

# 牙囊细胞异质性研究

马惊雷综述 凌均荣审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院·口腔医学研究所 广东 广州 510055)

[摘要] 牙囊组织来源于外胚间充质,是牙骨质、牙槽骨及牙周膜的起源组织。牙囊组织并非均质性的细胞群体,而是含有干细胞和形成牙周组织的前体细胞等亚群,即牙囊细胞具有异质性。本文就牙囊细胞的异质性研究作一综述。

[关键词] 牙囊细胞; 干细胞; 前体细胞; 异质性

[中图分类号] R 782 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.06.018

**Heterogeneity research of dental follicle cell** MA Jing-lei, LING Jun-qi. (Research Institute of Stomatology, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] The dental follicle originated from the ectomesenchyme is the genetic tissue of cementum, alveolar bone and periodontal ligament. It is believed that this tissue is not homogeneous cell populations, but contains stem cells and lineage committed progenitor cells or precursor cells for cementoblasts, periodontal ligament cells, and osteoblasts, so dental follicle cells have heterogeneity. The research of dental follicle cell heterogeneity was reviewed in this paper.

[Key words] dental follicle cell; stem cell; progenitor cell; heterogeneity

牙囊(dental follicle, DF)组织起源于外胚间充质,是牙骨质、牙槽骨及牙周膜的起源组织,含有干细胞和形成牙周组织的前体细胞亚群,在一定诱导条件下,体外培养可以分化成成骨样或成牙骨质样细胞<sup>[1-2]</sup>。这就提示了 DF 细胞可能成为牙周组织工程的种子细胞,同时也要求学者们对 DF 组织的细胞构成要有进一步的认识,才能选取合适的 DF 细胞作为种子细胞。

## 1 DF 细胞异质性的发现

Handa等<sup>[3]</sup>从小牛牙根形成阶段的恒切牙牙胚中分离出牛 DF 细胞,用牙本质相关蛋白单克隆抗体 3G9 进行免疫组织化学检测呈阴性反应,说明分离培养后的牛 DF 细胞不含已分化的成牙骨质细胞。将含有约  $1.5 \times 10^6$  个牛 DF 细胞的 1 mL 培养液与 40 mL 羟磷灰石悬浊液混合,37 °C 孵化 90 min,再  $1\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 min,去上清液后将沉淀物与 15  $\mu\text{L}$  鼠纤维蛋白原和凝血素混合,形成包含 DF 细胞和羟磷灰石粉的纤维蛋白凝块,以仅含羟磷灰石粉的纤维蛋白凝块作对照,分别

移植入 5 周大的 SCID 小鼠皮下,4 周后实验组牛 DF 细胞于羟磷灰石颗粒边缘形成牙骨质样矿化组织,韧带样纤维组织位于矿化组织间,高倍镜下可见矿化结构类似于细胞性牙骨质,即成牙骨质样细胞镶嵌于基质中,对矿化结构进行牙本质相关蛋白单克隆抗体 3G9 免疫组织化学分析,呈阳性反应。逆转录聚合酶链反应分析牛 DF 细胞移植植物发现其表达 I 型胶原蛋白、骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨桥蛋白(osteopontin, OP)及骨钙素(osteocalcin, OCN)等的 mRNA,提示矿化组织为牙骨质类似物,进而证明 DF 细胞中含有牙周膜细胞及牙骨质细胞的前体细胞。

基于上述研究, Luan等<sup>[4]</sup>提出 DF 细胞中包含异质性的前体细胞或者单一祖细胞保持多谱系分化潜能。为检测看似均质性的 DF 是否存在异质性的前体细胞,该实验组用猴病毒 40 转染 DF 细胞使之永生化,以浸润 0.25%胰岛素的无菌滤纸收集可见的细胞克隆,并在 96 孔板中连续稀释,进而将单个细胞扩展为细胞系,最终分离出 DF1、DF2 和 DF3 细胞系。对这 3 个细胞系及牙槽骨来源的细胞系 AB1 进行对比,发现这 3 个细胞系在形态、增殖能力、矿化特征等方面均不相同,从而证实了 DF 前体细胞具有异质性的结论。

[收稿日期] 2009-12-13; [修回日期] 2010-04-10

[作者简介] 马惊雷(1984—),男,河北人,硕士

[通讯作者] 凌均荣, Tel: 020-83862621

还有学者从小鼠 DF 细胞中分离培养出 3 种细胞类型的 DF 细胞：立方形或多角形、长梭形及细长的细胞，前两种细胞核内有 2~4 个清晰的核仁，胞质内可见大量颗粒，并有众多线状伪足。各类型细胞波形蛋白染色均为阳性，角形蛋白染色阴性，因而可认为所培养的细胞均为间充质来源，且呈多种细胞表型，具有异质性。

## 2 DF 细胞的亚群构成

DF 细胞异质性的发现，说明 DF 组织是由不同的细胞亚群组成。为进一步认识 DF 细胞的群体组成，Luan 等<sup>[4]</sup>从永生化的 DF 细胞中分离出 3 个主要细胞系：DF1、DF2 及 DF3，并以牙槽骨来源的细胞系 AB1 作为对照，对 3 个细胞系的形态特点、增殖能力、矿化特征等进行研究，结果显示 DF1 具有典型的成纤维母细胞特征，DF2 呈梭形并有长突起，而 DF3 和 AB1 则为多边形。MTT 细胞增殖能力测定可见 DF1、DF2 细胞增殖速率高于 DF3 和 AB1，用流式细胞术测量处于不同增殖周期的细胞比例，发现 DF1、DF2 处于 S、G<sub>2</sub> 和 M 期的细胞比例高于 DF3 和 AB1。另外，细胞周期蛋白 D1 的表达水平 DF2 最高，DF1、DF3、AB1 依次降低。在矿化特征方面，DF1 仅见少量的无机磷酸盐，且 OCN 基因低水平表达，碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性低，提示 DF1 细胞缺乏生物矿化能力。而 DF2 细胞无机磷酸盐含量及 OCN 基因表达水平与 DF1 相似，但 ALP 表现为高活性，表明 DF2 缺乏生物矿化活性且处于低分化或未分化状态。在 DF3 和 AB1 中，Von Kossa 染色可见明显的无机磷酸盐沉淀，OCN 基因高水平表达，ALP 活性高，说明 DF3 和 AB1 具有较强的生物矿化能力。由此他们认为，DF 中存在异质性的前体细胞亚群，并至少包含 DF1、DF2 及 DF3 细胞系：其中 DF1 表现为高增殖活性，但不表现生物矿化行为，可能为成牙周膜细胞系，DF2 与 DF1 相似，但呈现高 ALP 活性，表明其处于高度未分化状态，可能为多潜能干细胞系，DF3 与 AB1 的生物矿化能力几乎相同，可能为成牙骨质或成骨细胞系。但在 Handa 等<sup>[3]</sup>将牛 DF 细胞移植到 SCID 小鼠皮下的实验中，仅得到牙骨质样矿化组织和韧带样纤维组织，而未得到骨样矿化组织。由此，他们认为 DF 中可能不含有成骨细胞的前体细胞，这可能与成骨细胞来自中胚层有关。

## 3 DF 前体细胞表面标志

Morsczeck 等<sup>[5]</sup>从人的阻生第三磨牙 DF 组织中分离出的少量黏附塑板表面的单个前体细胞，呈成纤维细胞样，免疫组织化学测定神经干细胞标志 Nestin 和 Notch-1，可见即使在长期传代培养之后，获得的 DF 前体细胞依然呈阳性反应。

Kemoun 等<sup>[6]</sup>研究发现：人 DF 前体细胞除 Nestin 和 Notch-1 呈阳性表达之外，STRO-1 表现为阳性，且每个 DF 中平均包含 6.75 个 STRO-1 阳性的细胞。STRO-1 是一种抗胰岛素细胞表面抗原，为公认的骨髓和脂肪等间充质前体细胞的表面标志；而牙周膜中 STRO-1 阳性细胞，被认为是牙周组织的前体细胞，具有再生牙周组织的能力<sup>[7-8]</sup>。Kemoun 等<sup>[9]</sup>对出生 6~23 d 的小鼠牙周组织进行定位研究发现，STRO-1 阳性细胞主要存在于出生 6~13 d 的小鼠 DF 组织，随后出现在出生 23 d 的小鼠牙周膜中，且 STRO-1 阳性的 DF 细胞可能是骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)的靶细胞，而 BMP 由上皮根鞘分泌，参与 DF 细胞成骨性分化的重要调节蛋白。Kemoun 等<sup>[6]</sup>用流式细胞术观察到人 DF 细胞的细胞表面抗原 CD13、CD44、CD73、HLA-1 均呈阳性表达，这与人骨髓干细胞类似。此外，Luan 等<sup>[4]</sup>的实验检测到 3 个 DF 细胞亚群的细胞表面抗原 CD44、CD29 及 CD105 均为阳性，而造血细胞表面标志 CD34 和 CD117 为阴性，表明获得的细胞系均为间充质细胞来源。

## 4 DF 干细胞

Luan 等<sup>[4]</sup>发现 DF2 细胞系具有高 ALP 活性，处于高度未分化状态，认为其可能为多潜能干细胞系。为证实 DF 细胞中含有多潜能的干细胞，Yao 等<sup>[10]</sup>将小鼠 DF 细胞分别接种于干细胞生长培养基和普通培养基，培养 2 周后，干细胞培养基可见细胞簇的形成以及作为干细胞潜在标志的 ALP 在细胞膜阳性表达，培养到第 3 代时，常规 RT-PCR 可检测到侧群干细胞标志的表达。

侧群干细胞(side population stem cell)是利用 Hoechst 染料和流式细胞术进行造血干/祖细胞分离时发现的一群特殊细胞，广泛分布于多种成体组织、胚胎和某些肿瘤细胞系中，既具有类似干细胞的自我更新和多向分化潜能，还具有独特的表型标记和生物学特征，代表一种新的干细胞类

型。经 Hoechst 染色后,侧群干细胞呈现荧光反应<sup>[11]</sup>。Yao 等<sup>[10]</sup>用 Hoechst 33342 染色干细胞培养基中的 DF 细胞发现,2%~4%的细胞呈弱阳性反应,提示这些细胞可能为侧群干细胞。

为进一步验证获得的细胞为具有多潜能分化能力的 DF 干细胞,Yao 等<sup>[10]</sup>将 DF 细胞接种于成骨性、成脂性以及神经诱导性培养基中培养,在成骨性培养基中可见骨样或牙骨质样矿化物质,已有实验用免疫组织化学的方法证实:人及牛的 DF 细胞可诱导分化成牙骨质细胞系,但目前尚无小鼠牙骨质特异性抗体,因此仍不能确定该矿化物质为牙骨质或骨质。此外,在成脂性及神经诱导性培养基中分别获得了脂肪细胞和神经元。以上结果表明,DF 细胞中存在具有多向分化潜能的干细胞。

## 5 应用展望及面临的问题

目前,有关 DF 细胞的研究热点主要有牙周组织再生和牙齿萌出机制 2 个方面。在牙周组织再生研究中,DF 细胞被视为可能的种子细胞,而在牙齿萌出机制的研究中,DF 细胞被证实起着重要的调节作用;但在上述两项研究中是否需要 DF 细胞进行亚群分类,在各项研究中起主要作用的各是 DF 细胞中的哪个亚群,还是多个亚群的综合作用结果,目前尚无相关报道。

在 DF 细胞的异质性研究中,如何更加准确地定义 DF 细胞亚群,是否存在未知的亚群,以及如何准确地分离各亚群,能否寻找到各亚群特异性的细胞表面标志,这些都是值得关注的问题。此外,DF 细胞中是否含有成骨细胞的前体细胞尚存在一定争论,而有关 DF 干细胞的细胞生物学研究仍需要进一步深化。

综上所述,有关 DF 组织细胞亚群异质性的研究仍有许多问题亟待解决,其前景值得关注。

## 6 参考文献

- [1] Morszeck C, Moehl C, Gotz W, et al. *In vitro* differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin[J]. Cell Biol Int, 2005, 29(7) 567-575.
- [2] Handa K, Saito M, Tsunoda A, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix *in vivo*[J]. Connect Tissue Res, 2002, 43(2/3) 406-408.
- [3] Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al. Cementum matrix formation *in vivo* by cultured dental follicle cells[J]. Bone, 2002, 31(5) 606-611.
- [4] Luan X, Ito Y, Dangaria S, et al. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium[J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(4) 595-608.
- [5] Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells(PCs) from human dental follicle of wisdom teeth[J]. Matrix Biol, 2005, 24(2) :155-165.
- [6] Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, et al. Human dental follicle cells acquire cement-oblact features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) *in vitro*[J]. Cell Tissue Res, 2007, 329(2) 283-294.
- [7] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. Lancet, 2004, 364(9429) :149-155.
- [8] Bartold PM, Shi S, Gronthos S, et al. Stem cells and periodontal regeneration[J]. Periodontol 2000, 2006, 40 : 164-172.
- [9] Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, et al. Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium[J]. Tissue Cell, 2007, 39(4) 257-266.
- [10] Yao S, Pan F, Prpic V, et al. Differentiation of stem cells in the dental follicle[J]. J Dent Res, 2008, 87(8) 767-771.
- [11] Cabana R, Frolova EG, Kapoor V, et al. The minimal instrumentation requirements for Hoechst side population analysis :Stem cell analysis on low-cost flow cytometry platforms[J]. Stem Cells, 2006, 24(11) 2573-2581.

(本文编辑 李 彩)