

## 血清饥饿及融合培养对人牙髓细胞周期 同步化和矿化活性的影响

彭伟伟, 戴兆威, 曹颖, 韩俊力\*, 朱亚琴\*

(上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院 口腔综合科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011)

**[摘要]** 目的: 比较血清饥饿及融合培养对人牙髓细胞周期同步化及矿化活性的影响。方法: 将人牙髓细胞分别培养至80%及100%融合后, 使用含0.5%胎牛血清的培养基继续培养细胞24、48、72 h, 使用流式细胞仪检测牙髓细胞的细胞周期。以100%融合培养后饥饿48 h的人牙髓细胞作为实验组, 80%融合培养的细胞作为对照组, 在基因水平检测碱性磷酸酶、I型胶原、骨钙素的表达; 在蛋白水平检测碱性磷酸酶活性。采用SPSS13.0软件包对数据进行统计学分析。结果: 在人牙髓细胞达到100%融合后, 经血清饥饿48 h的G0/G1期细胞比100%融合培养组以及血清饥饿组多( $P<0.05$ )。在基因水平, 实验组I型胶原、骨钙素的表达与对照组无统计学差异, 但是能促进碱性磷酸酶的表达( $P<0.05$ ), 同时在蛋白水平也刺激了人牙髓细胞碱性磷酸酶的分泌( $P<0.05$ )。结论: 100%融合培养联合血清饥饿法使更多的人牙髓细胞周期同步于G0/G1期, 能更好地促进人牙髓细胞矿化。

**[关键词]** 牙髓细胞; 血清饥饿; 融合培养; 细胞周期

**[中图分类号]** R781.3

**[文献标志码]** A

DOI: 10.19439/j.sjos.2019.01.001

**Effect of serum starvation and culture to confluence on cell cycle synchronization and mineralization of human dental pulp cells** PENG Wei-wei, DAI Zhao-wei, CAO Ying, HAN Jun-li, ZHU Ya-qin. (Department of General Dentistry, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology and Shanghai Research Institute of Stomatology. Shanghai 200011, China)

**[Abstract] PURPOSE:** To compare the effect of serum starvation and culture to confluence on cell cycle synchronization and mineralization of human dental pulp cells (hDPCs). **METHODS:** hDPCs were cultured to 80% and 100% confluence respectively, and then cultured for 24, 48 and 72 hours by culture medium containing 0.5% fetal bovine serum (FBS). Cell cycle of hDPCs were identified by flow cytometry. Then hDPCs cultured by serum starvation for 48h after culturing to 100% confluence were used as the experimental group, and hDPCs cultured to 80% confluence were used as the control group. The expression of alkaline phosphatase(ALP), collagen type I (COL-I) and osteocalcin(OCN) was detected at gene level; activity of ALPase was detected at protein level. SPSS 13.0 software was used for statistical analysis. **RESULTS:** When hDPCs were cultured by serum starvation for 48h after culturing to 100% confluence, cells at G0/G1 stage were more than culture to 100% confluence and serum starvation group ( $P<0.05$ ). At the genetic level, the expression of COL-I and OC in the experimental group was not statistically different from that of the control group, but can promote the expression of ALP ( $P<0.05$ ), and stimulate the secretion of hDPCs at protein level at the same time ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Culture to confluence combined serum starvation can synchronize more hDPCs at G0/G1 stage and

**[收稿日期]** 2018-09-07; **[修回日期]** 2018-11-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81700949);  
高等学校博士学科点专项科研基金(20130073110013);  
上海高校高峰高原学科建设项目;

上海市口腔医学研究所院级基金(2017-08)

**[作者简介]** 彭伟伟(1984-), 女, 硕士, 住院医师, E-mail: pww1027@163.com

**[通信作者]** 朱亚琴, E-mail: zyq1590@163.com;

韩俊力, E-mail: hanjunli@sina.com。\* 共同通信作者

©2019年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

promote mineralization of hDPCs.

[Key words] Dental pulp cell; Serum starvation; Culture to confluence; Cell cycle

Shanghai J Stomatol, 2019, 28(1):1-5.

人牙髓细胞由于具有多分化潜能,得到国内外学者的青睐<sup>[1-3]</sup>。许多研究都使用化学物质或生物类制剂进行诱导,以观察人牙髓细胞生物学行为的改变<sup>[4-5]</sup>。以牙髓细胞作为种子细胞,可在体内实验中得到牙髓样结构的组织,为研发盖髓剂或牙髓再生提供了实验依据<sup>[6-8]</sup>。为得到更为客观可靠的实验结果,大多数实验均要求在诱导前保持细胞周期同步化,达到较为一致的实验条件,以分析外界因素对细胞生物学行为的影响和机制<sup>[9]</sup>。

较为经典的细胞周期同步化的方法有血清饥饿法、融合培养法、药物抑制法等<sup>[10-11]</sup>。目前,对人牙髓细胞周期同步化研究的实验报道不多。刘斐等<sup>[11]</sup>的研究表明,人牙髓细胞通过血清饥饿 48 h,能得到较好的细胞周期同步化效果。本实验采用血清饥饿法、融合培养法及两者联合,比较人牙髓细胞周期同步化的效果,同时检测细胞周期同步化后牙髓细胞的矿化活性,旨在寻找一种更为有效地获得人牙髓细胞周期同步化的方法,为牙髓细胞生物学活性的研究提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

CO<sub>2</sub> 饱和湿度细胞培养箱(Heraeus,德国);超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);Axioshop 2 Plus 摄影显微镜(Zelss,德国);细胞培养专用圆形盖玻片(Thermanox Coverslip, NUNC, 美国);培养皿及培养板(Greiner,德国);DMEM 培养基、胰蛋白酶(0.25% Trypsin-EDTA)、胎牛血清(Gibco,美国);青霉素和链霉素(Penicillin-Streptomycin, Gibco, 美国);流式细胞仪(Olympus, 日本)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 本实验经上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会批准[HKDL(2017)226],于上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔外科门诊收集 18~28 岁第三磨牙或因正畸需要拔除的正常恒牙,已获得每位患者的知情同意[沪九院科伦审(2017)109]。使用无菌高速涡轮金刚砂车针,沿釉-牙骨质界切割一圈。劈开牙冠后,暴露髓腔,轻柔取出牙髓。剪去根尖 1/3 处的组织,立即置

于磷酸盐缓冲液(PBS)中浸泡。采用改良组织块法<sup>[12]</sup>体外培养原代人牙髓细胞,细胞游出后每 3 天换液 1 次,待细胞达到 80% 融合,即进行传代培养。将第 3 代至第 5 代 hDPCs 用于实验。

**1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期** 将 hDPCs 以  $2.5 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种于 6 孔板上,每孔培养液 2 mL。培养至 80% 或 100% 融合后,弃去原培养液, PBS 冲洗 2 次,加入含 0.5% FBS 的 DMEM 培养液继续培养。对照组:达到 80% 融合的 hDPCs;血清饥饿组:达到 80% 融合后加入 0.5% FBS 的 DMEM 培养液,分别培养 24、48 及 72 h;融合培养组:达到 100% 融合;100% 融合培养+血清饥饿组(下称联合组):达到 100% 融合后,加入 0.5% FBS 的 DMEM 培养液,分别培养 24、48 及 72 h。每组均设 3 个复孔。将每组细胞经胰蛋白酶消化后收集于 5 mL 离心管中,用 PBS 溶液洗涤 3 次,最后 1 次弃上清液,加入经 4℃ 预冷的 70% 乙醇固定备用。上机检测前再次离心,弃固定液,用预冷的 PBS 再次洗涤,调整密度为  $1 \times 10^6$  个细胞/mL。在细胞悬液中加入 5% 的碘化丙啶(propidium, PI), 4℃ 孵育 30 min 后,上机检测细胞周期。

**1.2.3 实时定量 PCR 检测碱性磷酸酶(ALPase)、骨钙素(OCN)和 I 型胶原(COL-I)的表达** 选择 100% 融合培养后饥饿 48 h 的人牙髓细胞作为实验组,80% 融合培养的细胞作为对照组,进行 ALP 基因表达检测。将处于对数生长期的第 3 代人牙髓细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后,吹打混匀成单细胞悬液,调整细胞密度至  $2 \times 10^5$  个细胞/mL,接种至 6 孔板中。每个培养皿中加 1 mL 细胞悬液,再加 1 mL 完全培养基,于培养箱中培养。每组设 3 个复孔。对照组和实验组的细胞通过 TRIzol 一步法提取总 RNA,根据检测的 RNA 浓度,确定 RNA 在反转录体系中的量;再按照反转录试剂盒的说明,依次加入试剂,进行反转录。采用 Takara 公司的 SYBR Green PCR kit 进行 ALP、OCN、COL-I 等矿化相关基因的实时荧光定量 PCR 反应,结果参照内参基因 GAPDH 的表达量计算,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的计算方法分析结果<sup>[13]</sup>。

**1.2.4 ALP 半定量检测** 将处于对数生长期的第 3

代人牙髓细胞用 0.25%胰蛋白酶消化后,吹打混匀成单细胞悬液,调整细胞密度至  $2 \times 10^4$  个细胞/mL,接种至 24 孔板中。每孔 1 mL,每组设 3 个复孔,置培养箱中培养。将细胞弃上清液,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,最后 1 次吸干净。每孔加入裂解液 300  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 4~6 h 后震荡 30 min。将 100  $\mu$ L 上清液移入 96 孔板后,每孔再加入 100  $\mu$ L 底物 (对硝苯脂二钠盐),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,0.2 N NaOH 50  $\mu$ L 终止反应,405 nm 波长处测定吸光度(A)值。另以 BCA 法测定每孔蛋白浓度。计算公式:ALP 活性=各孔 A 值/对应孔蛋白总量,每孔测 3 次,取均值。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件包对对照组及各实验组的 G0/G1 期数据以及 ALP 半定量结果进行单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞仪分析结果

如表 1 所示,血清饥饿 24 h 后的 G0/G1 期细胞比对照组低,但无显著差异。血清饥饿 48 h、100%融合及联合组的 G0/G1 期细胞显著高于对照组,而血清饥饿 72 h 后的 G0/G1 期细胞却显著低于对照组。联合组饥饿 24 h 与 100%融合组无显著差异,而联合组饥饿 48 h 及 72 h 的 G0/G1 期细胞高于 100%融合培养组,有统计学差异,48 h 与 72 h 组无显著差异。

### 2.2 实时荧光定量 PCR 结果

对于同一基因,将对照组的基因表达水平设定为 1,再与实验组(100%融合后经血清饥饿 48 h 后)的基因表达水平进行比较。结果显示,与对照组相比,实验组 hDPCs 矿化相关基因 COL-1、OCN 的表达无显著提高( $P > 0.05$ ),但 ALP 的表达增加 11 倍( $P < 0.05$ ,图 1)。

### 2.3 ALP 半定量检测结果

表 1 不同组别细胞周期分析 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Cell cycle analysis of different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

细胞周期	对照组	血清饥饿处理			100%融合培养	100%融合培养联合血清饥饿		
		24 h	48 h	72 h		24 h	48 h	72 h
G0/G1	69.51 $\pm$ 0.37	67.99 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	81.20 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	57.13 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>	78.23 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	79.10 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	88.48 $\pm$ 0.65 <sup>abc</sup>	88.09 $\pm$ 1.74 <sup>abc</sup>
S	13.00 $\pm$ 1.59	12.83 $\pm$ 1.65	1.32 $\pm$ 0.19	20.71 $\pm$ 1.04	9.80 $\pm$ 0.57	7.74 $\pm$ 1.73	0.67 $\pm$ 0.57	0.53 $\pm$ 0.92
G2/M	17.49 $\pm$ 1.21	19.18 $\pm$ 1.09	17.48 $\pm$ 0.52	22.23 $\pm$ 1.44	11.92 $\pm$ 0.86	13.16 $\pm$ 1.56	10.85 $\pm$ 0.80	11.86 $\pm$ 1.82

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 100%融合培养组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与血清饥饿处理 48 h 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$

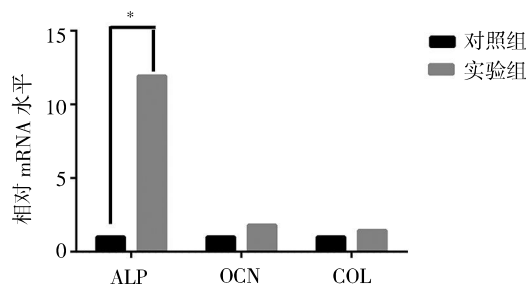


图 1 相关矿化基因表达 ( $*P < 0.05$ )

Figure 1 Expression of mineralization genes ( $*P < 0.05$ )

实验结果表明,100%融合培养联合血清饥饿 48 h 后,hDPCs 的 ALP 表达较对照组增加,并具有统计学意义(图 2)。

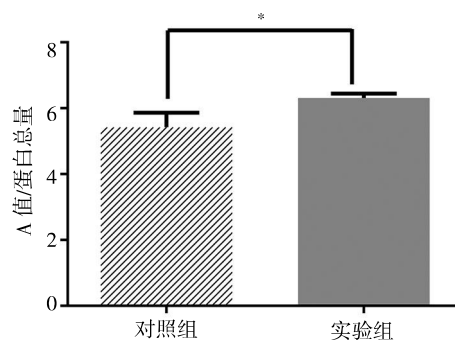


图 2 实验组及对照组的 ALP 半定量表达 ( $*P < 0.05$ )

Figure 2 Semi-quantitative expression of ALP in experimental group and control group ( $*P < 0.05$ )

## 3 讨论

细胞周期同步化对细胞生物学的研究具有重大意义。在观察外界因素对细胞周期的影响和机制的研究中,常常要求能够获得大量处于 G0/G1 期的细胞<sup>[4]</sup>。在一个增殖的细胞群中,并非所有的细胞增殖都是同步的,如细胞停止在 G1 期,则称为 G0 期细胞或休止细胞。G0 期细胞受到某种适宜刺激后仍能进入细胞周期,继续进行有丝分裂。血清饥饿和融合培养均能简单有效地将细胞同步于 G0/G1 期,但两者的机制有所不同。血清中含有丰富的营养成分及

促进细胞增殖并维持细胞生长的生物活性因子,因此使用添加了血清的培养基,可以缩短培养细胞所需要的时间;同时,血清的缓冲能力可以帮助细胞抵抗外界因素的干扰<sup>[5]</sup>。血清饥饿法因使细胞缺乏足够的营养成分,导致细胞快速退出细胞周期而处于休止状态。融合培养则通过细胞增殖数量增多,造成细胞相互接触而导致细胞运动停止,继而使得细胞进入休止期<sup>[6]</sup>。

在对人牙髓细胞周期同步化的研究中,有学者指出,用5 mL/L(0.5%)的血清培养人牙髓细胞48 h,能够获得大量处于G0/G1期的细胞<sup>[11]</sup>。因此,本实验所选择的血清浓度为0.5%。本实验发现,将细胞100%融合后再饥饿48 h,能获得比血清饥饿48 h及80%融合培养更多的G0/G1细胞。在血清饥饿中,饥饿时间也是影响细胞周期同步化的一个关键因素。有研究报道,饥饿3 d后,细胞的G0/G1期比例下降,同时伴随细胞活性下降以及大量的DNA碎片。所以,一般饥饿时间不宜超过3 d<sup>[17]</sup>。也有文献<sup>[18]</sup>指出,饥饿时间在2~5 d为宜。饥饿时间也不宜过短,小于24 h时,有的细胞尚未能达到G1期占绝大多数的状态,可能与血清饥饿前细胞处于各周期的比例不一致有关<sup>[6]</sup>。本实验发现,血清饥饿72 h后,G0/G1期细胞较80%融合培养组显著减少;但联合培养组饥饿72 h后,G0/G1期细胞相比同组48 h并无显著差异,表明hDPCs在联合饥饿48 h后再延长24 h,对G0/G1期的比例无太大影响。但因本实验饥饿时间最长为72 h,缺乏更长饥饿时间的数据,因此,延长饥饿时间对联合组细胞的细胞周期是否具有更大的影响,有待进一步研究。

本实验还检测了融合培养联合血清饥饿对人牙髓细胞矿化活性的影响。牙髓细胞作为一种干细胞,一个重要的特性为向成牙本质细胞分化。牙本质有机物中,胶原蛋白约占18%,主要为COL-I。由成牙本质细胞分泌和合成的COL-I,为无机物沉积提供了网状结构框架。OC是晚期成骨的标志,在硬组织再生中起着重要作用,主要由成熟的成骨细胞、成牙本质细胞和成牙骨质细胞分泌<sup>[13]</sup>。本实验中,虽然联合组COL-I和OC的表达均多于对照组,但无显著性差异。另外,联合组能够在基因水平上促进碱性磷酸酶的表达并分泌更多的碱性磷酸酶。碱性磷酸酶广泛分布于体内几乎所有的器官,是一类较为肯定的参与和促进牙髓细胞矿化的酶,在牙髓细胞

诱导分化和基质矿化过程中起着重要作用,被认为是牙髓细胞向成牙本质细胞分化和牙本质形成的早期标志<sup>[19]</sup>。因此可以认为,当人牙髓细胞被大量同步于G0/G1期后,牙髓细胞能够促进早期矿化的形成。尽管联合组的细胞在达到100%融合后会产生接触抑制,但是饥饿48 h后,其矿化方面的活性并未受到影响,反而显著上调了细胞碱性磷酸酶的表达。

综上所述,在人牙髓细胞达到100%融合后再进行血清饥饿48 h,能够获得大量处于休止期的G0/G1期细胞,这些细胞能较好地促进人牙髓细胞的矿化活性,为研究和分析牙髓细胞的生物活性及机制提供了重要的实验基础。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:彭伟伟负责资料收集、实验实施和论文撰写;戴兆威和曹颖负责处理实验结果并绘制图表;韩俊力、朱亚琴负责实验设计和指导。

#### [参考文献]

- [1] Jiang L, Peng WW, Li LF, et al. Proliferation and multilineage potential of CXCR4-positive human dental pulp cells *in vitro* [J]. *J Endod*, 2012, 38(5): 642-647.
- [2] Tu MC, Ho CC, Hsu TT, et al. Mineral trioxide aggregate with mussel-inspired surface nanolayers for stimulating odontogenic differentiation of dental pulp cells[J]. *J Endod*, 2018, 44(6): 963-970.
- [3] Yokose S, Naka T. Lymphocyte enhancer-binding factor 1: an essential factor in odontoblastic differentiation of dental pulp cells enzymatically isolated from rat incisors [J]. *J Bone Miner Metab*, 2010, 28(6): 650-658.
- [4] Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells [J]. *J Endod*, 2009, 35(11): 1529-1535.
- [5] Trubiani O, Caputi S, Di ID, et al. The cytotoxic effects of resin-based sealers on dental pulp stem cells [J]. *Int Endod J*, 2010, 43(8): 646-653.
- [6] Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures [J]. *J Endod*, 2010, 36(6): 1042-1047.
- [7] Li S, Lin C, Zhang J, et al. Quaking promotes the odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 7292-7304.
- [8] Paim A, Braghiroli DI, NSM C, et al. Human dental pulp stem cell adhesion and detachment in polycaprolactone electrospun scaffolds under direct perfusion [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(5): e6754.
- [9] 覃乙芯, 吴卓敏, 徐茜, 等. 血清饥饿对原代人脐静脉内皮细胞周期同步化的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2016, 36(8): 1140-1143.

- [10] Khammanit R, Chantakru S, Kitiyanant Y, et al. Effect of serum starvation and chemical inhibitors on cell cycle synchronization of canine dermal fibroblasts [J]. *Theriogenology*, 2008, 70(1): 27-34.
- [11] 刘斐, 吴补领, 高杰, 等. 血清饥饿法对人牙髓细胞周期同步化的研究 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2011, 21(2): 67-71.
- [12] 江龙, 朱亚琴. 改良组织块法体外培养人牙周膜细胞和牙髓细胞 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18(4): 195-199.
- [13] Peng W, Liu W, Zhai W, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells [J]. *J Endod*, 2011, 37(9): 1240-1246.
- [14] 宋春娇, 吕冰洁, 张小玲, 等. 血清饥饿法用于细胞周期同步化的方法学研究 [J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22(4): 362-364.
- [15] 董关木. 细胞培养用牛血清现状与进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20(9): 697-700.
- [16] 严丽萍, 陶茂萱. 血清饥饿和接触抑制两种 G0期同步化方法效果评价 [J]. *卫生研究*, 2007, 36(3): 275-278.
- [17] De Barros FR, Goissis MD, Caetano HV, et al. Serum starvation and full confluency for cell cycle synchronization of domestic cat (*Felis catus*) foetal fibroblasts [J]. *Reprod Domest Anim*, 2010, 45(1): 38-41.
- [18] 邵晓云, 徐绍业. 血清饥饿法处理胎儿成纤维细胞周期同步化的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(1): 18-21.
- [19] 彭伟伟, 翟万银, 江龙, 等. 人牙髓细胞复合不同孔径羟基磷灰石/磷酸三钙支架材料的生物学行为 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(51): 9567-9571.

## 向 2018 年度审稿专家致谢

2018 年度,共有下列 58 名专家为《上海口腔医学》认真审稿,特提名致谢! (按姓名汉语拼音顺序排列)

Many thanks for our peer reviewers, listed below, for their time and hard work spent on review of manuscripts submitted to Shanghai Journal of Stomatology in 2018 and their excellent support of the editorial process. Sincerely congratulating our authors who have published their high quality work in Shanghai Journal of Stomatology cited by IM and MEDLINE. The future of our journal is bright and it will continue to serve as a top-notch interdisciplinary resources for clinicians involved in the care of patients with various dental disorders, and for scientists striving to elucidate the mechanisms and therapy for these diseases.

艾伟健 陈传俊 陈德敏 陈 栋 程 竑 房 兵 傅远飞 高美琴 谷志远 郭传斌 郭 伟  
何冬梅 何 悦 胡德瑜 胡勤刚 黄正蔚 翦新春 姜晓钟 金 岩 赖红昌 李 江 李秀娥  
林晓萍 邱蔚六 曲新华 石 冰 宋卫健 宋忠臣 孙 皎 孙钦峰 孙 正 台保军 唐国华  
汪 俊 王国民 王美青 王 青 王旭东 韦 曦 吴正一 杨学文 叶 玮 张 丁 张 君  
张 丽 张 萍 张 旗 张善勇 张伟杰 张志愿 赵守亮 赵玉梅 郑家伟 周昌龙 周曾同  
朱亚琴 邹多宏 邹 静