文章编号:1000-5404(2012)10-1011-05

论著

牙周膜干细胞对脐血单个核细胞分化为破骨样细胞的影响

刘一涵[1],刘洪臣[1],刘文佳[2] (100853 北京,中国人民解放军总医院口腔医学研究所[1]; 710032 西安,第四军医大学组织工程研发中心[2])

[摘要] **目的** 研究牙周组织改建过程中,牙周膜干细胞对破骨细胞形成的影响,初步探讨静压力和诱导因子对牙周膜干细胞调控破骨细胞形成的作用机制。**方法** 有限稀释法克隆化培养牙周膜干细胞,密度梯度离心法分离脐血,收集单个核细胞。建立直接共培养和Transwell间接共培养体系。实验分组:A组,对照组(单纯共培养);B组,静压力组,共培养后第2天即对共培养细胞施加120 KPa压力,持续作用1 h后继续培养;C组,诱导因子组,培养液中加入诱导因子1,25二羟基维生素D_3(1×10^{-8} mol/L)和前列腺素E_2(1×10^{-6} mol/L)。采用倒置相差显微镜及TRAP染色,骨磨片染色等方法检测破骨样细胞(osteoclast-like cells ,OLC)的形成及功能。**结果** 各组第3、7天OLC计数比较结果显示,施加静压力后,直接共培养组OLC数量明显多于间接共培养组($P<0.01$);而诱导因子组,直接共培养组OLC少于间接共培养组($P<0.01$)。**结论** 牙周膜干细胞能够促进脐血单个核细胞分化为破骨样细胞,且在静压力作用下,两种细胞直接接触时,这种调控作用更为明显。

[关键词] 牙周膜干细胞;脐血单个核细胞;破骨样细胞;共培养
[中图法分类号] R322.41;R329.1;R329.24 [文献标志码] A

Periodontal ligament stem cells improve peripheral blood mononuclear cells differentiation into osteoclast-like cells

Liu Yihan[1], Liu Hongchen[1], Liu Wenjia[2] ([1]Institute of Stomatology, General Hospital of PLA, Beijing, 100853; [2]Research and Development Center for Tissue Engineering, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of periodontal ligament stem cells (PDLSCs) on osteoclasts differentiation during periodontal remodeling in order to elucidate the roles of static force and inducible factors in the regulation of osteoclasts differentiation by PDLSCs. **Methods** PDLSCs were isolated and cultured from freshly extract teeth by using the limiting dilution technique. Mononuclear cells of umbilical cord blood (UBMC) were separated by density gradient centrifugation. After identification, the two kinds of cells were co-cultured in direct- and in Transwell co-culture system. The co-culture system were further treated by static force (120 kPa for 1 h per day, for 3 d), or inducible factors (1×10^{-8} mol/L α-25$(OH)_2D_3$ and 1×10^{-6} mol/L PGE_2 for 7 d) to induce osteoclast-like cells (OLC). The cells without treatment served as control. Cell morphology was observed by phase contrast microscopy. TRAP staining was used to identify the OLCs. And the bone-resorption capacity was assessed by lacunae forming ability on bone slice. **Results** Under static force, there were more OLCs in direct co-culture system than in the Transwell co-culture system ($P<0.01$). While, the treatment of inducible factors resulted more OLCs in the Transwell co-culture system than in direct co-culture system ($P<0.01$). **Conclusion** PDLSCs promote mononuclear cells differentiate into OLC, especially under the continuous static force and the two cells contact directly.

[**Key words**] periodontal ligament stem cells; umbilical cord blood mononuclear cells; osteoclast-like cells; co-culture

Corresponding author: Liu Wenjia, E-mail: wenjialiu23@tom.com

[通信作者] 刘文佳,E-mail:wenjialiu23@tom.com

牙周组织改建是复杂的生物学过程,其生物学基础是成骨和破骨过程的平衡。自2004年,Seo等[1]在牙周膜中首次分离培养出牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSC),并证明其能够维持牙周膜功能的稳定,并对牙周组织再生具有重要的调控作用。此外,另一至关重要的破骨细胞(osteoclast, OC),已有研究表明,是从外周血中的破骨前体细胞(pre-osteoclast, pOC)分化而来的[2-3],而不是来源于局部牙周组织[1],不能增殖和传代。因此,研究外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)和pOC之间的关系以及应力条件下PDLSC如何诱导牙周组织中成熟OC的形成,是阐明牙周组织改建生物学机制的关键。破骨样细胞(osteoclast-like cell, OLC)是指原代培养或实验诱导生成的,其具有OC的典型特征,TRAP染色阳性,能够形成骨吸收陷窝。本实验中诱导生成的均为破骨样细胞[4-7]。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 选取2011年10月至2012年2月第四军医大学西京医院妇产科健康孕妇。于胎儿娩出后、胎盘未完全娩出前自脐静脉穿刺,无菌条件下收集脐带血,肝素抗凝。牙周膜取材自因正畸需要拔除且无根尖病变,无骨质吸收的牙齿,患者10~12岁。本研究经第四军医大学口腔医院伦理委员会批准,且每个患者均签署了知情同意书。

1.1.2 主要试剂 α-MEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);人淋巴细胞分离液(天津灏洋公司);羟乙基淀粉(Fresenius Kabi Deutschland GmbH 德国,分子量260000);1, 25二羟基维生素D_3[1,α-25(OH)$_2D_3$]、前列腺素E_2(prostaglandin E_2, PGE_2)(Sigma公司);萘酚AS-BI磷酸盐(Sigma公司,美国);SRTO-1,CD146抗体(R&D公司,美国);山羊抗小鼠二抗(罗丹明)和山羊抗兔二抗(FITC)(北京康为生物有限公司)。

1.1.3 主要仪器 空气静压力加载装置为本实验室自行设计。密闭不锈钢容器借PVC耐力管和电镀铜质标准连接件(包括三通、气闸等)与压力变送器、高压气瓶相连构成整个压力加载装置。

1.2 方法

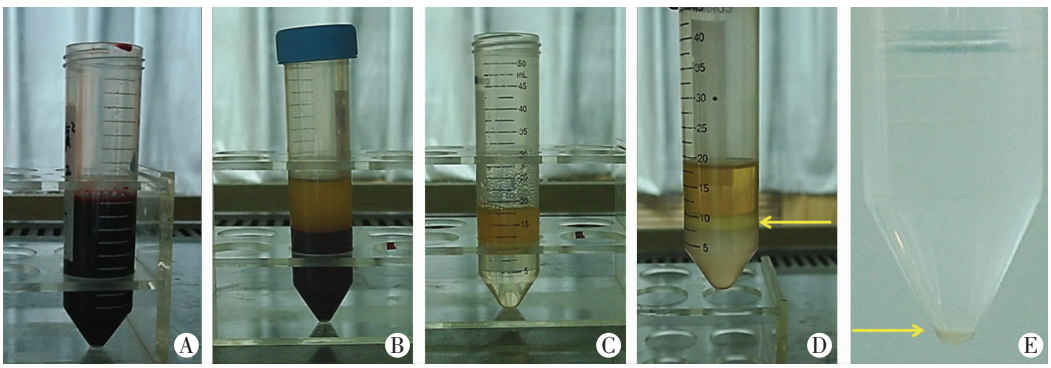
1.2.1 玻片及骨磨片的处理 将1.0 cm×1.0 cm盖玻片超声清洗后浸入硫酸-重铬酸钾溶液中过夜,高压灭菌后备用。取新鲜牛股骨,制备成0.5 cm×0.5 cm厚100~200 μm的骨片,超声清洗10 min×3次,浸入10倍双抗中20 min×3次,紫外线照射消毒后存放于-20 ℃备用。

1.2.2 原代细胞培养

1.2.2.1 脐血单个核细胞(umbilical cord blood mononuclear cells,UBMC)原代培养 取健康产妇抗凝脐带血50 ml,以体积比4∶1加入12.5 ml 6%羟乙基淀粉(HES),1 000 r/min离心10 min,吸取上层悬浮细胞液,以体积比1∶1沿管壁缓慢加于Ficoll液面上,使二者形成一个清晰的界面;2 500 r/min离心25 min,吸取呈云雾状的白膜层,收集于离心管内(操作过程见图1);用PBS洗3次,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用α-MEM全培养液(含10% 胎牛血清)重悬计数,按照实验分组进行接种,2 h后全量更换培养液。

1.2.2.2 有限稀释法克隆化培养PDLSC 原代培养PDLSC长至80%汇合时,胰酶消化,调整细胞密度为10个/ml,以每孔0.1 ml接种于96孔板,37 ℃、5% CO_2培养箱中过夜。挑选单细胞孔,标记并补加0.1 ml培养液。待孔中细胞形成克隆,占孔底面积1/3~1/2时,消化并将多个单克隆来源的细胞悬液混合,逐步扩大培养至1×10^7。其中,第2~4代多克隆来源的PDLSC用于本实验的研究。

1.2.3 PDLSC免疫荧光鉴定 第3代处于对数生长期的PDLSC,胰酶消化,制备成单细胞悬液。以2×10^3个/ml的细胞密度,接种于预先放置无菌玻片的24孔板内。培养箱中过夜,PBS冲洗3次,4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS冲洗3次制作细胞爬片。按照细胞免疫荧光染色方法[8],孵育一抗(STRO-1、CD146),37 ℃孵育2 h,PBS洗3次,避光加入荧光二抗,37 ℃孵育60 min,PBS洗3次,吸干后,避光加入Hoechst孵育15 min进行细胞核衬染,荧光显微镜观察。



A: 脐血与HES 4∶1混合;B-C: 离心后分层,将上层缓慢加于Ficoll液面上;D: 离心后分层,中间白膜层为单个核细胞;E: PBS洗涤后单个核细胞沉于管底

图1 两步法分离UBMC操作步骤

1.2.4 UBMC 与 PDLSC 的共培养

1.2.4.1 直接共培养 将分离液提取的 UBMC 以 1×10^6/ml 浓度接种于 24 孔板中,培养孔内预置玻片或骨片,培养 2 h 后换液,去除杂细胞。用 0.25% 胰酶消化 PDLSC,以 5×10^4/ml 接种于培养板中。实验分 3 组:A 组,对照组(单纯共培养);B 组,静压力组,共培养后第 2 天即对共培养细胞施加 120 kPa 压力,持续作用 1 h 后放入 37 ℃,5% CO_2 孵育箱内培养 3 d;C 组,诱导因子组,培养液中加入诱导因子 1,α-25(OH)$_2$D$_3$(1×10^{-8} mol/L)和 PGE_2(1×10^{-6} mol/L),每 3 天半量换液,培养 7 d。

1.2.4.2 间接共培养 采用 Transwell 共培养系统,将 PDLSC 和 UBMC 混合培养。Transwell 上室放置 PDLSC 1×10^6,下室放置 UBMC 1×10^6,预先放置玻片或骨片。将共培养体系置于 37 ℃,5% CO_2 孵育箱内孵育,培养结束后,撤去 Transwell 上室以及基底膜,研究下室的细胞。实验分 3 组:A 组,对照组(单纯共培养);B 组,静压力组,共培养后第 2 天即对共培养细胞施加 120 kPa 压力,持续作用 1 h 后放入 37 ℃,5% CO_2 孵育箱内培养 3 d;C 组,诱导因子组,培养液中加入诱导因子 1,α-25(OH)$_2$D$_3$(1×10^{-8} mol/L)和 PGE_2(1×10^{-6} mol/L),每 3 天半量换液,培养 7 d。

1.2.5 TRAP 染色 取培养第 7 天玻片,制作细胞爬片。用 25 ml/L 戊二醛液 4 ℃固定 10 ~ 15 min,蒸馏水洗 3 次;浸入 TRAP 染色孵育液 37 ℃,50 min,双蒸水洗 3 次;细胞爬片的面向下,中性树胶封片,光镜观察。

1.2.6 骨吸收陷窝观察 取培养第 7 天的骨片经 25 ml/L 戊二醛液 4 ℃固定 7 min,0.25 mol/L 氢氧化铵超声清洗 1 min ×3 次,系列酒精脱水,自然晾干,10 g/L 甲苯胺蓝染液室温染色 4 min,蒸馏水洗后光镜下观察。

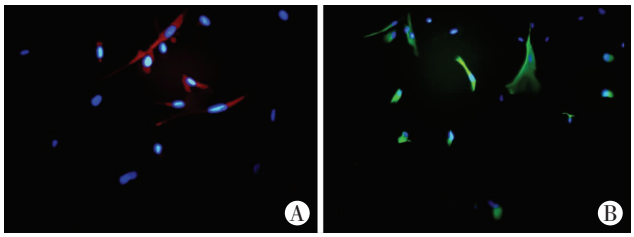
1.3 统计学分析

本实验数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。两组间比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 PDLSC 免疫荧光鉴定

PDLSC 属于间充质来源的组织特异性干细胞,因此表达间充质干细胞特有的表面标志物 STRO-1 和 CD-146[9](图 2)。



A: STRO-1 染色;B: CD146 染色

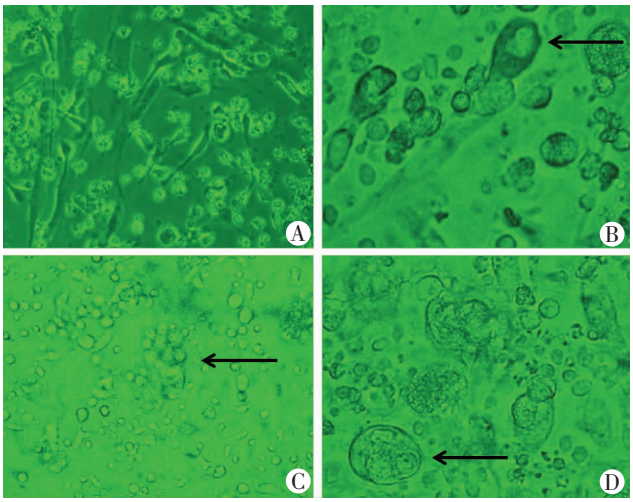
图 2 PDLSC 免疫荧光染色结果 (×200)

2.2 共培养体系的形态学观察

2.2.1 空白对照组 无论是直接共培养还是间接共培养,在不施加静压力或者诱导因子时,均没有胞体较大、多核的 OLC 生成。

2.2.2 静压力组 直接共培养 镜下观察加力后第 1 天 PDLSC 呈发射状或漩涡状走形;第 3 天时,单个核 UBMC 围绕在 PDLSC 周围;第 7 天时,可见圆形或椭圆形的 OLC,体积较 PDLSC 小且数量相对较少,分布于 PDLSC 之间(图 3A、B)。

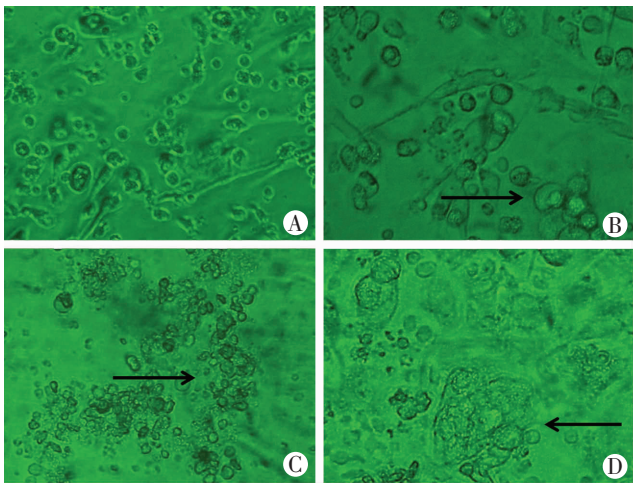
间接共培养 加力后共培养第 3 天,细胞数量开始减少,可观察到 UBMC 的融合现象,第 7 天时多核 OLC 数量增多(图3C、D)。



A:直接共培养第 3 天(×200);B: 直接共培养第 7 天(×400);
C: 间接共培养第 3 天(×200); D: 间接共培养第 7 天(×400)

图 3 静压力组 OLC 倒置显微镜观察

2.2.3 诱导因子组 直接共培养 PDLSC 较 OLC 有明显的生长优势,倒置显微镜下,PDLSC 在第 3 天就形成单层覆盖,此时,UBMC 数量开始减少,可观察到细胞的融合现象,培养至第 5 天时多核 OLC 数量开始增多(图 4)。间接共培养 OLC 的变化同直接共培养(图 4)。



A:直接共培养第 3 天(×200);B: 直接共培养第 7 天(×400);
C: 间接共培养第 3 天(×200);D: 间接共培养第 7 天(×400)

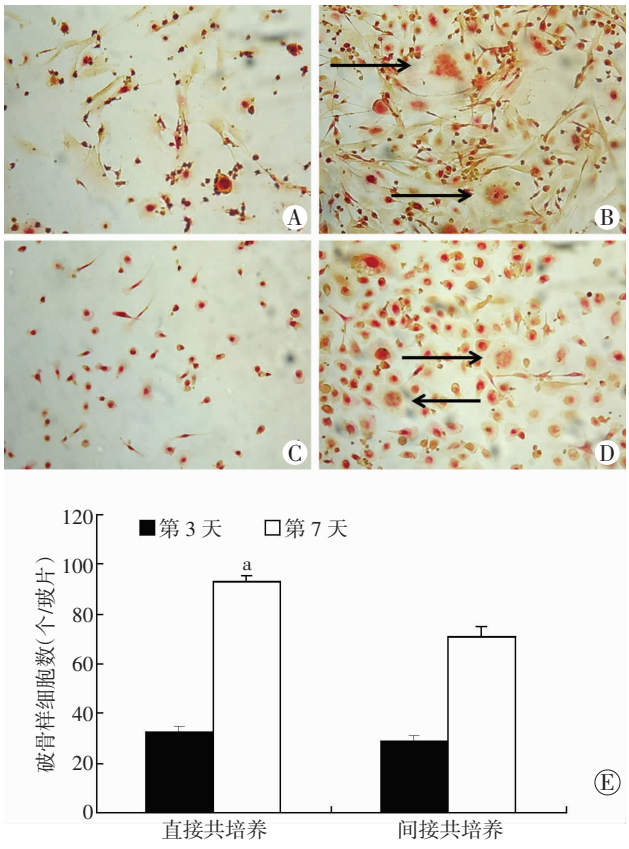
图 4 诱导因子组 OLC 倒置显微镜观察

2.3 TRAP 染色结果

2.3.1 静压力组 直接共培养第 3 天 TRAP 染色可见有少

量TRAP(+)的OLC,胞核2~3个,多分布于PDLSC周围(图5A);第7天TRAP染色可见大量TRAP(+)的OLC,胞核多在3个以上,甚至可见十几个核的巨大OLC(图5B)。

间接共培养对PDLSC加压力后与UBMC共培养,第3天TRAP染色可见少量TRAP(+)的OLC,胞体较小,有的伸出细长伪足,胞核2~3个(图5C);第7天时,TRAP(+)的OLC数量明显增多,胞体变大,胞核多在3个以上(图5D)。各组第3、7天OLC计数比较结果(图5E)显示,直接共培养7 d后OLC数量明显多于间接共培养组($P<0.01$)。



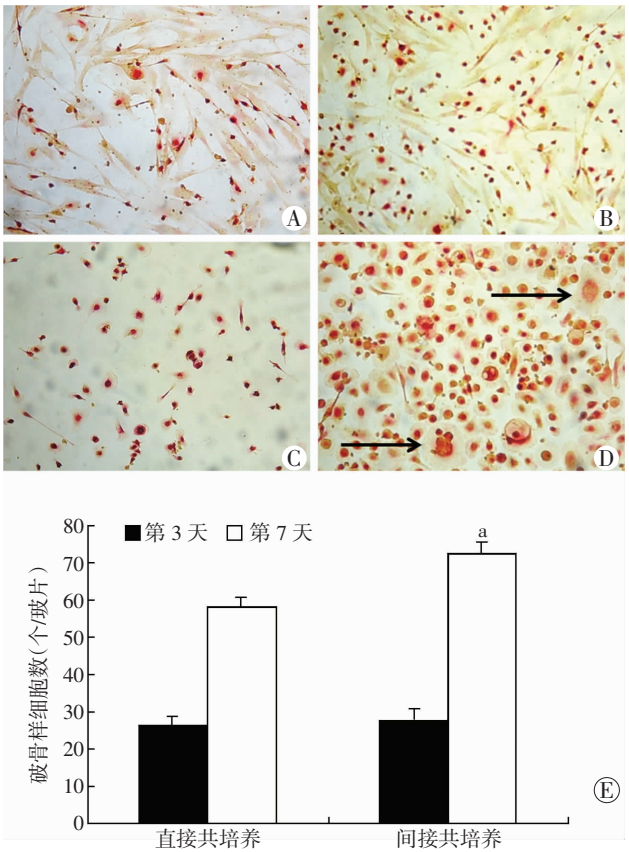
A:直接共培养第3天;B:直接共培养第7天;C:间接共培养第3天;D:间接共培养第7天;E:TRAP(+)细胞计数结果,a:$P<0.01$,第7天直接共培养组明显多于间接共培养组

图5　静压力组OLC TRAP染色结果　(×200)

2.3.2　诱导因子组　直接共培养组第7天时TRAP染色结果显示,OLC数量没有静压力组多,且没有多核的巨大OLC生成(图6B);间接共培养TRAP染色结果与静压力组基本一致(图6C、D)。各组第3、7天OLC计数比较结果(图6E)显示,直接共培养7 d后OLC数量少于间接共培养组($P<0.01$)。

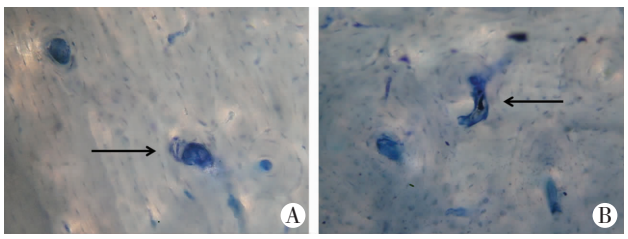
2.4　骨吸收陷窝观察结果

取静压力组和诱导因子组PDLSC和UBMC间接共培养后的骨片,经甲苯胺蓝染色后各组均可观察到典型的骨吸收陷窝(图7A,B),证明所形成的破骨样细胞具有骨吸收功能。且所形成骨吸收陷窝数在静压力组(12.7±1.527)和诱导因子组(12.3±1.155)之间无统计学差异。



A:直接共培养第3天;B:直接共培养第7天;C:间接共培养第3天;D:间接共培养第7天;E:TRAP(+)细胞计数结果;a:$P<0.01$,与直接共培养组比较

图6　诱导因子组OLC TRAP染色结果　(×200)



A:静压力组间接共培养第7天骨吸收陷窝;B:诱导因子组间接共培养第7天骨吸收陷窝

图7　骨吸收陷窝观察结果　(×400)

3　讨论

3.1　体外共培养体系的建立

体外共培养方法分为直接接触和间接接触两种,直接接触是指细胞突触间相互接触,增加了细胞间信号传导的过程。间接接触是指细胞虽然在同一个培养环境下,但细胞并不直接接触,而是通过细胞分泌的各种物质影响对方的生物学功能。Wong[9]首先研究了成骨细胞(osteoblast,OB)和OC的共培养的方法,使培养有OB的平皿面向下和OC共培养,结果表明,成骨细胞分泌的透明质酸明显的增加。Orlandini[10]将OB与破骨前体细胞混在一起培养,观察Saos-2成骨细胞株与OC在功能和结构上的交互作用,表明在长期共

同培养的情况下,Saos-2 的碱性磷酸酶含量有明显下降的趋势。Loomer[11]用 24 孔培养板,其内培养有成骨能力的骨髓干细胞,孔中放置一个 0.5 mm 的金属网架,在网架上放置表面涂有薄层磷酸盐的石英载片,在石英载片上培养梯度离心后的破骨细胞前体细胞,发现 2 d 内共培养体系中的 AKP 的含量明显高于单纯 OB 的培养,3 d 后 AKP 含量下降。在牙周膜微环境中,牙周膜细胞与单个核细胞两种接触方式皆存在,因此,本实验中采用两种共培养方式,以期能够较为全面地反映 PDLSC 对 OC 形成的调控作用。

3.2 PDLSC 对 OC 形成的影响

2004 年,由 Seo 等[1]首次证明在牙周膜中存在着干细胞,命名为牙周膜干细胞(PDLSC)。PDLSC 是来源于牙周膜的成体干细胞,具有自我更新(Self-renewal)及多向分化(Multi-potential differentiation)潜能。PDLSC 不但能够维持正常情况下牙周膜内环境的稳定,而且在牙周组织的自我更新以及牙周炎疾病组织的修复与再生过程中发挥了重要的调控作用。研究表明,当牙周损伤导致牙槽骨缺损后,具有成骨潜能的 PDLSC 迁移至缺损区并分化为 OB,从而修复牙槽骨的缺损[12]。此外,从外周血中的破骨前体细胞分化而来的破骨细胞在牙周组织的再生与修复过程中同样发挥至关重要的作用[13]。以往研究表明,成骨细胞和破骨细胞之间存在着相互作用,而在牙周膜微环境中,牙周膜干细胞对破骨细胞的影响却仍不明确。

经典理论认为,成骨细胞表面的 RANKL 与破骨前体细胞表面的 RANK 结合,从而促进具有功能的破骨细胞的形成;另一方面,成骨细胞分泌的 OPG 作为 RANKL 的饵受体,竞争性地结合 RANKL,抑制破骨细胞性骨吸收,从而达到骨吸收和骨形成的动态平衡[14-15]。OPG/RANKL 已经被证实是骨微环境内调节破骨细胞征集和功能的关键因子[16-17]。本实验室前期研究证明,PDLSC 表达核因子 κB 受体活化因子配体(receptor Activator for Nuclear Factor-κ B Ligand,RANKL)及破骨细胞生成抑制因子(osteoclastogenesis in hibitory factor,OCIF),又名骨保护素(osteoprotegerin, OPG)。本实验中,当施加一定静压力时,直接共培养组 OLC 的数量明显多于间接共培养组,且所生成的 OLC 多围绕在 PDLSC 周围。我们的结果表明 PDLSC 在受到静压力后,可能由于 OPG/RANKL 的比值发生改变,对其周围的 MNC 产生影响,促进其分化为 OLC,且直接接触时这种调控作用更为明显,表现为多核破骨样细胞数量较多。相反,当使用诱导因子培养时,直接共培养组 OLC 的数量少于间接共培养组,表明这种诱导因子的作用靶点位于 MNC,并没有通过 PDLSC 间接影响 OLC 的形成。因此,施加静压力时,PDLSC 与 MNC 的直接接触能够显著促进 MNC 分化为 OLC。

参考文献:

[1] Seo B M, Miura M, Gronthos S, *et al*. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149-155.
[2] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al*. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3597-3602.
[3] Roodman G D. Advances in bone biology: the osteoclast Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. Endocr Rev, 1996, 17(4): 308-332.
[4] 刘文佳, 王晓庚, 周洪, 等. 高纯度破骨样细胞体外培养及功能表达的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2008, 26(6): 599-603.
[5] Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, *et al*. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246(1): 199-204.
[6] Gao Y H, Yamaguchi M. Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58(5): 767-772.
[7] Liu Y, Liu W, Hu C, *et al*. MiR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis[J]. Stem Cells, 2011, 29(11): 1804-1816.
[8] 王岚, 夏佳佳, 邓超, 等. 糖基化终末产物对脂多糖介导下人牙周膜干细胞增殖和骨向分化能力的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2011, 21(4): 200-205.
[9] Wong G L. Basal activities and hormone responsiveness of osteoclast-like and osteoblast-like bone cells are regulated by glucocorticoids[J]. J Biol Chem, 1979, 254(14): 6337-6340.
[10] Orlandini S Z, Formigli L, Benvenuti S, *et al*. Functional and structural interactions between osteoblastic and preosteoclastic cells in vitro[J]. Cell Tissue Res, 1995, 281(1): 33-42.
[11] Loomer P M, Ellen R P, Tenenbaum H C. Osteogenic and osteoclastic cell interaction: development of a co-culture system[J]. Cell Tissue Res, 1998, 294(1): 99-108.
[12] Ohta S, Yamada S, Matuzaka K, *et al*. The behavior of stem cells and progenitor cells in the periodontal ligament during wound healing as observed using immunohistochemical method[J]. J Periodontal Res, 2008, 43(6): 595-603.
[13] Walker C G, Dangaria S, Ito Y, *et al*. Osteopontin is required for unloading-induced osteoclast recruitment and modulation of RANKL expression during tooth drift-associated bone remodeling, but not for super-eruption[J]. Bone, 2010, 47(6): 1020-1029.
[14] Haynes D R, Crotti T N, Loric M, *et al*. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint[J]. Rheumatology (Oxford), 2000, 40(6): 623-630.
[15] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system[J]. Endocrinology, 2001, 142(12): 5050-5055.
[16] Blair J M, Zhou H, Seibel M J, *et al*. Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2006, 3(1): 41-49.
[17] Hofbauer L C, Kuhne C A, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2004, 4(3): 268-275.

(收稿:2012-05-06;修回:2012-05-13)
(编辑 张 维)