型胶原多克隆抗体和兔抗大鼠纤维连接蛋白多克隆抗体,二抗均为FITC标记羊抗兔IgG抗体。

采用间接免疫酶标法,检测型胶原。Hanks缓冲液洗涤细胞爬片,4℃丙酮固定10 min, PBS洗涤,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育5 min, PBS冲洗,0.2% Triton X-100 孵育5 min, PBS再次冲洗,室温饱和湿度条件下20%胎牛血清孵育20 min。去除胎牛血清,滴加兔抗大鼠型胶原多克隆抗体,37℃饱和湿度条件下孵育1 h, PBS洗涤3次,每次3 min,滴加过氧化物酶标记羊抗兔IgG抗体,37℃饱和湿度条件下孵育1 h, PBS洗涤3次,每次3 min。加3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色观察4~5 min,蒸馏水冲洗,常规脱水,透明处理,中型树脂封片。光学显微镜下观察、拍照。纤维连接蛋白的检测,除一抗为兔抗大鼠纤维连接蛋白多克隆抗体外,其余步骤同上。对照组均不加一抗,其余处理同实验组。

## 2 结果

### 2.1 牙囊细胞的分离和培养

组织块12 h后贴壁,24 h可见少数细胞从组织块中爬出,呈贴壁型生长。细胞瓶中主要有两种形态细胞生长:一种呈梭形或不规则三角形,中央有卵圆形核;另一种上皮型细胞从组织块生长爬出,呈扁平不规则多角形,中央有圆形核,核较大。培养至第3天时,大部分组织块脱落,原组织块贴壁处周围有大量梭形或不规则三角形细胞,呈放射状或旋涡状排列,为典型的成纤维细胞表现。随着梭形细胞增多,其周围上皮型细胞数量也增多,细胞生长逐渐融合成单层,见图1。

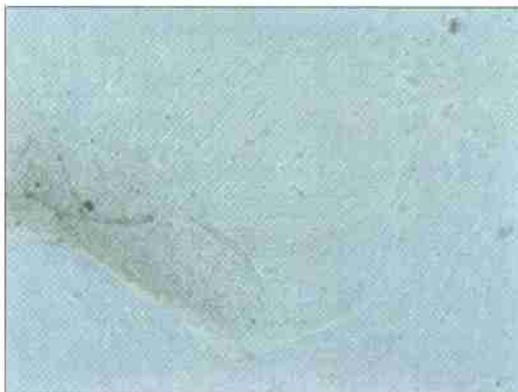


图1 牙囊细胞培养至第3天 HE ×100

Fig 1 The cultured dental follicle cells in 3 days HE ×100

## 2.2 细胞的传代和纯化

采用胰蛋白酶和 EDTA 混合消化法传代,注入酶 2~3 min,即可见成纤维细胞样细胞胞质回缩,胞体趋于变圆,细胞间隙变大、分离。上皮样细胞则无上述变化。此时中止消化,进行吹打。将吹打脱落的细胞置入新培养瓶 6 h 后,细胞恢复形态,呈梭形或不规则三角形,并且部分开始分裂增生。传至第 3 代时,可得到纯化的牙囊细胞,见图 2。

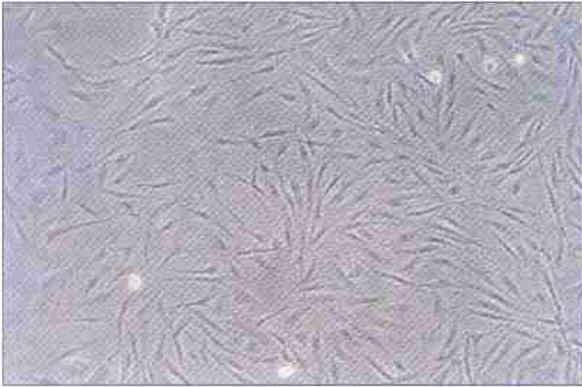


图 2 生长活跃的第 2 代牙囊细胞 HE ×100

Fig 2 The second passage dental follicle cells HE ×100

## 2.3 细胞鉴定

2.3.1 细胞形态 HE 染色 普通显微镜下见到梭形或不规则三角形细胞,中央核呈卵圆、蓝紫色。胞质向外伸出 2~3 个长短不同的突起,胞浆呈红色。

2.3.2 细胞超微结构 牙囊组织中牙囊细胞主要由成纤维细胞构成,细胞相互平行排列。胞体细长,见长长的两极,细胞间无桥粒。胞浆中见丰富的粗面内质网 (rough endoplasmic reticulum, RER), 见图 3。在 RER 附近可见无膜包被的高密度电子颗粒。培养的牙囊细胞细长,两极明显,无桥粒。胞浆中有丰富的 RER,并在细胞两极处消失,有的 RER 囊状扩张,含有大量絮状物质。偶见高密度电子颗粒,见图 4。

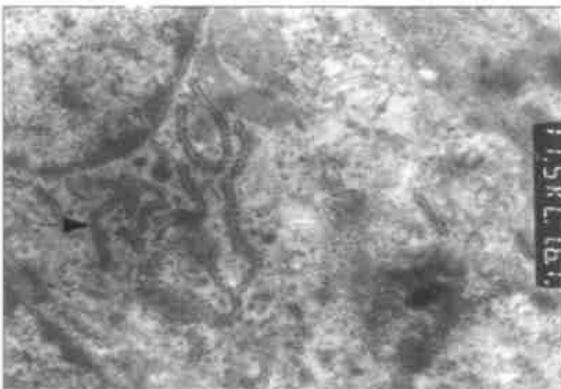


图 3 电镜观察体内牙囊细胞,可见胞浆中含丰富 RER SEM ×11 500

Fig 3 Electron micrograph of dental follicle cytoplasm *in vivo* showing abundant RER SEM ×11 500

2.3.3 免疫组化染色结果 免疫荧光法显示 型胶

原、纤维连接蛋白和波形蛋白一样,胞浆均呈现黄绿色荧光,见图 5。对照组阴性。间接免疫酶标法显示 型胶原和纤维连接蛋白一样,胞浆中含有大量棕黄色反应物质,见图 6,胞核阴性。对照组阴性。

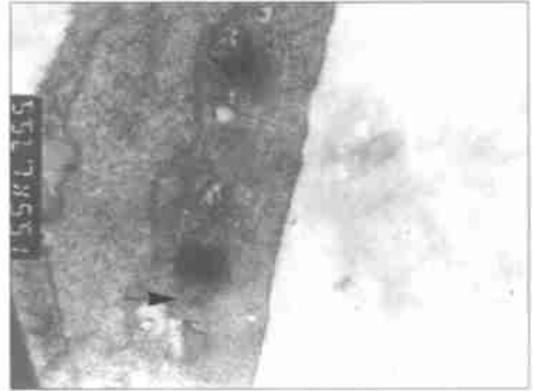


图 4 电镜观察体外牙囊细胞,可见高密度电子颗粒 SEM ×15 500

Fig 4 Electron micrograph of dental follicle cell *in vitro* showing high electron-dense granule SEM ×15 500



图 5 免疫荧光染色测定牙囊细胞波形蛋白的表达 ISH ×400  
Fig 5 Vimentin protein expression in dental follicle cell *in vitro* was detected by immunofluorescence staining ISH ×400



图 6 间接免疫酶标法测定牙囊细胞纤维连接蛋白的表达 ELISA ×100

Fig 6 Fibronectin protein expression in dental follicle cells was detected by immunolocalization staining ELISA ×100

## 3 讨论

牙囊细胞的培养方法有细胞消化分散法和组织

块培养法。细胞消化分散法是用胰蛋白酶分解牙囊组织,使之分散成牙囊细胞团或单个牙囊细胞后再进行原代培养,其缺点是不利于牙囊细胞的纯化。组织块培养法是将牙囊组织剪切成 1 mm 大小的组织块,使之贴附于培养瓶底,待细胞从组织内爬出、生长以获得原代细胞,其缺点是处于组织团块中心的细胞可因营养穿透有限而代谢不良、生长缓慢。本实验采用两种培养方法相结合,得到的牙囊组织小块较疏松,细胞间距增大,但细胞之间未解离成单个散在细胞,仍呈团块状,这样的牙囊组织块,营养穿透性增强,细胞生长较快,且利于以后传代的纯化工作。

原代培养的牙囊细胞与上皮细胞同时混杂生长,上皮细胞生长速度较快,常限制牙囊细胞的生长,因此排除上皮细胞成为牙囊细胞培养中的关键。上皮细胞间有桥粒,连接紧密,消化所需时间相对较长,为此本实验采用消化排除法纯化培养的牙囊细胞。将吹打下的细胞接种到新的培养瓶中。采用此法传至第 3 代,可得到纯化的牙囊细胞。传代培养过程中,发现牙囊细胞在体外不能长期生存。培养的 2~5 代细胞,形态良好,生长迅速较快。传至 5 代以上,细胞生物学性状发生改变,细胞外形及胞核均明显变大,生长缓慢,甚至停止生长,因此本实验均采用 3~4 代细胞进行相关研究。

本实验体外培养的牙囊细胞与体内牙囊细胞相似,呈现成纤维细胞的特征。细胞形态呈梭形,在利于成纤维细胞生长的培养液中生长活跃,细胞之间无桥粒,胞浆中含有波形蛋白,能合成并表达纤维连接蛋白和胶原蛋白。波形蛋白是中间丝的主要组成部分,出现于源自间充质的细胞中<sup>5</sup>。用抗波形蛋白抗体做免疫荧光显示,波形蛋白位于培养细胞的丝状结构部位。成纤维细胞能合成并分泌胶原和纤维连接蛋白。免疫组化显示本实验培养的细胞均有 I 型胶原和纤维连接蛋白的表达。胶原和纤维连接蛋白合成于 RER,图 4 显示两种蛋白分子在胞核周围表达极为明显,而在离胞核较远的胞质突起部位无明显表达,这与电镜下观察到的活体牙囊细胞胞核周围有大量 RER,并且 RER 呈囊状扩张,囊腔内含有大量絮状

物质,而在远端胞质突起部位 RER 消失相吻合。大鼠切牙牙囊合成 I 型胶原,体内牙囊组织中的牙囊细胞同样合成纤维连接蛋白。因此体外培养的牙囊细胞不仅与体内牙囊细胞相形态相似,还同样具有体内牙囊细胞合成蛋白分子的能力。

牙囊细胞与其他成纤维细胞有许多共同之处,在电镜下观察到牙囊细胞胞浆中含有的高密度电子颗粒是其一个重要特征<sup>6</sup>。这种高密度电子颗粒无膜包被,直径约 0.6 μm,除牙囊细胞外,还在牙齿萌出前期和萌出阶段的成釉器呈网状层细胞中出现<sup>7</sup>,不存在于大鼠其他任何部位的成纤维细胞中。本实验在体内牙囊细胞和体外培养牙囊细胞中都观察到这种高密度电子颗粒,从超微结构方面证实了培养的成纤维细胞源自牙囊。

#### [参考文献]

- 1] Larson EK, Cahill DR, Gorski JP, et al. The effect of removing the true dental follicle on premolar eruption in the dog. *J. Arch Oral Biol*, 1994, 39(4): 271-275.
- 2] Cahill DR, Marks SC. Tooth eruption: Evidence for the central role of the dental follicle. *J. J Oral Pathol*, 1980, 9(4): 189-200.
- 3] Marks SC, Cahill DR. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *J. Arch Oral Biol*, 1984, 29(4): 311-322.
- 4] Lein TH, Cheing ML, Yi JC, et al. Characterization of dental follicle cells in developing mouse molar. *J. Arch Oral Biol*, 1999, 44(9): 759-770.
- 5] Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. In: Richardson CC (ed) *annual review of biochemistry C*. *Annu Rew Biochem*, 1988, 57: 593-625.
- 6] Wise GE, Marks SC, Cahill DR, et al. Ultrastructural features of the dental follicle and enamel organ prior to and during tooth eruption. In: Davidovitch Z (ed) *The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption R*. Birmingham AAL EBSCO Media, Birmingham, AL, 1988: 243-249.
- 7] Wise GE, Rudick VL, Brun-Zinkernagel AM, et al. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of cultured cells from rat molar stellate reticulum. *J. Arch Oral Biol*, 1990, 35(8): 603-613.

(本文编辑 王 晴)

### 颌面部血管瘤生长分子机制及治疗研究进展国家级继续教育学习班通知

为促进口腔颌面部血管瘤临床治疗和基础研究水平,经全国继续教育委员会学科组第九次工作会议审定通过,兹定于 2004 年 7 月 18~24 日在福建省福州市举办《颌面部血管瘤生长分子机制及治疗研究进展国家级继续教育学习班》(编号 2003-08-02-002)。本次学习班由四川大学华西口腔医学院主办,福建医科大学协办,培训对象为口腔颌面外科和头颈外科各级医师及相关基础研究人员,结业授予国家级继续教育一类学分 12 分。联系人:四川省成都市人民南路三段 14 号 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科 华成舸 邮编:610041 电话:028-85501440,85501428 传真:028-85582167 E-mail:omswwcums@163.com