

骨碎补总黄酮对大鼠牙髓干细胞增殖和细胞周期的影响

黄晓菲¹,袁苏健¹,杨成²

(1. 长江航运总医院口腔科,武汉 430010;2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院口腔科,武汉 430022)

摘要 目的 探讨骨碎补总黄酮对大鼠牙髓干细胞(DPSCs)增殖和细胞周期的影响。方法 采用组织块消化法获得大鼠牙髓细胞,克隆化分离培养大鼠 DPSCs 并进行鉴定。以含 0.01,0.05 和 0.10 g · L⁻¹骨碎补总黄酮的培养基分别培养大鼠 DPSCs,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测各组细胞的增殖情况,流式细胞术检测各组细胞周期的变化。结果 经单克隆化分离培养得到的 DPSCs 细胞 CD₄₄、CD₂₉ 和 Stro-1 均呈阳性表达。骨碎补总黄酮组 DPSCs 增殖速度较对照组加快($P < 0.05$),且随骨碎补总黄酮浓度的增加而升高。流式细胞术分析表明 S 期细胞比例明显多于对照组($P < 0.05$),G₀/G₁期细胞明显减少($P < 0.05$),且表现出剂量依赖性。结论 骨碎补总黄酮对大鼠 DPSCs 增殖具有促进作用,这一作用可能是通过促进 DPSCs 从 G₀/G₁进入 S 期来实现。

关键词 骨碎补总黄酮;牙髓干细胞;增殖;细胞周期

中图分类号 R282.71;R285.5

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)09-1128-04

Effects of Total Flavonoids of Drynaria on the Proliferation and Cell Cycle of Rat Dental Pulp Stem Cells

HUANG Xiao-fei¹, YUAN Su-jian¹, YANG Cheng² (1. Department of Stomatology, General Hospital of the Yangtze River, Wuhan 430010, China; 2. Department of Stomatology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To explore the effects of total flavonoids of drynaria on the proliferation and cell cycle of rat dental pulp stem cells. **Methods** The rat dental pulp stem cells (DPSCs) were obtained with a tissue digesting method, which were cloning isolated and cultured for further identification. The dental pulp stem cells were cultured in media with different concentrations of drynaria total flavonoids (0.01 g · L⁻¹, 0.05 g · L⁻¹ and 0.10 g · L⁻¹). Then the proliferation was detected by MTT, and the changes of cell cycle in each group were analyzed by flow cytometry. **Results** CD₄₄, CD₂₉ and Stro-1 were positive in DPSCs. The proliferation rate of DPSCs treated with the total flavonoids of drynaria was accelerated in comparison to the control group ($P < 0.05$). The proportion of cells in phase S was conspicuously more than that in the control group ($P < 0.05$), and cells at G₀/G₁ phase were significantly decreased ($P < 0.05$), which were also showed in a dose-dependent manner.

Conclusion The total flavonoids of drynaria could promote the proliferation of DPSCs in rats, and the effect of which might rely on expediting DPSCs from phase G₀/G₁ into phase S.

KEY WORDS Total flavonoids of drynaria; Dental pulp stem cell; Proliferation; Cell cycle

骨碎补为水龙科植物槲蕨的干燥根茎,是我国传统骨伤科的常用药物,中医认为具有补肾、活血和续骨的功效,现代医学研究显示其主要有效成分包括柚皮苷和总黄酮^[1]。研究表明,骨碎补总黄酮能够促进人牙周膜细胞增殖,并对实验性牙槽骨吸收取得较好的疗效^[2-3]。GRONTHOS 等^[4]于 2000 年首次报道成功分离牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs),并进一步证实 DPSCs 是一类少量存在于机体牙髓组织中、具有高度增殖和自我更新能力的未分化间充质细胞。

笔者通过观察骨碎补总黄酮对大鼠 DPSCs 增殖的影响作用,为骨碎补总黄酮用于牙颌组织工程提供初步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康 SD 大鼠,清洁级,雌雄不限,25~30 d 龄(平均 28 d),体质量 80~100 g(平均 87 g),由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。动物合格证号: TJLA-2010-18。

1.2 试剂 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM)低糖培养基,特级胎牛血清(美国 Hyclone 公司),I 型胶原酶(美国 Biosharp 公司),胰蛋白酶,噻唑蓝(methyl thiazolium, MTT),二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),地塞米松、β-甘油磷酸钠,维生素 C(美国 Sigma 公司),骨碎补总黄酮(北京岐黄制药公司,批准文号:国药准字 Z20030007,批号:090102020),兔抗大

收稿日期 2012-01-16 修回日期 2012-03-22

作者简介 黄晓菲(1984-),女,湖北利川人,医师,硕士,研究方向:口腔种植与生物材料。电话:(0) 13886099246, E-mail:huangxf84@yahoo.com.cn。

通讯作者 杨成,男,教授,主任医师,博士生导师,博士,研究方向为口腔颌面外科疾病、口腔种植与生物材料。电话:027-85726167, E-mail:yangc715@126.com。

鼠 CD₂₉, CD₄₄ 和 FITC 标记的羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司), Stro-1 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司), 细胞周期检测试剂盒 (北京碧云天生物技术研究所)。

1.3 大鼠 DPSCs 的分离、培养和鉴定

1.3.1 大鼠 DPSCs 的分离和培养 颈椎脱臼法处死大鼠, 75% 乙醇消毒 10 min 后游离下颌骨, 放入含双抗的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 中, 在超净工作台内取下切牙牙髓并剪除根尖 1/3, 在盛有 DMEM 低糖培养基的玻璃培养皿中将牙髓组织充分剪碎, 以 3 mg · mL⁻¹ I 型胶原酶溶液 37 °C 水浴消化 1.0 ~ 1.5 h, 待组织块松散后以 1 000 r · min⁻¹ 离心 5 min ($r=10$ cm), 弃上清液, 加入含 10% FBS 的培养基后充分吹打成混悬液, 然后移入 6 孔板, 置 37 °C、5% 二氧化碳 (CO₂) 的培养箱中培养, 隔日半量换液。收集原代细胞的培养上清液, 1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min 后用孔径为 0.22 μm 的一次性滤器过滤, 再加入等体积含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基, 以此作为克隆化培养的适应性培养基。原代牙髓细胞经过一段时间培养后, 挑选其中出现的细胞克隆转移至 96 孔板继续培养扩增, 细胞达到一定数量后依次转移至 24, 6 孔板及培养瓶中培养, 待培养瓶中细胞 80% ~ 90% 融合后, 按 (1:2) ~ (1:4) 比例进行胰酶消化传代。

1.3.2 大鼠 DPSCs 的鉴定 取生长良好的 DPSCs, 消化、离心后用流式缓冲液 (含 1% 牛血清清蛋白的 PBS) 吹打成单细胞悬液, 分别加入 CD₂₉、CD₄₄ 和 Stro-1 抗体, 4 °C 孵育 30 min, 流式缓冲液离心、洗涤细胞 2 次, 重悬细胞后加入 FITC 标记的第二抗体, 再次 4 °C 孵育 30 min, 洗涤 2 次后用流式缓冲液重悬, 上机检测相应表面标志的表达情况。

1.4 MTT 比色法检测 DPSCs 增殖活性 取生长良好的 DPSCs, 调整细胞浓度为 1 × 10⁴ · mL⁻¹, 接种到 96 孔板中, 每孔加入细胞悬液均为 200 μL, 培养 24 h 细胞贴壁后弃上清液, 用 PBS 洗涤 2 次后加入含 0.01, 0.05 和 0.10 g · L⁻¹ 浓度骨碎补总黄酮的培养基 200 μL, 设不加骨碎补总黄酮的培养基 200 μL 为对照组, 实验组和对照组均设 6 个重复孔, 分别于培养后 3, 5, 7 和 9 d 进行检测。于检测终点前 4 h 在各孔中加入 20 μL 浓度为 5 mg · mL⁻¹ 的 MTT 溶液, 到达检测终点时弃上清液后加入 150 μL DMSO 充分混合, 震荡 10 min 后用酶标仪检测在 570 nm 处的吸光度值 (A_{570})。

1.5 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 单染检测 DPSCs

细胞周期 取生长良好的 DPSCs, 消化重悬后调整细胞浓度为 1 × 10⁵ 个 · mL⁻¹ 接种到 6 孔板中, 次日分别以骨碎补总黄酮终浓度为 0.01, 0.05 和 0.10 g · L⁻¹ 培养基及不加骨碎补总黄酮的培养基持续培养 3 d 后进行检测。检测操作按细胞周期检测试剂盒说明书进行, 胰酶消化、离心收集细胞, 加入预冷 70% 乙醇 1 mL, 轻轻吹打混匀后 4 °C 固定 2 h, 1 000 ×g 离心 5 min, PBS 洗涤后离心, 加入 PI 染液 0.5 mL 后缓慢并充分重悬细胞, 37 °C 避光孵育 30 min 后上机检测。

1.6 统计学方法 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 DPSCs 的分离、培养和鉴定 取材原代细胞接种 24 h 后即可见有散在单细胞贴壁, 72 h 后细胞伸展生长, 多呈成纤维细胞样, 少数细胞增殖较快, 有小的细胞克隆形成, 培养 11 ~ 13 d 可见细胞数量明显增多, 部分细胞呈集落样克隆性生长 (图 1a), 挑取细胞克隆培养扩增后所获得的 DPSCs 几乎全为长梭形, 有细胞突起 (图 1b)。第 2 代以后细胞平均传代时间为 5 ~ 6 d。流式细胞术检测结果显示大鼠 DPSCs CD₄₄ 和 CD₂₉ 表达率均 > 75%, 而 Stro-1 的表达率也达到接近 60%, 较未克隆化培养前有明显提高。

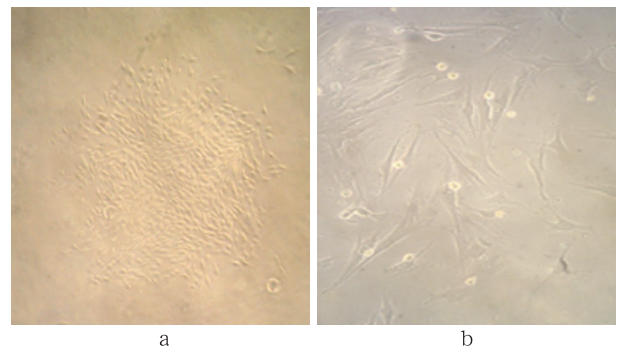


图 1 DPSCs 的 PI 染色图

a. DPSCs 呈克隆性集落生长 (×40); b. DPSCs 为成纤维样长梭形细胞 (×40)

Fig. 1 PI staining of DPSCs

a. Colony formation of DPSCs (×40); b. Fibroblast-like DPSCs (×40)

2.2 骨碎补总黄酮对 DPSCs 增殖活性的影响 各组细胞在各时间点的 MTT 吸光度值 (A_{570}) 见表 1, 生长曲线见图 2。大鼠 DPSCs 经浓度分别为 0.01, 0.05 及 0.10 g · L⁻¹ 含骨碎补总黄酮培养基作用后, 在各检测

时间点,各实验组 A_{570} 与对照组相比均增加 ($P < 0.05$),且 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组较 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的 A_{570} 也增加 ($P < 0.05$),但 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 较 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 A_{570} 增

加差异无统计学意义 ($P > 0.05$);从浓度上看,各实验组第 5,7,9 天较第 3 天的 A_{570} 均增加 ($P < 0.05$),且各实验组 A_{570} 时间依赖性显著增加 ($P < 0.05$)。

表 1 4 组细胞 MTT 吸光度值 A_{570}

Tab.1 The optical density A_{570} of 4 groups by MTT analysis

组别	3 d	5 d	7 d	9 d
骨碎补总黄酮				
0.01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.245±0.035 ^{*1}	0.276±0.020 ^{*1*2}	0.446±0.015 ^{*1*2}	0.460±0.023 ^{*1*2}
0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.261±0.013 ^{*1}	0.313±0.030 ^{*1*2}	0.499±0.025 ^{*1*2}	0.510±0.042 ^{*1*2}
0.10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	0.266±0.014 ^{*1}	0.309±0.024 ^{*1*2}	0.511±0.023 ^{*1*2}	0.524±0.047 ^{*1*2}
对照组	0.221±0.026	0.233±0.013	0.421±0.021	0.445±0.026

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与第 3 天比较, ^{*2} $P < 0.05$

Compared with the control group, ^{*1} $P < 0.05$; Compared with the same group at the third day, ^{*2} $P < 0.05$

2.3 骨碎补总黄酮对 DPSCs 细胞周期的影响 在所有检测的细胞样本中均未发现有 DNA 倍体异常的细胞。经骨碎补总黄酮作用后,DPSCs 细胞周期分布如表 2 所示。流式细胞术分析表明骨碎补总黄酮各组 S 期细胞比例明显多于对照组 ($P < 0.05$), G_0/G_1 期细胞明显减少 ($P < 0.05$),且 S 期细胞增多和 G_0/G_1 期减少的效应表现出剂量依赖性。 0.05 和 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 骨碎补总黄酮组 G_2/M 期细胞明显减少,但 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组效应并不明显。

表 2 骨碎补总黄酮对 DPSCs 细胞周期的影响

Tab.2 The effect of total flavonoids of drynaria on cell cycle of DPSCs

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
骨碎补总黄酮			
0.01 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	79.5±0.6 ^{*1}	9.7±0.3 ^{*1}	10.8±0.7
0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	75.7±1.8 ^{*1*2}	15.7±1.0 ^{*1*2}	9.6±1.2 ^{*1}
0.10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组	67.7±1.4 ^{*1*2}	24.4±1.4 ^{*1*2}	7.9±0.6 ^{*1*2}
对照组	81.4±0.6	7.3±0.7	11.3±0.5

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与前一浓度组比较, ^{*2} $P < 0.05$

Compared with the control group, ^{*1} $P < 0.05$; Compared with the former group, ^{*2} $P < 0.05$

3 讨论

GRONTHOS 等^[4]采用酶消化法培养人原代牙髓细胞,将其中能形成细胞克隆、具有高增殖率、在体内均能形成矿化组织的细胞命名为 DPSCs。研究显示,DPSCs 位于牙髓干细胞龛内,通常处于静息状态,当牙髓受到损伤等刺激后,它们将分化为功能性成牙本质细胞形成修复性牙本质^[5]。虽然 DPSCs 数量很少,但它们在牙组织损伤修复过程中起着十分重要的

作用^[6]。随着研究的不断深入,DPSCs 的终末分化细胞谱系也在不断增加,这促使人们认识到 DPSCs 作为组织工程种子细胞的可能性,并成为当今口腔医学研究的热点之一。

目前多数关于 DPSCs 的研究都是在培养原代牙髓细胞的基础之上展开的。获得原代牙髓细胞的方法主要有酶消化法、组织块法、组织块消化法 3 种。刘俊等^[7]设计了组织块消化法培养人原代牙髓细胞,在相对较短时间内获得足量存活的牙髓细胞。由于大鼠牙髓组织细胞量较少,本实验采用了组织块消化法分离培养牙髓细胞,经短时温和消化后的牙髓组织块结构更为疏松,有利于细胞的游出,既缩短了培养时间,同时又降低了长时间消化对细胞活性的影响,提高了细胞存活率,从而能达到一定细胞密度,利于其生长,提高了原代细胞培养效率。牙髓是高度血管化的疏松结缔组织,细胞成分并不单一,主要包括牙髓成纤维细胞、成牙本质细胞及少量的未分化间充质细胞等。目前公认牙髓组织中未分化间充质细胞即为 DPSCs,仅占牙髓细胞总量很小一部分,组织块消化法获得的细胞为牙髓混合细胞,多数为牙髓成纤维细胞,仅有少量形态不规则的细胞可能为 DPSCs^[8]。因此,需要对所获得的牙髓细胞进行筛选。目前用于细胞分选的方法主要有密度梯度离心结合贴壁筛选法、细胞克隆化培养,以及近年来较流行的免疫磁珠分选和流式细胞分选。本实验参照郭红延等^[9]的方法进行细胞克隆化培养,挑选出原代牙髓细胞中出现的细胞克隆逐步扩增,从而获得了足量相对较为纯化的 DPSCs,但整个扩增过程耗时较长。 CD_{44} 、 CD_{29} 和 Stro-1 为 DPSCs 的特异性表面标志,尤其是 Stro-1 被广泛作为流式或免疫磁珠法从原代牙髓细胞中分选 DPSCs,其表达水平的高低可以在一定程度上反映

DPSCs 的分离纯度^[10-11]。本研究结果显示,Stro-1 在未进行克隆挑取培养前阳性率较低(11.14%),而在进行克隆性扩大培养后 Stro-1 阳性率明显提高(59.16%),且经单克隆化培养后 CD₄₄ 和 CD₂₉ 均呈阳性表达(77.87% 和 97.67%),证实单克隆化扩大培养可以显著提高分选后细胞中 DPSCs 的纯度。

通过对人牙周膜细胞、牙髓细胞和人牙周韧带细胞的作用研究证实,骨碎补具有促进细胞增殖的作用^[3,12-13]。本研究表明,与对照组相比,各实验组 A₅₇₀ 均增加($P < 0.05$),说明骨碎补总黄酮能促进 DPSCs 增殖,但 0.10 g · L⁻¹ 较 0.05 g · L⁻¹ 的 A₅₇₀ 差异无统计学意义($P > 0.05$),提示在稍高浓度范围内,提高骨碎补总黄酮浓度并不能明显促进细胞增殖,可能表现出了细胞破坏作用,这与文献报道关于骨碎补对 BMSCs 的实验研究结果是一致的^[14-15]。在第 3~9 天内,各浓度组的 A₅₇₀ 随着时间的延长而增加($P < 0.05$),说明骨碎补总黄酮对 DPSCs 的促增殖作用有时间相关性。

细胞周期可分为 DNA 合成前期(G₁期)、DNA 合成期(S 期)、DNA 合成后期(G₂期)和分裂期(M 期)。S 期主要进行 DNA 与 DNA 组装构成染色质等相关的组蛋白及 DNA 复制所需要的酶的合成,细胞在此期由二倍体成为四倍体。G₁期的细胞并不是全部会进入 S 期,一部分细胞进入静止期(G₀期),即细胞通过 G₁期的阻留而处于不增殖状态,一部分细胞可能不立即进入 S 期,仅在受到刺激或需要时才继续增殖,另一部分细胞则能及时进入 S 期,保持持续增殖的能力,因此 S 期是衡量细胞增殖的重要标志^[16-17]。本实验中与对照组比较,不同浓度组均能显著提高 S 期细胞比例,同时降低 G₀/G₁期细胞的比例,且高浓度组较低浓度组的效应更为明显;另外,0.05 和 0.10 g · L⁻¹ 组 G₂/M 期细胞比例与对照组比较也有所减少,尤以 0.10 g · L⁻¹ 组更为明显。原因与过高浓度的骨碎补总黄酮可能有一定的细胞毒性有关,这也与上述 0.10 g · L⁻¹ 组细胞增殖较其他浓度组慢的结果相一致。

综上所述,骨碎补总黄酮在合适的浓度对 DPSCs 有明显的促增殖作用,其机制可能与其促进 DPSCs 周期进行,使 DPSCs 更多地从 G₀/G₁期进入 S 期有关,为骨碎补总黄酮应用于牙颌组织工程提供了初步的实验基础。

参考文献

- [1] 孙金谔,何伟涛,刘康,等. 骨碎补总黄酮与骨质疏松症的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2008,14(10):763-766.
- [2] 陈莉丽,唐琪,严杰. 骨碎补提取液对实验性牙槽骨吸收疗效的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(6):60-64.

- [3] 蒋俊强,丁一,李小玉,等. 骨碎补柚皮苷对人牙周膜细胞增殖、碱性磷酸酶活性影响的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志,2009,27(5):538-541.
- [4] GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25):13625-13630.
- [5] ZHANG W, YELICK P C. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization[EB/OL]. [2010-02-10]. <http://www.hindawi.com/journals/ijd/2010/856087/ref/>.
- [6] WADDINGTON R J, YOUDE S J, LEE C P, et al. Iso-lation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp [J]. Cells Tissues Organs, 2009, 189(1-4):268-274.
- [7] 刘俊,李玉晶. 应用不同方法进行人牙髓细胞原代培养的比较研究[J]. 北京口腔医学,2005,13(3):148-152.
- [8] SLOAN A J, WADDINGTON R J. Dental pulp stem cells: what, where, how? [J]. Int J Paediatr Dent, 2009, 19(1):61-70.
- [9] 郭红延,吴补领,郭希民,等. 大鼠牙髓干细胞的培养和鉴定[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2004,14(5):242-245.
- [10] MOKRY J, SOUKUP T, MICUDA S, et al. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells[J]. J Biomed Biotechnol, 2010;1-11.
- [11] GRONTHOS S, ARTHUR A, BARTOLD P M, et al. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2011, 698(1):107-121.
- [12] 郭晶洁,高永博,许彦枝. 骨碎补对人牙髓细胞体外诱导的作用[J]. 天津医药,2008,36(9):701-703.
- [13] 胡其勇,陈莉丽,王仁飞. 骨碎补柚皮苷对人牙周韧带细胞增殖和成骨分化潜能的影响[J]. 浙江大学学报:医学版,2010,39(1):79-83.
- [14] 徐展望,张建新,谭国庆,等. 中药骨碎补提取液对兔骨髓基质细胞体外成骨分化的影响[J]. 中医正骨,2006,18(6):15-16.
- [15] 舒晓春,刘君静,孔梅,等. 含骨碎补总黄酮血清对新生 SD 大鼠成骨细胞增殖、分化和矿化的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志,2010,26(7):591-594.
- [16] 黄琰菁,桂玲,于世英. 阿司匹林对人胶质瘤 H4 细胞株细胞周期的影响[J]. 医药导报,2010,29(12):1542-1545.
- [17] SARMADI V H, TONG C K, VIDYADARAN S, et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation of lymphoid origin haematopoietic tumour cells by inducing cell cycle arrest[J]. Med J Malaysia, 2010, 65(3):209-214.

DOI 0.3870/yydb.2012.09.006