文章编号:1000-5404(2006)09-0949-03

论著

人牙髓干细胞体外二维和三维培养的实验研究

侯延华[1],谭颖徽[1],姚韶武[2],何 飞[1],张 纲[1],王建华[1] ([1]第三军医大学新桥医院口腔科,重庆 400037;[2]洛阳市第三人民医院口腔科,洛阳 471002)

提 要:目的 分离人牙髓干细胞并在体外进行二维和三维培养。**方法** 从健康成人拔除的第二前磨牙获得牙髓,酶消化法分离获得牙髓干细胞,并进行鉴定。体外对牙髓干细胞在二维和三维空间里进行培养,并比较其增殖效率。**结果** 人牙髓干细胞在体外呈克隆样生长,诱导条件下可向肌细胞和成牙本质细胞方向分化。在二维空间里培养,细胞密度提高了4.12倍,而在三维空间里培养,细胞密度提高了11.06倍。培养后细胞生物学特性未发生改变。**结论** 成功地从人第二前磨牙中分离到了牙髓干细胞;三维培养是扩增牙髓干细胞的有效方法。

关键词:牙髓干细胞;三维培养
中图法分类号:R322.41;R329-33;R78 **文献标识码**:A

2D and 3D culture of human dental pulp stem cells

HOU Yan-hua[1], TAN Ying-hui[1], YAO Shao-wu[2], HE Fei[1], ZHANG Gang[1], WANG Jian-hua[1] ([1]Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Stomatology, The Third People's Hospital of Luoyang, Luoyang 471002, China)

Abstract: **Objective** To isolate human dental pulp stem cells and cultivate them in 2D and 3D. **Methods** Dental pulps were separated from the second premolars and digested by collagenase type Ⅰ and dispase. Dental pulp stem cells were obtained and identified. The proliferation of dental pulp stem cells cultivated in 2D and 3D was compared. **Results** There were clonogenic cells in human dental pulp. Some dental pulp stem cells could be differentiated into myocytes and odontoblasts. The cell density was increased to 4.12 times of the primary density in 2D culture and 11.06 times in 3D culture. After 3D culture, the biological properties of dental pulp stem cells remained. **Conclusion** Human dental pulp stem cells were successfully isolated and cultivated from the second premolars. 3D culture is a suitable way to expand dental pulp stem cells.

Key words: dental pulp stem cells; 3D culture

牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)的发现[1],为牙髓损伤及修复机制的研究提供了一个新的平台。作为牙齿组织工程学的种子细胞,牙髓干细胞体外培养费时、缓慢,占用空间较大,容易污染,制约了牙齿组织工程学的发展。近年发展起来的旋转细胞培养系统(rotary cell culture system)和微载体(microcarrier)相结合的三维培养方法,已广泛地应用于贴壁细胞的培养和扩增。本实验采用该方法,从人第二前磨牙获取DPSCs进行体外大规模扩增,研究三维培养的可行性和价值。

1 材料与方法

1.1 细胞来源、主要试剂和仪器

实验牙髓细胞来源于临床上因正畸需要而完整拔除的第二前磨牙(经患者许可),要求牙齿健康,无牙体牙周疾病,患者年龄15~25岁。

鼠抗人vimentin、CD44、desmin抗体(北京中山生物有限公司),羊抗人Dsp抗体(Santa Cruz,USA),PTC-2000 PCR扩增仪(Gene, USA),凝胶成像分析系统(Gel Dco 2000, USA),RCCS(Synthecon, USA), Cytodex3 (Amersham, Sweden)。

1.2 人DPSCs的分离、培养和鉴定

参考并改进Gronthos等[1]的方法从第二前磨牙提取牙髓,用酶消化法获取牙髓细胞,进行原代培养并常规传代,培养基为DMEM/F12(含15% FBS)。第1代细胞测定细胞克隆形成

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA165)
Supported by the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA ("Tenth Five-Year Plan", 01MA165)
作者简介:侯延华(1971-),男,河南省汝州市人,硕士研究生,副主任医师,主要从事牙齿组织工程学方面的研究。电话:13594130670, E-maill:houyanhua868@sina.com
通讯作者:谭颖徽,电话:(023)68755632
收稿日期:2005-09-30;**修回日期**:2005-12-02

率(colony forming unit-fibroblast, CFU-F),改良 Gomori 钙钴法碱性磷酸酶(ALP)染色,取生长良好的 DPSCs 做细胞爬片,按 S-P 试剂盒说明进行抗 vimentin、CD44、desmin、Dsp 免疫细胞化学染色,RT-PCR 检测 nestin、osteocalcin 的表达。参考何飞等[2]的方法,对第 3 代 DPSCs 进行肌细胞和成牙本质分化诱导。

1.3 Cytodex3 的预处理

称取 0.25 g Cytodex3,浸泡于无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液(50~100 ml/g Cytodex3)内过夜;倒弃上清,浸泡于 70% 乙醇(70~100 ml/g Cytodex3)过夜;倒弃上清,用无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液(50 ml/g Cytodex3)冲洗 3 次,DMEM/F12 冲洗 1 次,再浸泡 DMEM/F12 培养基,置于 4 ℃冰箱备用。

1.4 RCCS 使用前的处理

使用 RCCS 中 50 ml 的 HARV 进行培养。细胞接种前,将容器用双蒸水漂洗并浸泡过夜,100% 乙醇浸泡过夜,双蒸水浸泡过夜,高压灭菌备用。

1.5 人 DPSCs 的三维培养

将处理好的 0.25 g Cytodex3 微载体与 50 ml 含 1×10^5/ml DPSCs(第 4 代)的新鲜 DMEM/F12(含 15% FBS)混合均匀,装入经高压灭菌的 HARV 中,此时,培养基充满整个容器,无气泡,调整转速,使微载体不与器壁碰撞,不在中心聚集。整个装置放入 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中。常规换液。

1.6 扫描电镜观察

分别于培养的第 3、9 天,从 HARV 中取 0.5 ml 微载体细胞培养样品,用 0.01% PBS 清洗 3 次,加入 2% 戊二醛固定 0.5 h,1% 锇酸固定 0.5 h,随后用乙醇梯度脱水,再用乙酸异戊酯置换 4 h 以上,CO_2 临界干燥器干燥好,真空喷溅铂金离子,扫描电镜观察细胞生长及分布情况。

1.7 细胞生长曲线的测定

二维培养:第 4 代 DPSCs 以 1×10^5/ml 接种于 24 孔板中,每孔 1 ml,常规换液。培养基为 DMEM/F12(含 15% FBS)。每天将 3 孔细胞消化收集,台盼蓝染色,用血细胞计数板计数活细胞数,取其平均数。

三维培养:每天在旋转状态下取样 0.3 ml。其中 0.1 ml 用于细胞计数,样品沉淀,弃上清,沉淀中加入等量 0.1% 结晶紫(0.1 mol/L 柠檬酸)溶液,置 37 ℃,30 min 后反复吹打,计数细胞核,即为活细胞数。以时间为横轴,平均细胞数为纵轴描绘细胞生长曲线。

1.8 人 DPSCs 三维培养后细胞免疫表型检测

人 DPSCs 经 RCCS 培养后,沉淀 Cytodex3,0.25% 胰酶消化收集细胞,并作细胞爬片,按试剂盒说明,免疫细胞化学 S-P 法行抗 vimentin、CD44、desmin、Dsp 染色。

1.9 统计学处理

细胞计数用 SPSS 10.0 统计软件进行双因素方差分析。

2 结果

2.1 人 DPSCs 的分离、培养及鉴定

酶消化法原代培养的 DPSCs,48 h 后呈克隆样生长,CFU-F 为 41 个克隆/10^4 细胞,碱性磷酸酶染色阳性,免疫细胞化学染色及 RT-PCR 检测,显示细胞有 vimentin、CD44、nestin、osteocalcin 的表达,无 desmin、Dsp 的表达。

DPSCs 经成肌分化诱导,部分细胞胞体明显增大,约 23 d 左右,有粗杆状的肌管样细胞形成,经免疫组化检测有 desmin 的表达。矿化液连续培养 26 d,DPSCs 呈复层生长,形成细胞结节,并钙化,茜素红染色阳性,抗 Dsp 染色阳性。

2.2 细胞在微载体 Cytodex3 表面贴附生长情况

接种后 24 h,细胞大部分贴附微载体表面,呈半球形,此后细胞开始伸展,变为不规则扁平状,伸出伪足,紧贴于微载体表面。3 d 后,细胞生长加快,并出现细胞间连接,至第 9 天,细胞已长满微载体表面(图 1)。

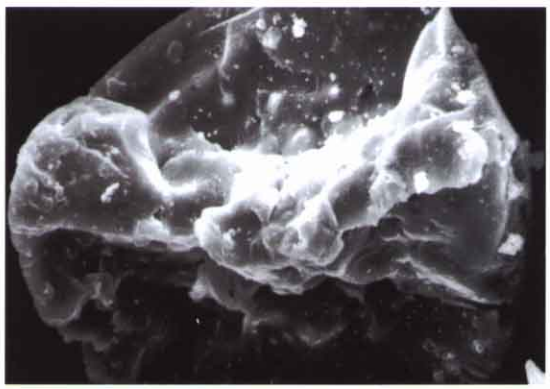


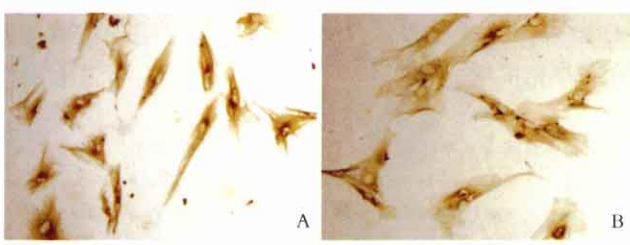
图 1 培养第 9 天,DPSCs 在微载体表面的生长情况 (扫描电镜×600)

2.3 细胞计数

根据每天细胞计数结果,绘制二维及三维培养的细胞生长曲线图。在二维培养情况下,细胞对数生长期为 6 d,活细胞数持续增多,至第 8 天达到峰值,细胞密度为 4.12×10^5/ml。在三维培养下,细胞扩增速度明显加快,至第 8 天时达到峰值,细胞密度为 11.06×10^5/ml。统计学分析结果表明,两者之间存在显著差异($P<0.05$)。

2.4 人 DPSCs 三维培养后细胞生物学特性检测

经 RCCS 培养后,免疫细胞化学染色,显示细胞有 vimentin(图 2A)、CD44(图 2B)的表达,无 desmin、Dsp 的表达。与培养前一致。



A: vimentin; B: CD44

图 2 DPSCs 免疫组化 (S-P×100)

3 讨论

牙髓干细胞作为成体干细胞中较年轻的一员,于2000年首次由Gronthos等[1]提出,其后,许多学者对其特性、定位、体外扩增等进行了深入的研究。在此基础上,2002年Young等[3]利用组织工程学的方法,首次构建形成了包括牙本质、成牙本质细胞、髓室、Hertwig's根鞘、成牙骨质细胞和釉质器官的牙齿结构。至今,牙髓干细胞的研究方兴未艾。

本实验参考了Gronthos等[1]的方法并作了改进,从第二前磨牙分离、培养DPSCs。DPSCs在体外呈克隆样生长,具有间充质未分化细胞、神经嵴来源细胞的表型特点,经诱导分化,分别形成了肌管样细胞和成牙本质样细胞,并表达了各自的组织特异性基因/蛋白desmin和Dsp,说明DPSCs具有成体干细胞共有的可塑性。结果与国内外文献报道相似[4-6]。

1967年,Van开发了适合贴壁细胞生长的微载体,它兼有悬浮培养及贴壁培养的优点,通常1 g微载体可提供3 000 cm^2的表面积,从而提高了生产率。目前已广泛应用于贴壁细胞的大规模培养[7]。

微重力组织工程(microgravity tissue engineering)是近年来由美国空间生物技术研究人员开创的一个独特研究领域,其核心技术是建立动物细胞的三维培养体系,具体研究工作主要是利用转壁式生物反应器(rotating wall vessel bioreactor,RWVB)形成的模拟微重力(simulated microgravity)环境来进行。RCCS又称转壁式生物反应器。利用RCCS进行动物细胞三维培养时,由于旋转过程中正常的重力向量持续随机化,使细胞处于一种模拟自由落体状态,在一定程度上类似于微重力环境,因此称之为模拟微重力。

本实验中,利用微载体在RCCS中对牙髓干细胞进行培养,调节反应器的转速,使微载体、培养基、细胞连同器壁作同步匀速转动,不致相互碰撞。在这样的环境里,细胞克服重力影响,易于聚集,有利于细胞间的接触和细胞外基质的分泌,促进了细胞的增殖[8]。本研究中,当细胞数量达到峰值时,RCCS中细胞密度为11.06×10^5个/ml,而普通二维培养为4.12×10^5个/ml,二者有显著差异。

除此之外,RCCS还有以下优点:①低剪切力:几乎没有破坏性剪切力,能够促进细胞与细胞间的相互作用,有利于形成三维细胞团;②不同大小的颗粒可以共同培养;③利于物质交换,可以得到高密度的细胞和组织培养物;④有助于细胞的分化。由于RCCS具有上述优点,因而在构建有功能的人工活体组织方面备受关注[9]。

综上所述,本实验从第二前磨牙成功地培养了牙髓干细胞,并首次利用微载体在模拟微重力环境里进行了三维培养,培养后细胞生物学特性未发生改变,维持了DPSCs的干细胞特性,其最大密度提高了11倍,较之普通二维培养有显著差异,实现了牙髓干细胞体外的大规模扩增,证明了微载体和RCCS相结合的三维培养方法在牙齿组织工程学种子细胞的快速扩增方面有可行性。

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] YOUNG C S, TERADA S, VACANTI J P, *et al*. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds[J]. J Dent Res, 2002, 81(10): 695-700.

[4] HAINFELLNER J A, VOIGTLANDER T, STROBEL T, *et al*. Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein(GFAP) *in vivo*[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2001, 60(5): 449-461.

[5] PAPAGERAKIS P, BERDAL A, MESBAH M, *et al*. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth[J]. Bone, 2002, 30(2): 377-385.

[6] BJORNSON C R, RIETZE R L, REYNOLDS B A, *et al*. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*[J]. Science, 1999, 283(5401): 534-537.

[7] GRIFFITHS B. Scale-up of suspension and anchorage-dependent animal cells[J]. Mol Biotechnol, 2001,17(3): 225-238.

[8] CHIU B,WAN J Z, ABLEY D, *et al*. Induction of vascular endothelial phenotype and cellular proliferation from human cord blood stem cells cultured in simulated microgravity[J]. Acta Astronaut, 2005, 56(9-12): 918-922.

[9] FREED L E, LANGER R, MARTIN I, *et al*. Tissue engineering of cartilage in space[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(25): 13885-13890.

(编辑　汪勤俭)