

釉基质蛋白对人牙周膜细胞生物学影响的体外研究

张凤秋^{1,2}, 孟焕新^{1△}, 韩 劫¹, 刘凯宁¹

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院牙周科, 北京 100081; 2. 首都医科大学附属北京口腔医院牙周黏膜科, 北京 100050)

[摘要] **目的:** 了解釉基质蛋白对人牙周膜细胞的增殖、矿化、蛋白合成及超微结构的影响。**方法:** 组织块法原代培养人牙周膜细胞, 茜素红染色进行细胞表型的鉴定; 采用细胞增殖试剂盒及流式细胞仪检测釉基质蛋白对人牙周膜细胞增殖及细胞周期的影响; BCA 蛋白定量试剂盒分析釉基质蛋白对牙周膜细胞蛋白合成的影响; 并用透射电镜观察牙周膜细胞超微结构的改变; 免疫组化染色观察釉基质蛋白作用下对牙周膜细胞骨涎蛋白和骨桥蛋白表达的影响。**结果:** 釉基质蛋白可促进牙周膜细胞增殖, 促进牙周膜细胞 DNA 的合成, 使牙周膜细胞周期的 G₁ 期细胞所占百分比降低, 而 S 期细胞所占百分比升高, 并可提高牙周膜细胞蛋白总量, 透射电镜观察可见经釉基质蛋白作用后的牙周膜细胞胞浆丰富, 与蛋白合成相关细胞器粗面内质网及高尔基体发达, 釉基质蛋白可促进牙周膜细胞矿化相关蛋白骨涎蛋白和骨桥蛋白的表达。**结论:** 釉基质蛋白能促进牙周膜细胞增殖、蛋白合成及矿化相关蛋白骨涎蛋白和骨桥蛋白的表达, 促进牙周组织的再生。

[关键词] 牙周膜; 牙釉质蛋白质类; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2012)01-0006-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2012.01.002

Effects of emdogain on human periodontal ligament cells *in vitro*

ZHANG Feng-qiu^{1,2}, MENG Huan-xin^{1△}, HAN Jie¹, LIU Kai-ning¹

(1. Department of Periodontology, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China; 2. Department of Periodontology and Oral Medicine, Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of emdogain, enamel matrix derivative (EMD), on the proliferation, cell cycle, mineralization and ultrastructure of human periodontal ligament (PDL) cells *in vitro*. **Methods:** The influence of cell growth on PDL cells was evaluated by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) in the presence and absence of emdogain, after 1, 3, and 5 d of culture. DNA synthesis and ultrastructure of PDL cells were observed by flow cytometry (FCM) and transmission electron microscopy (TEM) in the presence and absence of emdogain after 3 d of culture. The increasing of osteogenic capacity was verified by the expression changes of osteogenic differentiation markers of bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) in emdogain-treated PDL cells by immunohistochemical staining. **Results:** Incubation of PDL cells with emdogain after 3 d significantly stimulated cell growth and DNA synthesis. Emdogain enhanced the osteogenic potential of PDL cells by high expression of osteogenic differentiation markers of BSP and OPN. **Conclusion:** The data indicate that Emdogain enhances cell proliferation and promotes differentiation of PDL cells, which contributes to periodontal tissue regeneration.

KEY WORDS Periodontal ligament; Dental enamel proteins; Cell proliferation; Cell cycle

釉基质蛋白 emdogain 是一种商品化的釉基质蛋白, 已被引入牙周炎治疗领域, 可以获得比较理想的牙周组织再生, 尽管目前其确切的作用机制尚不清楚, 但动物实验及临床资料表明^[1-2], emdogain 可以有效促进牙骨质和牙槽骨的再生, 利于牙周新附着的形成, 并且这种再生类似于牙周组织的正常发育

过程, 而牙周膜细胞 (periodontal ligament cell, PDLC) 是牙周组织再生的基础^[3], 是牙周组织再生的主要细胞来源, 因此, 本研究旨在通过观察 emdogain 对牙周膜细胞的增殖、矿化、蛋白合成及超微结构的影响, 阐释 emdogain 促进牙周组织再生的机制。

本研究开始前经北京大学生物医学伦理委员会

审核批准,所有患者均书面知情同意。

1 资料与方法

1.1 主要试剂

达尔伯克改良伊格乐培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)购自美国 GIBCO 公司, FBS 购自美国 Hyclone 公司,胰蛋白酶、地塞米松、L-抗坏血酸和 β -GP 购自美国 Sigma 公司, PV-9000 免疫组化试剂盒购自北京中杉生物公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所, BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 人 PDLC 的原代培养及鉴定

取因正畸需要拔除的健康前磨牙,刀片刮取牙根中 1/3 牙周膜组织,剪成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 碎块,接种于 24 孔培养板,10% (质量分数) FBS DMEM 培养液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% (体积分数) CO_2 饱和湿度的培养箱内培养。将第 3 代细胞以 10^4 /孔接种于已置盖玻片的 6 孔板,含矿化液(10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L VitC 和 10^{-7} mol/L 地塞米松)的 10% (质量分数) FBS DMEM 培养液培养,隔日换液,培养 21 d。以 4% (质量分数)多聚甲醛固定,茜素红染色法进行矿化结节染色。

1.3 emdogain 对 PDLC 增殖及细胞周期的影响

制备细胞悬液,调整细胞浓度至 3×10^4 /mL,取 96 孔培养板,每孔加入细胞悬液 100 μL ,每组复种 4 孔。标准环境下培养 24 h,实验组加入 100 mg/L emdogain 10% (质量分数) FBS 培养,对照组仍为 10% (质量分数) FBS 培养,分别于 1 d、3 d 和 5 d 后依据 CCK-8 试剂盒说明书检测细胞生长情况,每个孔内加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,把培养板放在培养箱内培养 3 h,用酶标仪在 450 nm 处测定光密度值(D)。

细胞周期分析:分组同上,培养 3 d 后,胰酶消化收集细胞,用约 3 mL 75% (体积分数)冰乙醇固定,离心后 PBS 重悬,洗 1 遍,再加入 PBS 1 mL,10 g/L RNAase 20 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,360 目细胞筛过滤,入 1.5 mL 离心管,1 000 r/min,离心 3 min,去除多余 PBS,将余下的约 0.7 mL PBS 将细胞重悬,0.1% (质量分数) Triton-100 配成的 10 g/L PI 染液取 1 滴,用流式细胞仪测试,然后用联机专用软件分析结果。

1.4 emdogain 对 PDLC 蛋白合成的影响及透射电镜观察

细胞接种密度及分组同上,采用 BCA 蛋白浓度

测定试剂盒。培养 3 d 后去培养液, PBS 洗 2 遍,加冰预冷的细胞裂解液,振荡 10 s,各孔加入 200 μL BCA 工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,用酶标仪在 570 nm 处测定光密度值(D)。

将第 3 代细胞在 6 孔板中培养,按实验组和对照组换加不同的培养液,孵育 72 h,收集于离心管内,用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤 2 次,用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 3% (体积分数)戊二醛固定细胞团,丙酮系列脱水、真空干燥、环氧树脂包埋、超薄切片、染色、透射电镜观察。

1.5 emdogain 对 PDLC 骨涎蛋白、骨桥蛋白表达的影响

分组同上,制备细胞爬片,3 d 后取片,4% (体积分数)多聚甲醛固定, PV-900 免疫组化试剂盒进行骨涎蛋白、骨桥蛋白染色,光镜下观察。

1.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 14.0 分析,组间均数比较用方差分析和 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 PDLC 的原代培养及鉴定

体外培养的人 PDLC 多为长梭形或多角形,胞体丰满,胞突细长,核圆形或卵圆形(图 1),茜素红染色可见红染的矿化结节,说明培养的成纤维细胞具有成骨细胞表型(图 2)。

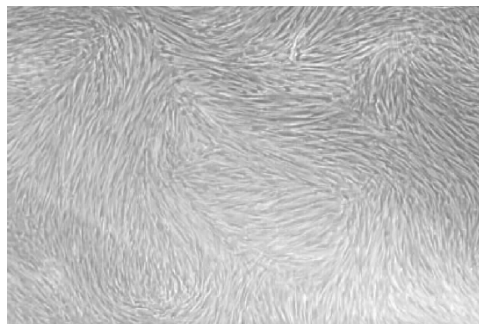


图 1 体外培养 PDLC

Figure 1 Primary culture of PDLC

2.2 emdogain 对 PDLC 增殖及细胞周期的影响(图 3)

emdogain 可促进人 PDLC 的增殖,第 3 天和第 5 天测得平均 D 值高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

经 FCM 测试的细胞周期时相结果为:实验组 G_0/G_1 85%, S 7.18%, G_2/M 7.74%, 对照组 G_0/G_1 93.15%, S 2.42%, G_2/M 4.43%, 与对照组相比,实验组的 G_1 降低,而 S% 升高,反映细胞增殖活力的

增殖指数[包括 DNA 合成期(S)、DNA 合成后期(G₂)和有丝分裂期(M)的细胞所占百分比,即(S + G₂M)%]也升高。

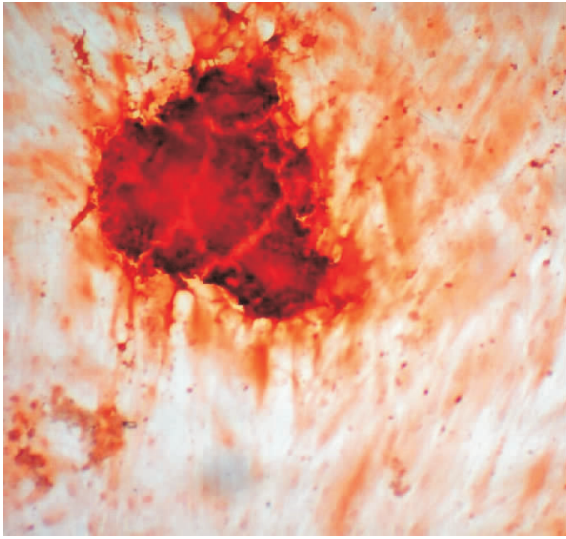


图 2 茜素红染色可见红染的矿化结节

Figure 2 Induced PDLC stained by Alizarin red

2.3 emdogain 对 PDLC 蛋白合成的影响及透射电镜观察(图 4~7)

emdogain 作用于 PDLC 3 d 后,实验组和对照组酶标仪的光密度值分别为 0.44 ± 0.016 和 0.27 ± 0.014,进行方差分析比较发现,实验组与对照组比较,差异具有统计学意义(P < 0.05)。

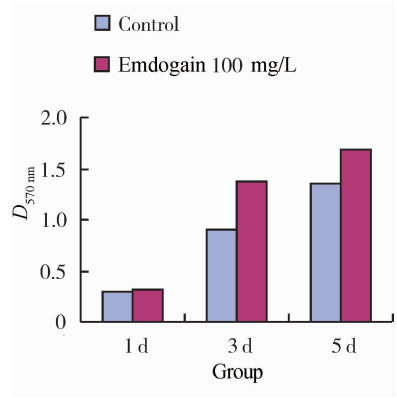


图 3 emdogain 对细胞增殖影响

Figure 3 The proliferation of PDLC enhanced by emdogain

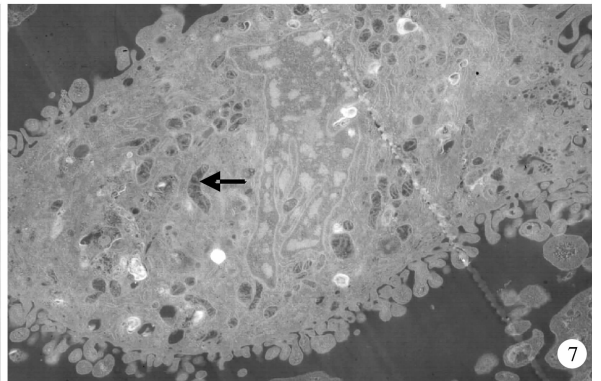
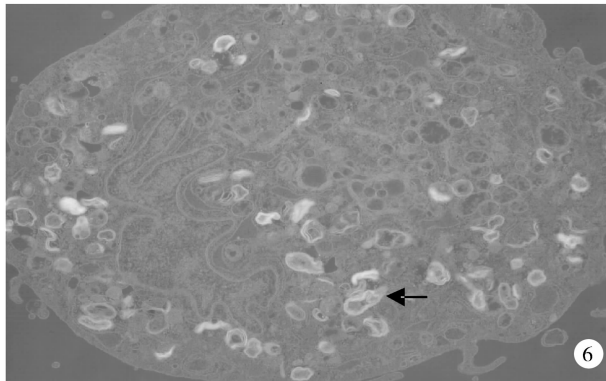
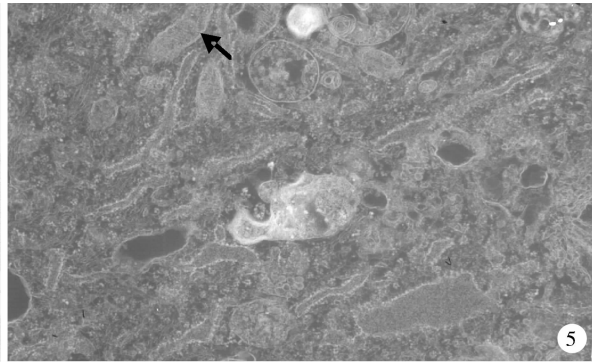
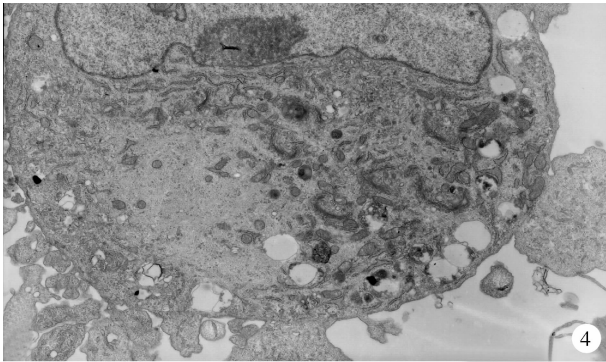


图 4 牙周膜细胞 图 5 发达的粗面内质网(箭头所示) 图 6 髓鞘样结构(箭头所示) 图 7 线粒体数量增多(箭头所示)

Figure 4 Human periodontal ligamen cell Figure 5 Rich rough endoplasmic reticulum (arrow)

Figure 6 Myelin-like structure (arrow) Figure 7 Abundant mitochondria (arrow)

透射电镜观察 emdogain 作用后细胞超微结构与对照组相比,细胞核体积较大,核内常染色质增多;胞浆丰富,可见发达的粗面内质网,有的内质网池见不同程度的扩张或成囊状形成髓鞘样结构(图

5);粗面内质网膜表面可见较多核糖体,胞浆内弥散着大量游离核糖体;胞浆内可见呈同心圆或板层状排列的髓鞘样结构(图 6);线粒体数量增多,体积增大,结构完整(图 7)。

2.4 emdogain 对 PDLC 骨涎蛋白、骨桥蛋白表达的影响(图 8 和 9)

BSP、OPN 在正常 PDLC 及 Emdogain 处理后 PDLC 中均表达,胞浆可见棕黄色阳性反应,但 Emdogain 处理后 PDLC 染色加深。

3 讨论

牙周炎治疗的目的是修复或再生已破坏的牙周组织包括牙周膜、牙槽骨和牙骨质以形成新附着。

传统的治疗方法如刮治和根面平整术、翻瓣术、植骨术只能达到牙周组织的部分修复。理想的牙周组织再生是胶原纤维埋入新生的牙槽骨和牙骨质,形成 Sharpey's 纤维,并可见成骨细胞和成牙骨质细胞。而牙骨质是牙周组织特有的矿化组织,并为其周围结缔组织内的胶原纤维附着提供支持,是维持牙周附着的关键结构,牙骨质再生问题是牙周组织再生的瓶颈。釉基质蛋白由于具有明显促进牙骨质再生的作用而日益受到关注。

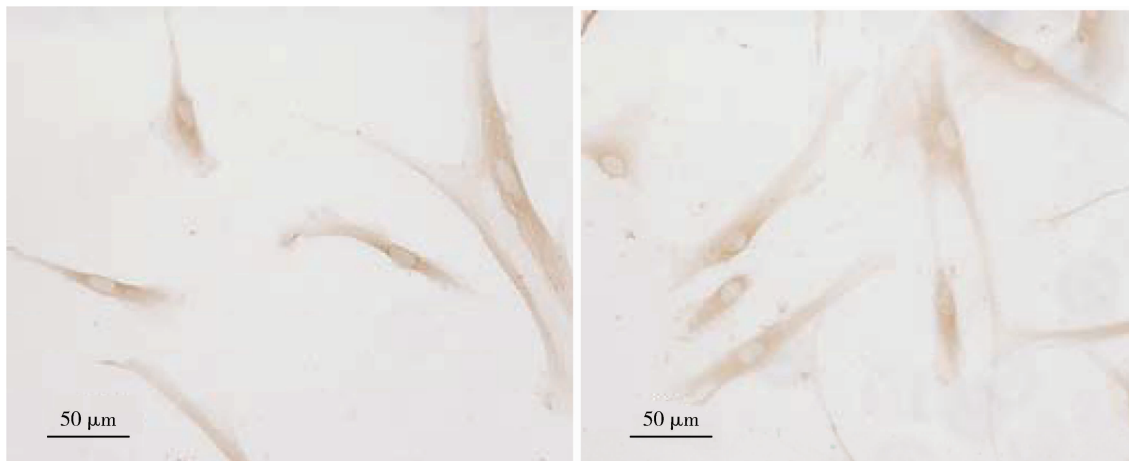


图 8 正常 PDLC OPN、BSP 染色

Figure 8 Expression of OPN and BSP in PDLC

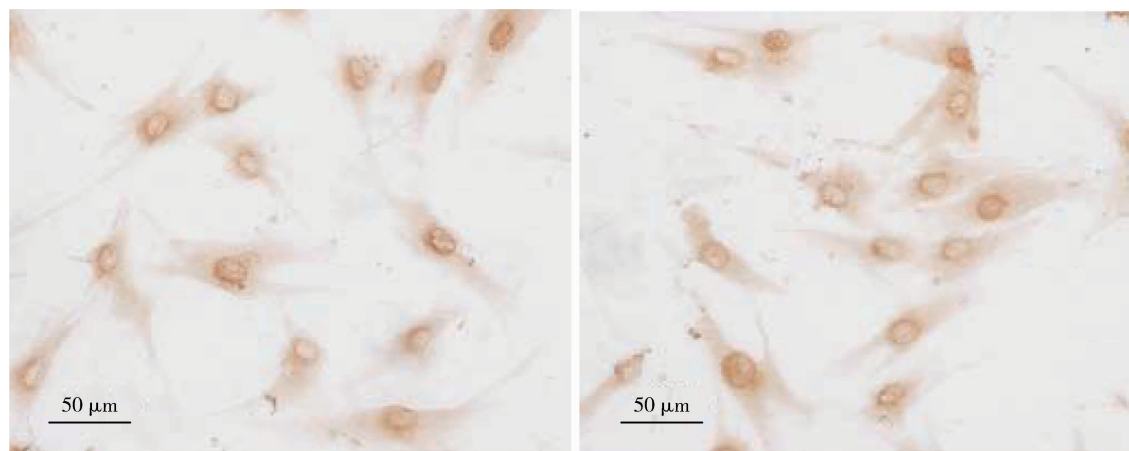


图 9 emdogain 处理后 PDLC OPN、BSP 染色

Figure 9 Expression of OPN and BSP in PDLC induced by emdogain

emdogain 是一种商品化的釉基质蛋白,在临床上主要用于牙周手术治疗 II 度根分歧病变和三壁骨袋,可以促进牙槽骨的再生,其牙周新附着的形成类似于牙周组织的生理性再生^[2,4-5]。釉基质蛋白是釉质发育过程中未矿化釉质中的蛋白成分,由成釉细胞和赫特威氏上皮根鞘(Hertwig's epithelial root sheath)内层细胞分泌^[6],可促进牙囊细胞的增殖和矿化结节的形成,提高胶原及骨桥蛋白的表达,并诱

导牙囊细胞向成牙骨质细胞的发生及牙骨质与牙本质的附着,促进牙周组织的发生^[7-8]。本实验表明,emdogain 可促进牙周膜细胞骨涎蛋白和骨桥蛋白的表达,这与釉基质蛋白对牙囊细胞的作用相似。

Rincon 等^[9]通过体外创伤模型发现,在 emdogain 作用下,牙周膜细胞迅速增殖并迁移到损伤区,说明 emdogain 可能通过加速牙周膜细胞的增殖而促进创伤的愈合。本研究结果也证实 emdogain

可促进牙周膜细胞的增殖,而且 emdogain 处理组的 $G_1\%$ (DNA 合成前期细胞所占百分比)降低, $S\%$ (DNA 合成期细胞所占百分比)升高,反映细胞增殖活力的增殖指数 (proliferation index) [包括 DNA 合成期(S)、DNA 合成后期(G_2)和有丝分裂期(M)的细胞所占百分比,即($S + G_2M$)%]也升高。Davenport 等^[10]研究发现 emdogain 也可以提高牙周膜细胞在病理性根面的附着能力,从而有利于牙周膜细胞优先占据根面,形成牙周新附着。

粗面内质网是蛋白质合成、转运和修饰加工的场所,而 emdogain 处理组细胞超微结构观察中发现胞浆细胞器丰富,粗面内质网发达,核糖体、线粒体增多,表示细胞代谢和细胞合成蛋白功能旺盛,牙周膜细胞处于功能活跃的状态。

本实验结果表明, emdogain 能促进牙周膜细胞增殖、细胞蛋白合成及矿化相关蛋白骨涎蛋白和骨桥蛋白的表达,从而可以解释 emdogain 在牙周组织再生中的可能作用。

参考文献

[1] Sakallioğlu U, Asikgöz G, Ayas B. Healing of periodontal defects treated with enamel matrix proteins and root surface conditioning: an experimental study in dogs[J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (10): 1831 - 1840.

- [2] Sculean A, Schwarz F, Becker J, et al. The application of an enamel matrix protein derivative (Emdogain) in regenerative periodontal therapy: a review[J]. *Med Princ Pract*, 2007, 16 (3): 167 - 180.
- [3] Mellonig JT, Valderrama P, Gregory HJ, et al. Clinical and histologic evaluation of non-surgical periodontal therapy with enamel matrix derivative: a report of four cases [J]. *J Periodontol*, 2009, 80 (9): 1534 - 1540.
- [4] Sculean A, Windisch P, Szendrői-Kiss D, et al. Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix derivative combined with a biphasic calcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects[J]. *J Periodontol*, 2008, 79 (10): 1991 - 1999.
- [5] Lekic PC, Rajshankar D, Chen H, et al. Transplantation of labeled periodontal ligament cells promotes regeneration of alveolar bone[J]. *Anat Rec*, 2001, 262 (2): 193 - 202.
- [6] Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, et al. The developing enamel matrix: nature and function[J]. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106 (1): 282 - 291.
- [7] Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells *in vitro* [J]. *J Periodontol*, 2001, 72 (5): 679 - 687.
- [8] Spahr A, Hammarstrom L. Response of dental follicular cells to the exposure of denuded enamel matrix in rat molars[J]. *Eur J Oral Sci*, 1999, 107 (5): 360 - 367.
- [9] Rincon JC, Haase HR, Bartold PM. Effect of emdogain on human periodontal fibroblasts in an *in vitro* wound-healing model[J]. *J Periodontol Res*, 2003, 38 (3): 290 - 295.
- [10] Davenport DR, Mailhot JM, Wataha JC, et al. Effects of enamel matrix protein application on the viability, proliferation, and attachment of human periodontal ligament fibroblasts to diseased root surfaces *in vitro* [J]. *J Clin Periodontol*, 2003, 30 (2): 125 - 131.

(2010-11-16 收稿)

(本文编辑:王 蕾)

· 消息 ·

张丽珠教授荣获第十五届“宋庆龄樟树奖”

2011年12月1日由中国福利会主办的第十五届“宋庆龄樟树奖”颁奖典礼在北京亚洲大酒店隆重举行,“神州试管婴儿之母”、北京大学第三医院生殖医学中心终身名誉主任张丽珠教授获奖并参加颁奖典礼。

全国人大常委会副委员长、全国妇联主席陈至立,中国福利会主席胡启立等领导出席颁奖典礼。国家教育部、民政部、卫生部、解放军总政治部、全国妇联、中国宋庆龄基金会等相关部委领导共100余人出席了颁奖典礼。

作为著名妇产科医学专家,张丽珠教授从20世纪40年代起就从事妇产科临床工作,80年代主持国家“七五”攻关课题“优生——早期胚胎的保护、保存和发育”,并于1988年3月10日成功培育出我国大陆首例试管婴儿,被誉为“神州试管婴儿之母”,为我国妇产科学、生殖医学的发展做出了巨大贡献。张丽珠教授用一生的努力使无数父母实现了孕育

孩子的渴望,她勇于开拓的科学精神和人性光芒使其成为此届宋庆龄樟树奖的人选。

张丽珠教授在获奖感言中说,感谢中国福利会将这个大奖颁发给自己,它带来的是激动和鼓励。工作成绩是医护卫等大家一起努力,在一穷二白的艰苦环境里克服困难取得的,是共同努力的结果。希望现代生殖技术的不断发展能为人民造福,促进家庭和谐,对国家和人类有所贡献。

樟树是国家名誉主席宋庆龄女士生前十分喜爱的树木,象征着宋庆龄的伟大品格。“宋庆龄樟树奖”于1985年6月由中国福利会创立,每两年评选颁发一次,授予为妇女儿童事业做出卓越贡献,在国内外具有一定知名度和影响力的人士。迄今已有115位人士获此殊荣。

(北京大学第三医院)