论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1264-04

DEX 和 rhBMP2 对体外培养人牙髓细胞碱性磷酸酶活性的影响

张慧宇[1],向学熔[1],范小平[2] (重庆医科大学附属口腔医院:[1]牙周黏膜科,[2]正畸科,重庆 400015)

摘 要:目的 探讨不同浓度地塞米松(Dexamethasone,DEX)、重组人骨形态发生蛋白2(recombinant human bone morphogenetic protein 2, rhBMP2)及两者联合应用对体外培养的人牙髓细胞(human dental pulp cells,HDPCs)碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase,ALP)活性的影响。**方法** 组织块法培养HDPCs并进行鉴定;采用酶动力学的方法,观察DEX、rhBMP2及二者联合应用对HDPCs的ALP活性的影响。**结果** 单独应用DEX时ALP活性明显增高,且在生理浓度范围内当浓度为0.01 nmol/ml时,对HDPCs的ALP活性达到最大的刺激作用,rhBMP2对HDPCs的ALP活性呈浓度依赖性增强;当联合应用DEX和rhBMP2,ALP活性比单独应用相应浓度的rhBMP2明显增高。**结论** DEX、rhBMP2对HDPCs的ALP活性均有增强作用,同时二者对HDPCs的ALP活性有显著的功能放大性协同增强作用。

关键词:地塞米松;重组人骨形态发生蛋白2;人牙髓细胞;碱性磷酸酶

中图法分类号:R345;R446.19;R78 **文献标识码**:A

Effects of DEX and rhBMP2 on alkaline phosphatase activity of human dental pulp cells *in vitro*

ZHANG Hui-yu[1], XIANG Xue-rong[1], FAN Xiao-ping[2] ([1]Department of Paradental Mucosal Diseases, [2]Department of Orthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To study the effects of dexamethasone (DEX), recombinant bone morphogenetic protein-2 (rhBMP2), and combined application of rhBMP2 and DEX on alkaline phosphatase (ALP) activity of human dental pulp cells (HDPCs) *in vitro*. **Methods** HDPCs were cultured by tissue block method and identified. Effects of DEX, rhBMP2, and combined application of both on ALP activity of HDPCs were determined by a modified enzyme dynamical method. **Results** DEX could enhance ALP activity, reaching the peak value at the concentration of 0.01 nmol/ml. rhBMP2 could enhance ALP activity in a dose-dependent manner. ALP activity was significantly higher under the condition of combined application of DEX and rhBMP2 than single application of DEX or rhBMP2 only. **Conclusion** Both DEX and rhBMP2 can enhance ALP activity of HDPCs. However, combined application of DEX and rhBMP2 can greatly enhance ALP activity of HDPCs.

Key words: dexamethasone; recombinated bone morphogenetic protein-2; human dental pulp cells; alkaline phosphatase

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是参与骨等矿化组织代谢和再生的重要的功能性标志酶[1]。牙髓细胞与成骨细胞有着十分相似的性质,成牙本质细胞的主要功能是形成牙本质,牙乳头间充质细胞在向成牙本质细胞分化的过程中分泌基质,并在ALP等矿化因子的作用下形成牙本质,因而成牙本质细胞具有较高的ALP水平[2]。所以,我们可以用ALP活性的增强来作为牙髓细胞向成牙本质样细胞分化的指标。国内有学者检测到重组人骨形态发生蛋白2(recombinant human bone morphogenetic protein 2, rhBMP2)能显著增强人牙髓细胞(human dental pulp cells, HDPCs)的ALP活性,促进其向成牙本质样细胞分化[3]。地塞米松(dexamethasone,DEX)作为一类糖皮质激素广泛应用于成骨干细胞的研究中,被证实对骨髓成骨干细胞的分化有很强的促进作用,近些年来也逐渐

基金项目:重庆市卫生局科研基金(06-2-201)
Supported by the Science Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (06-2-201)

作者简介:张慧宇,女,天津市人,硕士,医师,主要从事牙体牙髓、牙周黏膜疾病方面的研究,现在中国人民解放军457医院口腔科。电话:(027)62800628

通信作者:范小平,电话:(023)89035739, E-mail:cqzxfxp66@sina.com

收稿日期:2008-08-14;**修回日期**:2008-11-10

被引入牙髓细胞的研究中[4]。但 DEX，DEX 与 rhBMP2 组合对 HDPCs 的 ALP 活性水平如何？目前资料尚少。本研究在建立 HDPCs 原代培养的基础上，观察 DEX、rhBMP2及二者联合应用对 HDPCs 的 ALP 活性的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞来源　　实验牙髓细胞采用重庆医科大学附属口腔医院门诊 12～20 岁因正畸治疗需要拔除的健康、完整和无明显龋坏的牙齿。

1.1.2　主要试剂　　DEX（北京海克隆生物化学制品有限公司）；rhBMP2（中国军事医学科学院）；高糖 DMEM 培养液、胰蛋白酶（Sigma，USA）；优等胎牛血清（Fetal bovine serum FBS，美国 Gibio 公司）；二氧化碳细胞恒温培养箱（Forma Scientic，USA）；CKC-TR-2W 型倒置显微镜（Olympus，Japan）；酶联免役检测仪（Labsystems dragon MK3，Finland）；YJ-875 型超净化工作台（苏州净化设备厂）；96 孔培养板（北京海克隆生物化学制品有限公司）；波形丝蛋白、角蛋白一抗及即用型 SABC 试剂盒（博士德公司）。

1.2　方法

1.2.1　HDPC 的原代培养和鉴定　　用组织块法行 HDPCs 的原代培养。待细胞长出并传代成功后，取第 5 代对数生长期 HDPCs，用 SABC 法对细胞爬片进行波形丝蛋白、角蛋白免疫组织化学染色，鉴定细胞来源。

1.2.2　检测 DEX 对 HDPCs 的 ALP 活性的影响　　将地塞米松原药干粉溶于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中，分别调配成 0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 nmol/ml 五个浓度。选取生长良好的第 5 代人牙髓细胞，按 3×10^4/ml 接种于 96 孔培养板上，每孔 100 μl，培养液为含有 10% FCS 的 DMEM 培养液，在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 24 h，弃孔内培养液及未贴壁细胞，无血清培养液冲洗 3 遍，再加上含有药物的培养液，每个浓度设置 3 个复孔，每孔 100 μl，平行设置阴性对照组 3 孔，每孔只加含有 10% FCS 的 DMEM 培养液 100 μl。分别于连续培养至 7、14 d 时终止培养，吸出培养液，用 pH＝7.4 的 PBS 洗 3 遍，吸干，每孔加入 1 g/L 的 TritonX-100 50 μl，置 4 ℃冰箱过夜，然后加入 ALP 底物，每孔 100 μl，37 ℃孵箱内置 30 min，以每孔加入 0.2 mol/L NaOH 50 μl 终止反应；酶联仪波长 410 nm 测定各孔的吸光度值[D(450)]，取平均值作统计学处理。

1.2.3　检测 rhBMP2 联合 DEX 对 HDPCs 的 ALP 活性的影响　　将 rhBMP2 分别稀释成浓度为：50、100、200、400、800 ng/ml；rhBMP2 与 DEX 配成以下联合组：联合组 1：DEX 浓度为 0.001 nmol/ml，rhBMP2 分别为 50、100、200、400、800 ng/ml；联合组 2：DEX 浓度为 0.01 nmol/ml，rhBMP2 分别为 50、100、200、400、800 ng/ml；联合组 3：DEX 浓度为 0.1 nmol/ml，rhBMP2 分别为 50、100、200、400、800 ng/ml。选取生长良好的第 5 代人牙髓细胞，按 3×10^4/ml 接种于 96 孔培养板上，每孔 100 μl，培养液为含有 10% FCS 的 DMEM 培养液，在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养 24 h，弃孔内培养液及未贴壁细胞，再加上含有药物的培养液，每个浓度设置 3 个复孔，每孔 100 μl，平行设置阴性对照组 3 孔，连续培养 48 h 时终止培养；酶联仪波长 410 nm 测定各孔的吸光度值[D(410)]。

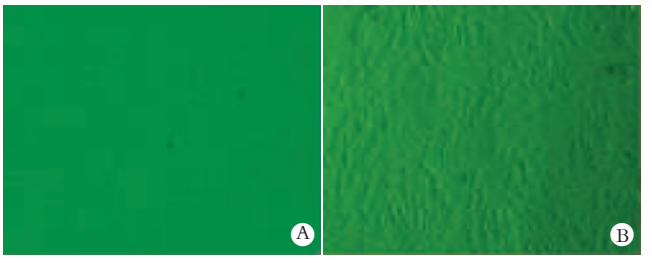
1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用 SAS9.0 统计软件对组间进行析因方差分析。

2　结果

2.1　原代细胞形态学观察和来源鉴定

培养 HDPCs 形态上呈典型的成纤维样细胞（图 1A），形态多为梭形和星形，细胞质丰富，胞体细长，核位于中央，核仁清晰。当达到汇合后，细胞排列成整齐的“束状”或“漩涡状”（图 1B）。细胞免疫组化鉴定均为波形丝蛋白阳性（图 2），阳性颗粒在细胞质内均匀分布，抗角蛋白为阴性（图 3），证明培养的细胞来自中胚层的间充质细胞，无上皮细胞混杂。



A：形态多为长梭形；B：排列成整齐的牙髓细胞

图 1　牙髓细胞的形态学观察　（倒置相差显微镜 ×40）

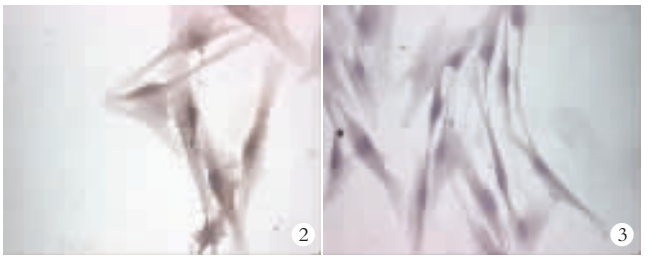


图 2　波形丝蛋白阳性染色　（SABC ×400）

图 3　角蛋白染色为阴性　（SABC ×400）

2.2　应用 DEX 后 HDPCs 的 ALP 活性检测

不同浓度的 DEX 诱导组细胞于连续培养 7 d 和 14 d 后测定细胞内 ALP 的活性，结果显示，无论是连续培养 7 d 还是 14 d 地塞米松可显著增强 HDPCs 的 ALP 的活性，与对照组比较，均有统计学差异（$P<0.05$）（表 1）。

表 1　加入 5 种浓度的 DEX 连续培养 7、14 d ALP 活性比较（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	浓度	7 d	14 d
地塞米松	10^{-4}	0.751 ± 0.050	3.317 ± 0.350
（nmol/ml）	10^{-3}	1.110 ± 0.116	4.848 ± 0.049
	10^{-2}	1.519 ± 0.054	6.943 ± 0.184
	10^{-1}	0.974 ± 0.041	4.621 ± 0.070[a]
	1	0.872 ± 0.024	3.920 ± 0.054
对照组	0	0.501 ± 0.013	1.955 ± 0.051

7 d 组内不同浓度比较：$F=100.93$；$P<0.05$；14 d 组内不同浓度比较：$F=297.99$；$P<0.05$；a：$P<0.05$，与 7 d 比较

2.3 rhBMP2、DEX 联合应用 HDPCs 的 ALP 活性检测

阴性对照组测得 ALP 值为(2.483 ± 0.025)；rhBMP2、DEX 联合应用细胞内 ALP 活性测定结果见表 2。其中单独应用 rhBMP2 组,人牙髓细胞 ALP 活性随浓度依赖性增加,与阴性对照组比较均有统计学差异($P<0.05$)。当 DEX 与 rhBMP2 联合后,联合组的 ALP 活性均大于对应浓度的 rhBMP2 组,其中以联合组 2(DEX 浓度为 10^{-2} nmol/ml)的 ALP 活性最强。析因分析结果表明,rhBMP2 与 DEX 对增强人牙髓细胞的 ALP 活性具有协同作用($P<0.05$)。

表 2 不同浓度 rhBMP2 以及联合不同浓度 DEX 组间 ALP 活性比较($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

药物	rhBMP2 浓度(ng/ml)				
	50	100	200	400	800
单独 rhBMP2 组	4.522 ±0.272	5.367 ±0.242	5.983 ±0.663	6.461 ±0.247	7.160 ±0.192
联合组 1	6.520 ±0.115	7.155 ±0.168	7.572 ±0.247	8.078 ±0.169	9.331 ±0.205
联合组 2	7.597 ±0.113	7.963 ±0.073	8.338 ±0.456	8.975 ±0.244	11.319 ±0.567
联合组 3	6.457 ±0.243	6.870 ±0.137	7.305 ±0.126	8.049 ±0.113	9.564 ±0.324

联合组 1：含有 10^{-3} nmol/ml DEX；联合组 2：含有 10^{-2} nmol/ml DEX；联合组 3：含有 10^{-1} nmol/ml DEX 析因分析结果(r-rhBMP2, d-DEX)：r：F 值为 199.65，$P<0.05$；d：F 值为 266.51，$P<0.05$；r×d：F 值为 3.58，$P=0.0012$

3 讨论

DEX 作为合成的可溶性糖皮质激素是体外诱导成骨细胞生长和分化的重要因子,是绝大部分种属骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中所必需的,其基本作用可能是在转录水平促进各种成熟成骨细胞标志物的表达,促进 ALP 活性,并促进骨结节的形成,但其确切机制尚未阐明[5]。牙髓细胞与成骨细胞有着十分相似的性质,DEX 促进骨髓基质细胞分化的能力值得我们关注,可借以研究牙髓细胞的分化。本研究显示不同浓度的 DEX 诱导组细胞于连续培养 7 d 和 14 d 后测定细胞内 ALP 活性,无论是连续培养 7 d 还是 14 d,DEX 都可显著增强 HDPCs 的 ALP 活性。本研究结果也显示未经过诱导的牙髓细胞即有一定的 ALP 活性,同何飞等[6]的研究一致。诱导组在低浓度下,随 DEX 浓度的增加 ALP 活性增高,当培养液浓度为 0.01 nmol/ml 时,ALP 的含量增至最高,之后随 DEX 浓度的增高,ALP 活性逐渐降低,即 0.01 nmol/ml 的 DEX 可达到最大的刺激作用。正常人体血液中糖皮质激素的生理浓度为 0.01 ~0.1 nmol/ml[7],这一最大刺激浓度恰好在人体血液中糖皮质激素的生理水平范围内。在体外诱导培养牙髓细胞分化时,细胞发生极化,发生极化的细胞可向培养瓶底沉积丰富的基质,这种基质具有一定结构并富含 I 型胶原,继而基质发生矿化;高浓度 DEX 促进牙髓细胞分化的能力逐渐减弱可能是因为大剂量糖皮质激素的诱导造成大量基质堆积影响了进一步的分泌,同时一旦其浓度超出其生理水平,可能会对牙髓细胞的分化产生一定抑制作用。关于这方面机制的探讨,有待进一步深入研究,但 DEX 能促进细胞的分化,有诱导牙髓细胞向成牙本质样细胞分化的能力这一点是可以肯定的,且浓度为 0.01 nmol/ml 的 DEX 可对牙髓细胞分化达到最大的刺激作用,也为下一步实验浓度的筛选提供了依据。

Lecoeur 等[8]在研究非骨细胞是否具有成骨潜能的实验中发现,脂肪组织细胞在加入 rhBMP2 和 DEX 联合培养后其 ALP 活性明显增加。本次实验借用成骨细胞的研究经验,在研究 rhBMP2 与 DEX 单独运用对牙髓细胞及其他组织细胞影响的实验研究基础上,首次将二者联合应用于牙髓细胞,采用酶动力学的方法,比较不同浓度的 rhBMP2 单独或联合 DEX 对 HDPCs 的 ALP 活性的影响。本实验选择 rhBMP2 浓度为 50、100、200、400、800 ng/ml 与 DEX 浓度为 0.001、0.01、0.1 nmol/ml 分别联合应用,结果显示:单独加入 rhBMP2 时,牙髓细胞 ALP 活性明显增加($P<0.05$),与刘嘉利等[9]学者的研究一致,具有浓度依赖性,进一步证明了 rhBMP2 对 HDPCs 促分化的能力。两者联合应用时,各浓度组均可刺激 HDPCs 的 ALP 活性($P<0.05$),并与单独使用相应浓度 rhBMP2 相比,ALP 活性显著增强($P<0.05$),各浓度组之间 ALP 活性均有统计学差异。说明不同浓度的 DEX 与同一浓度的 rhBMP2 联合使用比单独使用同一浓度的 rhBMP2 更能促进牙髓细胞的分化;同一浓度的 DEX 与不同浓度的 rhBMP2 联合使用时,ALP 随 rhBMP2 浓度的增加而增加,也具有浓度依赖性。同时,析因分析结果表明,rhBMP2 与 DEX 对促进 HDPCs 分化存在协同作用,这一作用的机理可能是在两者联合应用时,DEX 诱导大部分成牙本质细胞标记物和涎磷蛋白转录因子的表达,在分化中发挥了积极的诱导作用。曾有关 DEX 对成牙本质样细胞标记的效应研究报道,数据表明 DEX 对其 ALP 活性水平的效应和其他细胞类型的研究相一致,比如骨髓基质细胞、鼠牙乳头细胞、离体的成人骨骼肌组织细胞以及血管平滑肌细胞;为了确定 ALP 活性的增强是否可归因于成牙本质细胞刺激,学者又用糖皮质激素处理,来研究地塞米松对牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)表达的效应。结果显示尽管 DSP-PP 以较低水平被表达,这个基因仍然被看作是一种成熟的成牙本质细胞的终端表型的标志,就像所期待的一样,发现了地塞米松正调节 DSP-PP mRNA 表达的证据[10,11]。而最近的一些报道也证明了在活体牙髓中,DSP 的表达显示分泌了修复性牙本

质。所以有学者提出 DEX 促进了至少一个未经确定的牙髓细胞亚群体朝成牙本质样细胞的显型分化[4,12]。而 rhBMP2 在诱导牙髓细胞分化时,同时受到 DEX 的作用,二者共同作用的结果使牙髓细胞的 ALP 活性明显增强,这当中又以 0.01 nmol/ml 的 DEX 与不同浓度的 rhBMP2 联合应用比其他联合组更能达到较大刺激 ALP 活性作用,这也为今后研究的药物浓度的选择提供了一个重要参考。

由于牙髓细胞的分化机制本身尚待进一步明确,而多种因子的相互作用则更为复杂,受到多种因素影响,本实验仅从 ALP 的角度探讨 rhBMP2 和 DEX 联合使用对人牙髓细胞分化的影响,更进一步的机制有待研究,但 rhBMP2 和 DEX 单独或联合使用对于体外培养的 HDPCs 促分化的能力是可以肯定的,也为我们今后对于牙髓细胞的研究提供了新的思路。

参考文献:

[1] 朱李军, 冯　航, 陈仲伟, 等. 人牙髓细胞体外培养及向成牙本质细胞诱导分化[J]. 现代医院, 2007, 7(6):26 - 28.

[2] Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, *et al*. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization[J]. Connect Tissue Res, 2004, 45(2): 101 - 108.

[3] 张慧宇,杨　鑫,向学熔,等. rhBMP2 对牙髓成纤维细胞增殖及碱性磷酸酶活性的影响[J]. 重庆医学, 2008, 37(5):459 - 460,463.

[4] Tonomura A, Sumita Y, Ando Y, *et al*. Differential inducibility of human and porcine dental pulp-derived cells into odontoblasts[J]. Connect Tissue Res, 2007, 48(5):229 - 238.

[5] Beloti M M, Rosa A L. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone[J]. Braz Dent J, 2005,16(2):156 - 161.

[6] 何　飞,谭颖徽,杨峥嵘. 体外人牙髓细胞的连续培养[J]. 第三军医大学学报,2002,24(7):836 - 839.

[7] Bergendahl M, Vance M L, Iranmanesh A, *et al*. Fasting as a metabolic stress paradigm selectively amplifies cortisol secretory burst mass and delays the time of maximal nyctohemeral cortisol concentrations in healthy men[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996,81(2):692 - 699.

[8] Lecoeur L, Ouhayoun J P. In vitro induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells[J]. Biomaterials, 1997, 18(14): 989 - 993.

[9] 刘嘉利, 张　郁, 王晓方, 等. rhBMP2 和 rhTGF-β1 联合应用对人牙髓细胞碱性磷酸酶活性的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2000, 10(3):132 - 134.

[10] Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, *et al*. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures[J]. Cell Tissue Res, 2005, 321(3):391 - 400.

[11] Yasuhara R, Suzawa T, Miyamoto Y, *et al*. Nitric oxide in pulp cell growth, differentiation, and mineralization[J]. J Dent Res, 2007,86(2):163 - 168.

[12] Hwang Y C, Hwang I N, Oh W M, *et al*. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis[J]. J Mol Histol, 2008, 39(2): 153 - 160.

(编辑　栾　嘉)

(上接 1257 页)

验;计数资料以百分率表示,行 χ^2 检验。

2　结果

腹腔镜阑尾切除术 98 例,96 例成功施行腹腔镜阑尾切除术,中转开腹 2 例,放置引流管 5 例。术后 2 d 拔管;坏疽性阑尾炎术后出现脐孔处感染 2 例,经换药处理痊愈。手术时间、住院时间、胃肠功能恢复时间等与开腹阑尾切除术相比有统计学差异($P<0.05$),没有肠粘连发生。见表 1。

表 1　腹腔镜阑尾切除术与开腹阑尾切除术的临床疗效比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	手术时间(t/min)	住院时间(t/d)	胃肠功能恢复时间(t/h)
腹腔镜组	98	41.31 ± 12.13[a]	4.60 ± 1.52[a]	17.92 ± 7.82[a]
开腹组	100	53.27 ± 12.23	8.60 ± 2.22	49.23 ± 15.33

a:$P<0.05$,与开腹组比较

3　讨论

近年来,随着腹腔镜手术的发展与普及,腹腔阑尾切除术的优越性得到了充分体现[1]。LA 手术切口一般为 3 个,分散且隐蔽,切口瘢痕小、愈合好。本组 98 例行 LA,没有肠粘连发生。而且 LA 的盆腔粘连概率较开腹减低,从而术后女性不孕的发生也减少。而 LA 不受肥胖因素的影响,找阑尾较为方便、准确,切除阑尾也简易、快捷。

另外,LA 也是较好的诊断措施。LA 术野清晰,可全面探查腹腔,发现阑尾以外的病灶,并能取活检,进行阑尾以外的手术而不用扩大切口,对于女性患者有利于诊断和发现妇科疾病[2];对于术前诊断不明确的患者最好选择 LA,这是传统开腹阑尾切除术难以完成的。

过去认为 LA 只适用于非急性阑尾炎,但目前已成功用于除阑尾周围脓肿以外的所有阑尾炎[3,4]。综上所述,我们认为只要熟练掌握腹腔镜技术,可逐渐缩短手术时间,减少中转开腹的概率,也可避免发生肠粘连等并发症。

关键词: 腹腔镜阑尾切除术;开腹阑尾切除术
中图法分类号: R656.8　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 谭家驹,孙增勤,甄作均,等. 微创外科手术与麻醉[M]. 北京:科学技术文献出版社,2003:91.

[2] 吴志明,沈华强,娄建平,等. 腹腔镜在急腹症中的临床应用[J]. 中国微创外科杂志, 2005, 5(7):577 - 578.

[3] Cervini P, Smith L C, Urbach D R. The surgeon on call is a strong factor determining the use of a laparoscopic approach for appendectomy [J]. Surg Endosc, 2002, 16(12):1774 - 1777.

[4] 吴文英. 循证护理在儿童腹腔镜阑尾切除围手术期的临床应用[J]. 实用临床医药杂志:护理版,2008,4(4):73 - 74.

(编辑　王小寒)