

# 成牙骨质细胞培养方法的研究进展

杨 力综述 蔡 萍审校

(武汉大学口腔医院正畸科 湖北 武汉 430079)

**[摘要]** 由成牙骨质细胞(CB)形成的牙骨质在正畸治疗过程中有着重要的作用,但迄今为止,人们对于牙骨质和形成牙骨质的CB知之甚少。从CB着手建立体外培养的CB系,是进行该细胞研究的关键。下面就牙骨质瘤来源的CB、CD1小鼠来源的CB和牙周膜细胞、人牙骨质来源的CB、人牙骨质薄层刮取物来源的CB、大鼠第一磨牙来源的CB、人牙周膜来源的CB、牛牙骨质来源的CB、人CB细胞系克隆株来源的CB和马后牙来源的CB在体外的分离培养研究进展作一综述。

**[关键词]** 成牙骨质细胞; 正畸治疗; 生物学特性; 细胞培养

**[中图分类号]** Q 813.1+1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.01.021

**Research progress of cementoblast *in vitro* culture** YANG Li, CAI Ping. (Dept. of Orthodontics, College of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China)

**[Abstract]** Cementum is formed by cementoblast, and it plays an important role in orthodontic treatment. Little is known about cementum and cementoblast. To develop an *in vitro* cell line is the key to study the cementoblast. The review will give a brief introduction of *in vitro* culture of cementoblast derived from cementoma, CD1 rat, rat first molar, human periodontal ligament, bovine cementum, human cementoblast cell line, and horse posterior teeth.

**[Key words]** cementoblast; orthodontic treatment; biological character; cell culture

牙骨质在牙周组织的发生、发育和再生中起着非常重要的作用,与正畸治疗亦密切相关<sup>[1-2]</sup>。研究成牙骨质细胞(cementoblast, CB)能够帮助人们认识牙骨质及其生物学特性。目前,世界上仅有少数实验室成功地建立了牙骨质来源细胞的体外培养体系并以此作了系列研究<sup>[3-6]</sup>。

## 1 牙骨质瘤来源的CB培养

Arzate等<sup>[7]</sup>培养的来源于人牙骨质瘤的CB,为多角形,其碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性为阳性。鉴别方法:牙骨质附着蛋白(cementum attachment protein, CAP)抗体染色阳性,特异性抗体免疫组化和蛋白质印迹染色显示,这些细胞表达骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)以及I、II型胶原,体外有矿化物形成。体外培养的人牙骨质瘤来源的CB可以合成和分泌牙骨质蛋白,如相对分子质量为 $5.6 \times 10^4$ 的蛋白质、CAP、牙骨质衍生生长因子(cementum derived growth factor, CDGF)、血小板衍生生长因子

(platelet-derived growth factor, PDGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)。该方法的优点是来源于肿瘤的细胞较容易培养,但其作为赘生物来源细胞可能因已转化,而难以准确表达正常情况下CB的生物学特性和功能。

## 2 CD1小鼠来源的CB和牙周膜细胞培养

D'Errico等<sup>[8]</sup>在利用原位杂交技术检测CD1小鼠牙根发育期间矿化相关蛋白,如BSP、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)以及骨钙蛋白(osteocalcin, OC)的时序表达时发现,41d龄CD1小鼠的CB高表达BSP、OPN和OC,而牙周膜细胞(periodontal ligament cell, PDLC)不表达BSP、OPN和OC。将41d龄CD1小鼠的150个下颌第一磨牙牙胚酶消化后行常规成骨细胞培养<sup>[9]</sup>,原位杂交鉴别显示,所培养的细胞表达I型胶原、BSP、OPN和OC,但不表达牙本质涎蛋白,即所培养的细胞并非成牙本质细胞。

Gao等<sup>[10]</sup>专门设计并且验证出一种分离牙胚和牙槽骨的方法,以确保牙胚表面不带有成骨细胞(osteoblast, OB),同时还建立起稳定的永生化的CB和PDLC体外培养体系,以便能更好地研究其

**[收稿日期]** 2009-06-03; **[修回日期]** 2009-08-28

**[作者简介]** 杨 力(1982—),男,湖北人,硕士

**[通讯作者]** 蔡 萍, Tel: 13037168339

生物学活性。为使 CB 和 PDLC 永生化,他们采取了如下 2 种永生化方法。一种是先分离 CD1 小鼠的 CB 和 PDLC,然后将其转染野生型 SV40-TAg,使其具永生化特性。用这种方法培养的细胞主要用于较长时间的研究,如细胞的体外矿化分析,细胞对骨营养激素的反应性等。另一种方法是从 H-2kbtA58immoto 小鼠当中去分离 CB 和 PDLC,这些细胞带有温度敏感性 SV40-TAg,只适合在 33 °C 并有干扰素- $\gamma$  存在的环境中生长,主要用于研究蛋白和或因子对牙骨质来源细胞分化的影响及其机制。

MacNeil 等<sup>[11]</sup>采用 OC 为启动子和含有 SV40-TAg 的转基因鼠为动物模型,对上述转基因鼠来源的 CB 和 PDLC 的体外分离培养方法加以改进。结果显示,只有同时表达 OC 和 SV40-TAg 的细胞在体外才具有永生化特征,从而去除了混杂在 CB 中的其他细胞(主要是 PDLC)。其后,Cheng 等<sup>[12]</sup>对 CB 的生物学特性作了一系列的研究,其中包括 CB 在体外可促进矿化结节的形成;CB 表面具有甲状旁腺素和甲状旁腺素相关蛋白-1 型受体,表现为甲状旁腺素相关蛋白可增加 CB 对环腺苷酸和 c-fos 的表达;胰岛素样生长因子-1、PDGF-BB 和转化生长因子- $\beta$  等生长因子可促进 CB 内 DNA 的合成等。

### 3 人牙骨质来源的 CB 培养

Grzesik 等<sup>[13]</sup>将正畸治疗时拔下的健康前磨牙的牙周膜去除,再将从前磨牙上所刮取的牙骨质切细,用胶原酶消化 2 次,行常规组织细胞培养。再利用细胞克隆技术,分别培养每个细胞克隆并将其传代。CB、OB 和 PDLC 的鉴别方法如下。1)AKP 的活性测定:CB 的 AKP 活性较低或没有,CB 体外矿化程度低于 PDLC 和 OB;2)将附着有 CB、OB 和 PDLC 的羟磷灰石-三磷酸钙陶瓷分别移植到免疫缺陷小鼠皮下,观察其骨组织的形成和组织学特征:OB 和 CB 组均可形成骨样组织,而且各具组织学特点<sup>[14]</sup>。在 CB 组新形成的骨组织内细胞少和无骨髓;新形成的矿化基质细胞较长大,其抗酒石酸盐酸性磷酸酶染色阴性;在 CB 形成的部分矿化基质中,有与 PDLC 相关联的纤维组织存在;在牙骨质中,纤调蛋白和光蛋白聚糖较骨组织丰富<sup>[15]</sup>。牙骨质细胞由 CB 转变而来,但有关牙骨质细胞的生理特点和功能目前尚不清楚。该研究认为,牙骨质细胞并非 CB

细胞的终末阶段,仍具有移行和分化的功能。

### 4 人牙骨质薄层刮取物来源的 CB 培养

Saygin 等<sup>[16]</sup>将拔下的阻生第三磨牙的软组织清除,以其根中 1/3 表面刮取物行组织块法培养,所培养的细胞用免疫细胞化学法染色。结果:角蛋白阴性者可排除上皮细胞,细胞角质素阴性者可排除内皮细胞,S-100 阴性者可排除朗格汉斯细胞。他们认为,如果一种细胞同时符合以下 3 个标准则为 OB:1)1,25-二羟胆钙化醇诱发 OC 的释放;2)1,25-二羟胆钙化醇诱导 AKP 高表达;3)矿化基质形成。其中,尤以第 2 条为 OB 高特异性标记,可借此区分 OB 和 CB。

### 5 大鼠第一磨牙来源的 CB 培养

Gao 等<sup>[10]</sup>将所选取的 12 周龄大鼠下颌第一磨牙以酶消化法去除其牙周膜和 PDLC,然后将其置于含有条件培养液的 6 孔培养板中培养,镜下观察。结果显示:细胞为单核,细胞质丰富且有多个呈短梭形、多角形或立方形的突起。由于 BSP 为矿化组织相关蛋白并仅在 CB 和 OB 中表达,而成纤维细胞不表达 BSP,故用免疫细胞化学方法观察 BSP 的分布,可区分 PDLC、牙龈成纤维细胞、OB 和 CB。依据 OB 高表达 AKP 而 CB 不表达 AKP 的特性,可鉴别 OB 和 CB。

### 6 人牙周膜来源的 CB 培养

Liu 等<sup>[14]</sup>将取自人前磨牙和第三磨牙的 PDLC 常规培养后,用有限稀释法将其分成单细胞,使之分别形成克隆,然后对每一克隆行 AKP 活性和 CAP 结合能力测试。结果显示,AKP 活性和 CAP 结合均为阳性的克隆即为 CB 或 OB。然后依据 OB 较 CB 体外矿化水平高,将 CB 与 OB 分离。该方法的缺点是每个克隆的细胞数少,限制了分析评价每个细胞克隆的参数数量;优点是利用克隆技术纯化的每个细胞生物群体中的每个细胞的遗传特征和生物学特性相似,有利于对不同亚群细胞的形态和功能进行比较研究,而且有限稀释法克隆细胞不需特殊设备,操作简单迅速。

### 7 牛牙骨质来源的 CB 培养

侯建霞等<sup>[17]</sup>用组织块法联合酶消化法分离培养新生牛牙根表面的细胞,免疫细胞化学方法检测成牙骨质样细胞(cementoblast derived cell,

CDC)中与骨相关的标志物,如 OC、AKP 和 CAP 的表达,改良钙钴法检测其 AKP 的活性。结果所培养的增殖细胞具有 CB 的形态特征,经 5 次传代后细胞形态无明显改变。该细胞 OC 和 AKP 免疫细胞化学染色均为阳性并有 AKP 活性表达,CAP 呈阳性。该方法的优点是取材方便、不易污染和成功率高,而且一次取材可得到大量的细胞。缺点是 CDC 同成骨细胞一样均表达 OC,而 OC 是骨基质所特有的;同时,该细胞的 CAP 免疫细胞化学染色阳性,说明该细胞虽与成骨细胞相似,但只是一类具有 CB 特点的相似细胞。

## 8 人成牙骨质细胞细胞系克隆株中的 CB 培养

Kitagawa 等<sup>[18]</sup>通过转染人端粒酶反转录酶基因技术获得人成牙骨质细胞(human cementoblast, hCEM)细胞系克隆株,进而通过 AKP 等对其进行标记鉴别,获取 CB。把 hCEM 细胞系克隆株植入免疫鼠体内,可对其验证。该方法不仅可获取比较纯的 CB,同时可阐明 CB 与 OB 间的区别。

## 9 马后牙牙骨质细胞中的 CB 培养

Staszuk 等<sup>[19]</sup>以马后牙牙周细胞单一培养,通过形态学和免疫组化染色分离马的 CB。结果显示,马牙周成纤维细胞呈纺锤状和多边形,而其 CB 呈成簇的鹅卵石样。该培养方法的优点是,可通过较明显的形态学差别区分这两种细胞,进而通过免疫组化染色确定其细胞的种类,取材方便,可大量培养。缺点是马后牙牙骨质细胞中的 CB,只是一类具有人类 CB 特点的相似细胞。

## 10 参考文献

- [1] 黄 兰,白 丁.成牙骨质细胞研究现状[J].国际口腔医学杂志,2006,33(3):172-173.
- [2] 许向亮,赵士杰,高 岩.牙骨质相关细胞的研究进展[J].国际口腔医学杂志,2007,34(1):16-18.
- [3] Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez-Pérez MA, et al. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein[J]. J Dent Res, 2002, 81(8):541-546.
- [4] Lallier TE, Miner QW Jr, Sonnier J, et al. A simple cell motility assay demonstrates differential motility of human periodontal ligament fibroblasts, gingival fibroblasts, and pre-osteoblasts[J]. Cell Tissue Res, 2007, 328(2):339-354.
- [5] Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype[J]. J Dent Res, 2005, 84(5):390-406.
- [6] Kim HJ, Choi YS, Jeong MJ, et al. Expression of UNCL during development of periodontal tissue and response of periodontal ligament fibroblasts to mechanical stress *in vivo* and *in vitro*[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(1):25-31.
- [7] Arzate H, Olson SW, Page RC, et al. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture[J]. Bone Miner, 1992, 18(1):15-30.
- [8] D'Errico JA, Berry JE, Ouyang H, et al. Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts *in vitro* [J]. J Periodontol, 2000, 71(1):63-72.
- [9] D'Errico JA, MacNeil RL, Takata T, et al. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, *in situ* and *in vitro*[J]. Bone, 1997, 20(2):117-126.
- [10] Gao J, Symons AL, Haase H, et al. Should cemento blasts express alkaline phosphatase activity? Preliminary study of rat cementoblasts *in vitro*[J]. J Periodontol, 1999, 70(9):951-959.
- [11] MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, et al. Expression of type and collagen during development of the periodontal ligament in the mouse[J]. Arch Oral Biol, 1998, 43(10):779-787.
- [12] Cheng H, Catterson B, Neame PJ, et al. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum [J]. Connect Tissue Res, 1996, 34(2):87-96.
- [13] Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, et al. Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(1):52-59.
- [14] Liu HW, Yacobi R, Savion N, et al. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(10):1691-1699.
- [15] Carnes DL, Maeder CL, Graves DT. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament[J]. J Periodontol, 1997, 68(7):701-707.
- [16] Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, et al. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts[J]. J Periodontol, 2000, 71(10):1591-1600.
- [17] 侯建霞,曹采方,孟焕新.牛牙骨质来源细胞的分离、培养和鉴定[J].中华口腔医学杂志,2002,37(2):102-105.
- [18] Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, et al. Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Bone, 2006, 39(5):1035-1042.
- [19] Staszuk C, Gasse H. Primary culture of fibroblasts and cementoblasts of the equine periodontium[J]. Res Vet Sci, 2007, 82(2):150-157.