论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0778-03

# IGF-1、bFGF对人牙髓干细胞的体外诱导分化的影响

胡 静,谭颖徽,何 飞,张 萍 (第三军医大学新桥医院口腔科,重庆 400037)

**提 要:目的** 研究IGF-1、bFGF对人牙髓干细胞分化的影响。**方法** 酶消化法获得人牙髓干细胞,形态学观察,计算细胞克隆形成率;第3代牙髓干细胞,以IGF-1、bFGF细胞因子诱导,免疫组化染色和RT-PCR方法检测牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)、牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1, DMP-1)和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)的mRNA的表达。**结果** 人牙髓干细胞呈集落状生长,在体外具有一定的克隆形成能力,经细胞因子刺激后细胞表达DSP、DMP-1蛋白和DSPP的mRNA。**结论** 人牙髓组织中有呈克隆样生长的成体干细胞,IGF-1、bFGF可诱导人牙髓干细胞定向分化。

**关键词:** 胰岛素样生长因子-1(IGF-1);碱性成纤维细胞生长因子(bFGF);牙髓干细胞

**中图法分类号:** R329.41;R329.21;R341 **文献标识码:** A

# Effect of IGF-1 and bFGF on differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*

HU Jing, TAN Ying-hui, HE Fei, ZHANG Ping (Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro*. **Methods** Mono-cell suspension was separated from the human adult dental pulp with collagenase Ⅰ and dispase digestion. Colony-forming efficiency of cells was calculated. Cells were observed under an invert microscope. Dentin sialoprotein (DSP), dentin matrix protein 1 (DMP-1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) mRNA of the 3rd passage cells induced with IGF-1 and bFGF *in vitro* were detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** Clonogenic cells were obtained from dental pulp and colony-forming efficiency of cells was 2.6 – 3.5 colonies/$10^4$ cells. Human specific DSP, DMP-1 protein and DSPP mRNA expressed in colony-forming cells after 7 d of induction with IGF-1 and bFGF *in vitro*. **Conclusion** Adult stem cells might exist in human dental pulp. Dental pulp stem cells could differentiate into odontoblast under the induction of IGF-1 and bFGF.

**Key words:** insulin-like growth factor-1; basic fibroblast growth factor; dental pulp stem cells

干细胞是人体的起源细胞,具有自我复制、高度增殖和多向分化的能力。Gronthos等[1]于2000年第1次提出了牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)的概念,并在体外成功分离、培养。本实验提取DPSCs,应用胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),体外诱导刺激,检测成牙本质细胞的特异性标记物DSPP、DSP和DMP-1的表达,观察IGF-1和bFGF对人牙髓干细胞向牙本质细胞分化的影响。

**基金项目:** 全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA165)
Supported by the Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (01MA165)

**作者简介:** 胡 静(1973-),女,吉林省长春市人,硕士研究生,医师,主要从事牙组织再生方面的研究。电话:(023)68755632

**通讯作者:** 谭颖徽,电话:(023)68755632

**收稿日期:** 2005-11-22;**修回日期:** 2006-03-17

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞来源 实验牙髓细胞来源于临床上因正畸或阻生而拔除的健康牙,要求无牙体牙周疾病,患者年龄12~25岁。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基:Gibco,USA;胎牛血清:Hyclone, USA;Ⅰ型胶原酶:Sigma, USA;dispase:Roche, USA;IGF-1、bFGF:达科为公司;鼠抗人vimentin抗体:北京中山生物有限公司,兔抗人nestin多抗:武汉博士德公司;羊抗人DSP多抗:Santa Cruz,USA;鼠抗大鼠DMP-1多抗:第四军医大学高杰博士惠赠;S-P免疫组化试剂盒:北京中山生物有限公司。

1.1.3 RT-PCR试剂 DEPC水:Sigma,USA;RT-PCR试剂盒:大连宝生生物公司;琼脂糖:Sigma,USA。

### 1.2　方法

1.2.1　DPSCs 的原代培养及鉴定　　参照文献[1,2]，培养体系为含 10% 胎牛血清，100 U/ml 青霉素，100 U/ml 的链霉素的 DMEM/F12 培养基，在 37 ℃，5% $CO_2$ 饱和湿度条件下培养，待细胞接近融合时传代。细胞表型鉴定采用免疫组化 S-P 法检测细胞波形蛋白（vimentin）、巢素（nestin）；RT-PCR 鉴定Ⅰ型胶原，引物序列：正义 5′-CAAAGGCAATGCTCAAACACC-3′；反义 5′-TGCGGCACAAGGGATGACACG-3′；骨钙素（osteocalcin），引物序列：正义 5′-AGGGCAGCGAGGTAGTGAAG-3′，反义 5′-CTCCTGAAAGCCGATGTGGT-3′。

1.2.2　细胞克隆形成实验（CFU-F）原代或第 1 代人牙髓干细胞以 $1\times10^4$/孔的密度接种 6 孔板，标准条件下培养 14 d，甲醇固定 15 min，姬姆萨染液染色 20 min，流水冲净，显微镜下进行细胞克隆计数。

克隆形成率 = 形成细胞集落数/接种细胞数

1.2.3　细胞因子诱导实验　　取第 3 代牙髓干细胞，胰酶消化 10 min，细胞以 $1\times10^5$/ml 密度接种 25 $cm^2$ 塑料培养瓶，培养 1 d 细胞贴壁后，实验组加入细胞因子组成的诱导分化液：100 ng/ml 的 IGF-1 和 20 ng/ml 的 bFGF，对照组为不加任何细胞因子的干细胞培养基，诱导 7 d 。

1.2.4　免疫组化染色检测 DSP、DMP-1 的表达　　分别取上述培养 7 d 的细胞做爬片，40 g/L 多聚甲醛固定 30 min。用免疫组化 S-P 法检测细胞爬片抗 DSP、DMP-1 的表达，光镜下观察。

1.2.5　PCR 检测 DSPP 的 mRNA 表达　　参照试剂盒说明书提取细胞总 RNA，按设计人的 DSPP 引物序列：正义 5′-TAACGGTAACAACAATGGAAGTG-3′；反义 5′-TATTAACAGGCATGTACCAAAGG-3′，进行 RT-PCR 扩增。PCR 条件为：94 ℃ 预变性 2 min，94 ℃ 变性 50 s，57.2 ℃ 退火 50 s，72 ℃ 延伸 60 s，共进行 35 个循环，再于 72 ℃ 延伸 10 min，取 3 μl PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳。紫外灯观察并照相。预期产物 300 bp。

## 2　结果

### 2.1　人牙髓干细胞的生物学特征

DMEM/F12 培养胶原酶和 dispase 离散的单个牙髓干细胞接种 2 d 部分细胞贴壁生长，3 d 完全换液，弃去悬浮未贴壁细胞，倒置显微镜下观察贴壁细胞大多为长梭形的成纤维细胞，其中少数几个细胞增殖迅速，培养 14 d 左右形成细胞克隆，呈巢式或集落生长。克隆状生长的细胞间排列紧密，界限不清。（图 1，2）免疫组化检测显示 vimentin、nestin 染色阳性，阳性细胞呈现细胞质棕黄色着染（图 3，4）。RT-PCR 检测显示Ⅰ型胶原、osteocalcin 阳性表达，DSPP 阴性表达。

### 2.2　细胞克隆形成率

人牙髓干细胞培养 14 d 时的细胞克隆形成率：5 ~ 32 个/$10^4$ 个细胞。

### 2.3　诱导后细胞表达成牙本质细胞特异性标志物

IGF-1 和 bFGF 联合作用 7 d，细胞经 DSP、DMP-1 免疫组化染色，阳性细胞质呈棕黄色，而对照组细胞免疫组化染色为阴性（图 5，6）。

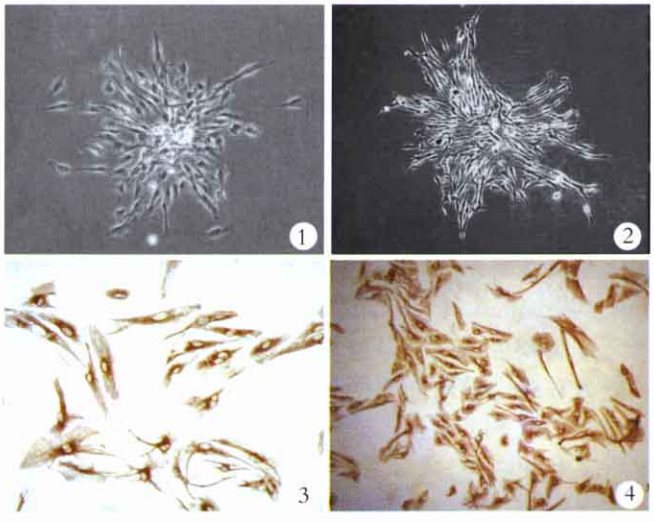


**图 1**　培养 3 d 牙髓来源细胞呈集落状生长　（倒置显微镜 ×200）
**图 2**　克隆状生长的一株牙髓干细胞　（倒置显微镜 ×100）
**图 3**　波形蛋白染色阳性细胞　（S-P ×200）
**图 4**　巢素染色阳性细胞　（S-P ×100）

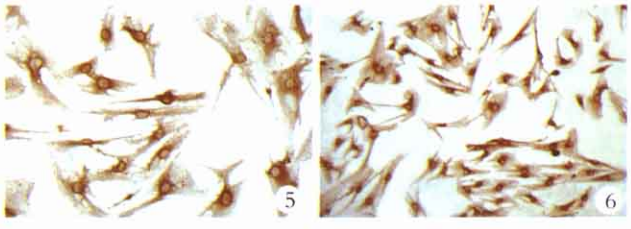
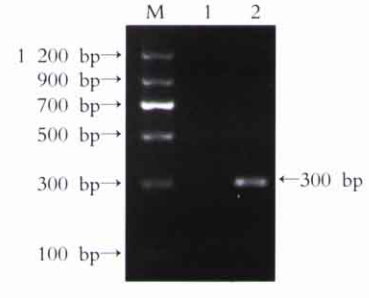


**图 5**　经 IGF-1 和 b FGF 联合诱导的牙髓干细胞表达人 DSP（S-P ×200）
**图 6**　经 IGF-1 和 bFGF 联合诱导的牙髓干细胞表达人 DMP-1　（S-P ×100）

### 2.4　RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

IGF-1 和 bFGF 联合诱导 7 d 后，从细胞中提取总 RNA 进行 RT-PCR，产物经电泳分析，在 300 bp 处有一特异性扩增条带，与预期产物大小一致，细胞经诱导后有人成牙本质细胞分化的特异性标志物 DSPP mRNA 的表达，而对照组未出现特异性扩增条带（图 7）。




M：标准；1：对照组；2：IGF-1 + bFGF 诱导组

**图 7**　RT-PCR 法检测 IGF-1、bFGF 诱导牙髓干细胞 7 d 后 DSPP mRNA 表达量变化

## 3 讨论

牙齿出生后若受到轻度刺激可进行牙本质的再生和修复,这一过程是由成牙本质细胞参与形成的。而成牙本质细胞为终末细胞,一旦分化不能再分裂,因而推测这种局部修复能力是由能分化为成牙本质细胞的祖细胞群落维系的,并且这类祖细胞群落就存在于牙髓中。Gronthos 等[1]利用酶消化法从人类健康的第三磨牙牙髓获得单细胞悬液,培养得到具有形成细胞克隆能力和高度增殖能力的细胞,将其命名为牙髓干细胞(DPSCs),Shi 等[3]将牙髓干细胞与骨髓基质干细胞进行了对比研究,进一步对牙髓干细胞的生物学特性进行了阐明。牙髓干细胞的发现及概念的确立有助于我们从细胞水平上认识牙齿发育和再生修复机制,并使人们认识到利用组织工程实现牙齿再造的可能性。本实验参考 Gronthos 研究小组的分离培养干细胞的方法,细胞连续培养 10 d 左右,细胞可快速增殖,形成细胞克隆,计算细胞克隆形成率为 5 ~ 32 个克隆/$10^4$个细胞,说明细胞有快速增殖能力。集落状生长的细胞排列紧密,形似鸟巢,界限不清,胞体小,核大,有一个或几个核仁,具有快速增长的特性。目前常用于牙髓干细胞鉴定的细胞标记物主要包括:波形蛋白、Ⅰ型胶原、骨钙素、巢素蛋白、胶质纤维酸性蛋白、牙本质涎磷蛋白、S-100 等[1,4]。本实验室已成功进行人牙髓干细胞的培养,通过细胞免疫表型检测,培养细胞表达波形蛋白、Ⅰ型胶原、骨钙素、巢素蛋白、胶质纤维酸性蛋白;细胞诱导分化实验显示具有成脂、成肌诱导分化的能力,证实所培养细胞表型符合干细胞的特征,为牙髓干细胞[2]。在本实验中我们采用免疫组化方法检测细胞波形蛋白、巢素蛋白表达阳性;RT-PCR 检测到Ⅰ型胶原和骨钙素 mRNA 的阳性表达、无牙本质涎磷蛋白表达,细胞表型符合牙髓干细胞的特征。

IGF-1、bFGF 是促细胞生长作用很强的多肽因子,又是重要的致有丝分裂原,在牙齿发育中对细胞的增殖和分化起重要作用[5,6],因而日益受到人们的重视。由于成牙本质细胞很难进行体外培养,学者们主要利用牙乳头细胞或牙髓细胞的特性来研究成牙本质细胞的功能。Onishi 等[7]研究发现,IGF-1 可能在牙髓细胞增殖和分化过程中起重要作用。Martin 等[8]的体外组织诱导培养实验显示,aFGF 和 bFGF 均可促进体外培养的牙乳头组织的表层细胞发生极化。联合应用 IGF-1 和 bFGF 可引起表层细胞的极化和向成牙本质细胞的功能性分化,并分泌细胞外基质;而 aFGF 和 IGF-1 的同时应用只能使细胞突起伸长,基质沉积较少见。aFGF 或 bFGF 与 TGF-β1 的联合应用可使牙乳头表层细胞发生极化,但基质的沉积仅限于少数样本。因此认为,aFGF 或 bFGF 单独应用不能诱导牙乳头细胞发生向成牙本质细胞的功能性分化,而 IGF-1 与 bFGF 有协同作用,联合应用可增强彼此的诱导功能,从而引起牙乳头细胞发生向成牙本质细胞的功能性分化。本实验运用 IGF-1、bFGF 刺激体外培养的第 3 代牙髓干细胞 7d,RT-PCR 检测结果实验组的细胞中存在 DSPP 的 mRNA 的表达,免疫组化结果也显示细胞表达 DSP 和 DMP-1。牙本质涎磷蛋白是牙本质磷蛋白和牙本质涎蛋白的基因复合体,属于牙本质特异性基质非胶原蛋白,目前认为它是成牙本质细胞的特异性标志物[9]。DMP-1 是一种矿化组织特异性蛋白,在骨组织、牙本质和牙骨质中表达并由相应的生成细胞合成[10]。IGF-1、bFGF 联合作用引发 DSP、DMP-1 的蛋白和 DSPP 基因的表达,可能启动干细胞内固有的调控表达。

本实验应用 IGF-1、bFGF 刺激体外培养的牙髓干细胞,观察到 DSP、DMP-1 蛋白和 DSPP 基因的表达变化,表明细胞因子对牙髓干细胞的诱导分化的作用,同时证明了所获得的细胞具有分化能力。

**参考文献:**


[1] 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.

[2] 何 飞, 谭颖徽, 张 纲. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(1): 75 - 78.

[3] SHI S, GRONTHOS S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(4): 696 - 704.

[4] 王亦菁, 金 岩, 史俊南, 等. 人牙髓干细胞培养及其细胞表型的分析研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2005, 21 (1): 23 - 25.

[5] CAVIEDES-BUCHELI J, MONOZ H R, RODRIGUEZ C E, *et al*. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human pulp tissue [J]. J Endod, 2004, 30(11): 767 - 769.

[6] WERNER H, KATZ J. The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology[J]. J Dent Res, 2004, 83(11): 832 - 836.

[7] ONISHI T, KINOSHITA S, SHINTANI S, *et al*. Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44 (4): 361 - 371.

[8] MARTIN A, UNDA F J, BEGUE-KIRN C, *et al*. Effects of aFGF, bFGF, TGFbeta1 and IGF-I on odontoblast differentiation *in vitro*[J]. Eur J Oral Sci, 1998, 106(Suppl 1): 117 - 121.

[9] MODINO S A, SHARPE P T. Tissue engineering of teeth using adult stem cells[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(2): 255 - 258.

[10] GOLDBERG M, SEPTIER D, RAPOPORT O, *et al*. Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, excerpts divergent effects on enamel and dentin formation[J]. Calcif Tissue Int, 2005, 77(5): 297 - 310.


(编辑 王 红)