论著

文章编号:1000-5404(2013)15-1566-04

人参皂苷 Rg1 促进人牙周膜干细胞增殖与成骨分化

王 萍,周 玥,王亚平,屈 晨 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院口腔科)

[摘要] **目的** 观察人参皂苷 Rg1 对体外培养的人牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)增殖和成骨分化的影响。**方法** 选取第3代 PDLSCs,采用 MTT 法和细胞周期检测不同浓度(0.25、0.5、1、2、4 μmol/L)人参皂苷 Rg1 对 PDLSCs 增殖的影响;采用碱性磷酸酶(ALP)活性、实时荧光定量 RT-PCR 和放免法检测人参皂苷 Rg1 对 PDLSCs 成骨分化的影响;采用 ELISA 方法检测人参皂苷 Rg1 对 PDLSCs 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达的影响。**结果** 与对照组比较,浓度为0.5、1、2 μmol/L 的人参皂苷 Rg1 能明显提高 PDLSCs 的增殖能力($P<0.05$),其中浓度为 1 μmol/L 的促增殖作用最强,$S+G_2/M$ 期细胞百分率明显高于对照组($P<0.05$);浓度为 1 μmol/L 的人参皂苷 Rg1 组 ALP 活性、骨钙素(osteocalcin,OCN)和 bFGF 的表达水平明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rg1 对体外培养的 PDLSCs 有促进增殖和成骨分化的作用。

[关键词] 人参皂苷 Rg1;牙周膜干细胞;增殖;成骨
[中图法分类号] R285.5; R322.41; R329.28 [文献标志码] A

Promotion of ginsenoside Rg1 on proliferation and osteogenic potential of human periodontal ligament stem cells

Wang Ping, Zhou Yue, Wang Yaping, Qu Chen (Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effect of ginsenoside Rg1 on the proliferation and osteogenic potential of human periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** PDLSCs at passage 3 were incubated with different concentrations of ginsenoside Rg1 (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 μmol/L). The effect of ginsenoside Rg1 on the proliferative ability of PDLSCs was evaluated by MTT assay, and flow cytometry was used for detecting cell cycle. The osteogenic potential of the cells was assayed by ALP enzymatic activity, real-time RT-PCR and radioimmunoassay, respectively. Basic fibroblast growth factor (bFGF) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the control group, the proliferative ability of PDLSCs in ginsenoside Rg1 groups (0.5, 1 and 2 μmol/L) was significantly enhanced ($P<0.05$), especially in the ginsenoside Rg1 group (1 μmol/L). Cell cycle analysis showed that ginsenoside Rg1 (1 μmol/L) significantly increased the proportion of PDLSCs in proliferative phase ($S+G_2/M$ phase). ALP activity and the expression of osteocalcin (OCN) and bFGF significantly were increased in ginsenoside Rg1 group (1 μmol/L) as compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rg1 can promote the proliferation and osteogenic potential of PDLSCs *in vitro*.

[**Key words**] ginsenoside Rg1; periodontal ligament stem cells; proliferation; osteogenic potential

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10007) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-2-056). Corresponding author: Wang Ping, E-mail: cqcnwp@sina.com

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞。成体干细胞对于内环境的稳定和组织修复具有重要作用[1]。2004 年 Seo 等[2]研究发现,牙周组织中存在未分化的间充质细胞,具有自我更新和多向分化等成体干细胞的特点,首次提出了牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)的概念。人参皂苷 Rg1(ginsenoside Rg1)是人参的主要药理活性成分,有抗细胞凋亡,保护衰老神经,促细胞生长等作用[3-5]。本实验在体外培养 PDLSCs 的基础上,通过不同浓度的人参皂苷 Rg1 作用 PDLSCs,探讨人参皂苷 Rg1 对 PDLSCs 增殖及成骨分化的影响,为利用 PDLSCs 治疗

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC2011jjA10007);重庆市卫生局科研项目(2011-2-056)
[通信作者] 王 萍,E-mail:cqcnwp@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.001.html(2013-04-10)

牙周组织损伤修复提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、Ⅰ型胶原酶、Dispase酶、0.25%胰蛋白酶(HyClone, USA),人参皂苷Rg1(吉林宏久生物技术有限公司,纯度≥95%),碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),RT-PCR试剂盒、SYBRGreenI(Ferments,立陶宛),Trizol Reagent(Invitrogen,USA),2×PCR Mastermix(Biomed,北京),骨钙素放免检测试剂盒(北京福瑞生物制品公司),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) ELISA试剂盒(武汉新启迪生物科技有限公司),倒置相差显微镜(Olympus, Japan),酶联免疫检测仪(Biorad, USA),Real time PCR仪(Applied biosystems, USA)。

1.2 方法

1.2.1 PDLSCs的分离培养 参照Seo等[2]的方法,经患者知情同意后,收集临床上12~18岁因正畸拔除的完整、健康前磨牙。无菌PBS反复冲洗,无菌条件下刮下根中1/3牙周膜组织,并剪成约1 mm×1 mm×1 mm的组织块,移入15 mL离心管内,加入3 mg/mL的Ⅰ型胶原酶和4 mg/mL的Dispase酶消化液,37 ℃消化1 h。收集细胞,用含10% FBS、2 mmol/L的L-谷胺酰胺、青霉素、链霉素各100 U/mL的DMEM培养液重悬,调整细胞数为1×10^4/mL,接种于6孔板,置5% CO_2、相对湿度100%、37 ℃恒温培养箱中培养,5 d后更换培养液,弃去未贴壁的细胞,以后每3天换液1次,并收集对数生长期的培养上清液备用。细胞生长达80%时,用胰酶消化传代。将收集的培养上清液离心过滤后,与10% FBS的DMEM培养基以1∶1混合作为克隆化培养的适应性培养基。取对数生长期的原代细胞,用适应性培养基倍比稀释,调整细胞数至(10~15)/mL,充分吹打混匀,接种于96孔板,每孔0.1 mL,培养12 h后标记单个细胞孔,隔天换液,待长满孔底后胰酶消化,扩大培养。

1.2.2 免疫细胞化学鉴定PDLSCs细胞表型 取第3代PDLSCs以1×10^4/mL细胞数接种底部放有盖玻片的24孔板内,48~72 h后取出盖玻片,4%多聚甲醛固定10 min。参照试剂盒说明书,S-P法进行抗Stro-1和抗CD146免疫细胞化学染色,DAB显色,苏木精复染,常规脱水、透明、封片,光镜下观察。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖情况 将生长良好的第3代PDLSCs以1×10^4/mL细胞数接种于96孔培养板中,每孔100 μL。用含10% FBS的DMEM培养液培养24 h,弃去培养液及未贴壁的细胞。实验组加入终浓度分别为0.25、0.5、1、2、4 μmol/L的人参皂苷Rg1培养,每孔200 μL,每组设6个复孔,对照组仅用含10% FBS的DMEM培养液培养。培养1、3、5 d,每孔加入5 g/L MTT 20 μL继续培养4 h弃去上清液,加二甲基亚砜每孔150 μL,震荡10 min,使结晶物充分溶解,用酶联仪测定每孔在波长570 nm处的光密度值[$D(570)$]。

1.2.4 流式细胞仪细胞周期分析 将生长良好的第3代PDLSCs以1×10^4/mL细胞数接种于6孔培养板中培养,用含10% FBS的DMEM培养液孵育24 h。弃去培养液及未贴壁的细胞。将对照组和终浓度为1 μmol/L的人参皂苷Rg1组分别培养3 d,收集细胞,用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.5 ALP活性测定 将第3代PDLSCs以1×10^4/mL细胞数接种于96孔培养板,培养细胞达80%汇合。弃去原培养液,实验组加入终浓度为1 μmol/L的人参皂苷Rg1培养,分别在培养的第3、7、14天弃培养液,按ALP试剂盒所示步骤检测,用酶联免疫检测仪测波长410 nm处的光密度值[$D(410)$]。

1.2.6 实时荧光定量RT-PCR检测OCN mRNA的表达 取第3代PDLSCs,按1×10^5/mL细胞数接种于培养瓶,培养14 d后收集细胞,提取细胞总RNA。按试剂盒说明书将RNA反转录成cDNA。PCR引物设计与合成:从GenBank中查找到人OCN基因序列,由大连宝生物公司合成。OCN上游引物:5′-ATGAGAGCCCTCACA-3′,下游引物:5′-AGAGCGACACCCTAGAC-3′,片段长度为216 bp;GAPDH上游引物:5′-AGTCCACTGGCGTCTTCA-3′,下游引物:5′-CGGACTTCTCATGGTTCACAC-3′,片段长度为132 bp。荧光定量RT-PCR:反应体系:2×PCR Mastermix 10 μL,上游引物0.5 μL,下游引物0.5 μL,cDNA 1 μL,DEPC水补足体积至20 μL。反应条件:94 ℃预变性2 min,94 ℃ 15 s,56 ℃ 10 s,72 ℃ 30 s,共39个循环,72 ℃延伸2 min。定量结果用同一样本目的基因与内参基因GAPDH含量的比值作为评价目的基因表达水平的指标,以内参基因进行校正。

1.2.7 骨钙素定量检测 将生长良好的第3代PDLSCs以1×10^4/mL细胞数接种于24孔培养板中培养,每孔1 mL,用含10% FBS的DMEM培养液孵育24 h。弃去培养液及未贴壁的细胞。将对照组和终浓度为1 μmol/L的人参皂苷Rg1组分别培养14 d后,收集培养基上清液0.5 mL,按OCN试剂盒的操作步骤加样,充分混匀,于室温放置20 min,1 500 r/min离心15 min,弃上清,γ-闪烁仪计数。

1.2.8 人参皂苷Rg1对PDLSCs成纤维细胞生长因子表达的影响 将生长良好的第3代PDLSCs以1×10^4/mL细胞数接种于24孔培养板中培养,用含10% FBS的DMEM培养液孵育24 h。弃去培养液及未贴壁的细胞。将对照组和终浓度为1 μmol/L的人参皂苷Rg1组分别培养3、7 d后,采用bFGF ELISA试剂盒,按试剂盒操作说明书检测bFGF含量。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件,MTT和ALP结果采用析因设计方差分析,组间多重比较采用SNK-q检验;细胞周期结果采用秩和检验;荧光定量、骨钙素和bFGF ELISA检测结果采用成组t检验。

2 结果

2.1 PDLSCs的分离鉴定

PDLSCs细胞形态呈长梭形,具有较强的克隆形成能力(图1),阳性表达间充质干细胞标志物Stro-1和CD146(图2)。

2.2 MTT法检测细胞增殖情况

人参皂苷Rg1对PDLSCs的增殖有明显促进作用。与对照组比较,浓度为0.5、1、2 μmol/L的人参皂苷Rg1能明显提高PDLSCs的增殖能力($P<0.05$),其中浓度为1 μmol/L的促增殖作用最强(表1)。

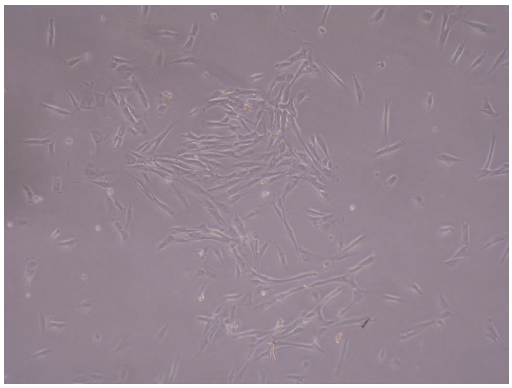
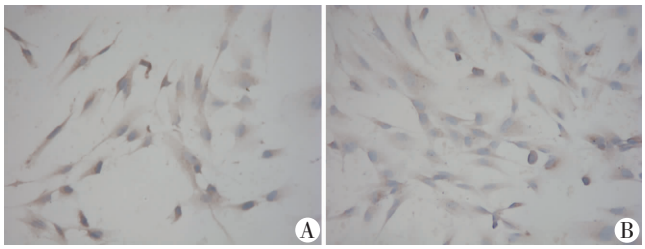


图1 倒置显微镜观察克隆生长的PDLSCs （×100）



A：Stro-1；B：CD146

图2 PDLSCs表面标志物免疫细胞化学染色观察 （S-P ×200）

表1 MTT法测定人参皂苷Rg1对PDLSCs增殖活性的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	培养1 d	培养3 d	培养5 d
对照组	0.186±0.005	0.353±0.006	0.499±0.004
人参皂苷Rg1组			
0.25 μmol/L	0.193±0.005	0.364±0.008	0.488±0.006
0.5 μmol/L	0.199±0.005	0.459±0.006[ab]	0.588±0.007[ab]
1 μmol/L	0.271±0.008[a]	0.573±0.023[a]	0.689±0.008[a]
2 μmol/L	0.201±0.005	0.509±0.004[ab]	0.591±0.002[ab]
4 μmol/L	0.200±0.013	0.377±0.009	0.505±0.004

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与1 μmol/L人参皂苷Rg1组比较

2.3 细胞周期检测

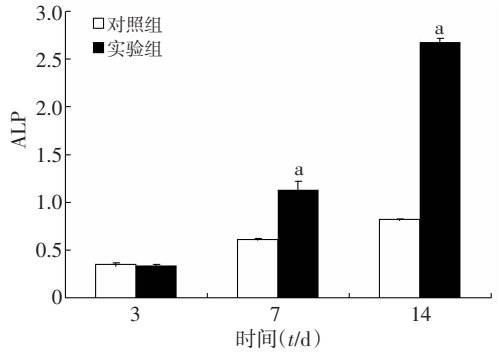
1 μmol/L人参皂苷Rg1组与对照组相比，DNA合成前期（G_0/G_1期）细胞所占百分比有所减少，而DNA合成期（S期）细胞百分比有所增多；反映细胞增殖活力的PrI增殖指数（$S+G_2/M$）实验组（44.07±0.47）较对照组（19.78±0.50）明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），提示人参皂苷Rg1有明显促进PDLSCs增殖的作用。

2.4 ALP活性的测定

PDLSCs在1 μmol/L人参皂苷Rg1作用下分别培养3、7、14 d，其ALP活性呈时间依赖性增高。从第7天开始，人参皂苷Rg1组的ALP活性明显高于同一时间点对照组（$P<0.05$，图3）。

2.5 实时荧光定量RT-PCR检测OCN mRNA表达

PDLSCs在加入1 μmol/L人参皂苷Rg1培养14 d后，实验组OCN mRNA的表达明显高于对照组[（2.16±0.04）*vs*（0.56±0.04），$P<0.05$]。



a：$P<0.05$，与对照组比较

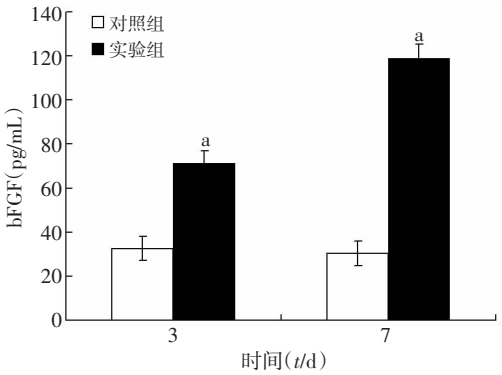
图3 1 μmol/L人参皂苷Rg1对牙周膜干细胞ALP活性的影响

2.6 骨钙素定量检测

PDLSCs在1 μmol/L人参皂苷Rg1作用下培养14 d后，实验组骨钙素含量明显高于对照组[（3.20±0.14）*vs*（0.91±0.06），$P<0.05$]。

2.7 人参皂苷Rg1对PDLSCs bFGF表达的影响

与对照组比较，1 μmol/L人参皂苷Rg1在第3天即可显著增加PDLSCs bFGF的表达（$P<0.05$，图4）。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图4 1 μmol/L人参皂苷Rg1对牙周膜干细胞bFGF表达的影响

3 讨论

牙周病可导致牙周附着丧失、牙槽骨破坏和吸收。牙周病治疗的目的在于控制炎症，消除病变，促进牙周组织再生。研究发现牙周膜干细胞具有自我更新和多向分化潜能，不仅能分化为成牙骨质细胞和成骨细胞，形成牙骨质和骨样组织，而且还可以分化为成纤维细胞，形成类似天然牙周膜样结构[2,6]。然而在牙周病损部位牙周膜干细胞的来源有限，很难达到有效的再生和重建。因此，如何增加病变部位牙周膜干细胞的数量和活性是牙周组织再生的关键问题。

人参是我国传统中药，人参皂苷Rg1是人参中主要的活性成分，可促进体外培养的神经干细胞、骨髓基质细胞和牙髓细胞等多种细胞的增殖和分化[7-10]。人参皂苷可促进骨形成，能有效预防去卵巢大鼠的骨

量丢失[11]。本实验选用了中药单体人参皂苷 Rg1,研究其对 PDLSCs 增殖及成骨能力的影响。

牙周膜细胞具有异质性,牙周膜中存在多细胞亚群[12]。本实验按照 Seo 等[2]的方法,用酶消化法消化牙周膜组织,用有限稀释法进行克隆化培养,以从混合细胞中分离、纯化牙周膜干细胞。为提高克隆形成率并尽可能地保持牙周膜干细胞的未分化状态,本实验收集牙周膜细胞的培养上清制备成适应性培养基,成功地获得克隆化生长的牙周膜干细胞。对克隆分离培养细胞进一步进行免疫组化染色,结果显示 Stro-1 和 CD146 呈阳性染色。Stro-1 是干细胞分化早期的标志物,是间充质干细胞的标志之一[13]。MTT 结果显示,浓度为 0.5、1、2 μmol/L 的人参皂苷 Rg1 作用 PDLSCs 后,其体外增殖活性显著提高,且与其浓度密切相关,其中浓度为 1 μmol/L 的促增殖作用最强。增殖和分化是细胞生命活动的两个方面,增殖中的细胞其分化功能受到抑制,而分化中的细胞其增殖能力降低。本研究发现人参皂苷 Rg1 作用 PDLSCs 的初期(第 1、3、5 天)对 PDLSCs 有增殖作用,以后增殖作用逐渐减弱;对 PDLSCs 成骨分化作用,在人参皂苷 Rg1 作用 PDLSCs 7 d 后才检测到。因此,人参皂苷 Rg1 对 PDLSCs 的作用是先促进增殖,然后分化。碱性磷酸酶在骨和牙齿等矿化组织形成中起重要作用。ALP 活性增高被认为是组织发生矿化的前提条件[14]。通过测定 ALP 活性,可以反映 PDLSCs 向成骨分化的能力。本研究发现加入浓度为 1 μmol/L 的人参皂苷 Rg1 培养后,ALP 活性明显高于同一时间点对照组,人参皂苷 Rg1 能显著提高 PDLSCs 的 ALP 活性。

骨钙素(OCN)存在于骨骼、牙齿和其他矿化组织中[15],是矿化组织中含量最丰富的非胶原性蛋白质之一,可由成骨细胞、成牙骨质细胞和成牙本质细胞产生。OCN 是检验成骨细胞活性、反映骨更新的一项特异的生化指标,因此组织中 OCN 水平的变化可直接反映牙槽骨的骨形成和重建。本研究中人参皂苷 Rg1 可促进 PDLSCs 的成骨性分化,表达成骨细胞特异性基因骨钙素。

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,具有促进细胞增殖、分化和迁移等多种生物学效应,并参与血管及骨骼形成、神经发育和肿瘤代谢等生理和病理过程[16]。在牙齿的发育过程和牙槽骨形成中起着重要的调控作用。本研究发现 1 μmol/L 的人参皂苷 Rg1 作用 PDLSCs 后,可显著增加 PDLSCs bFGF 的表达。其具体机制尚待进一步研究。

本实验发现人参皂苷 Rg1 对体外培养的 PDLSCs 有促进增殖和成骨分化的作用,为促进牙周组织再生提供了新的理论依据和思路。

参考文献:

[1] Almeida-Porada G, Porada C, Zanjani E D. Adult stem cell plasticity and methods of detection[J]. Rev Clin Exp Hematol, 2001, 5(1): 26-41.

[2] 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.

[3] Gong L, Li S L, Li H, *et al*. Ginsenoside Rg1 protects primary cultured rat hippocampal neurons from cell apoptosis induced by β-amyloid protein[J]. Pharm Biol, 2011, 49(5): 501-507.

[4] Fang F, Chen X, Huang T, *et al*. Multi-faced neuroprotective effects of Ginsenoside Rg1 in an Alzheimer mouse model[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(2): 286-292.

[5] Shi A W, Gu N, Liu X M, *et al*. Ginsenoside Rg1 enhances endothelial progenitor cell angiogenic potency and prevents senescence *in vitro*[J]. J Int Med Res, 2011, 39(4): 1306-1318.

[6] Liu Y, Zheng Y, Ding G, *et al*. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine[J]. Stem Cells, 2008, 26(4): 1065-1073.

[7] 庄朋伟, 张艳军, 庞坦. 人参皂苷 Rg1 促进体外培养神经干细胞增殖的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(4): 443-446.

[8] Lu X Z, Wang J H, Wu X, *et al*. Ginsenoside Rg1 promotes bone marrow stromal cells proliferation via the activation of the estrogen receptor-mediated signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(10): 1209-1214.

[9] Wang P, Wei X, Zhou Y, *et al*. Effect of ginsenoside Rg1 on proliferation and differentiation of human dental pulp cells *in vitro*[J]. Aust Dent J, 2012, 57(2): 157-165.

[10] 王萍, 周玥, 王亚平. 人参皂苷 Rg1 协同 rhBMP-2 对人牙髓干细胞成牙分化作用研究[J]. 激光杂志, 2012, 33(3): 89-91.

[11] Shen Y, Li Y Q, Li S P, *et al*. Alleviation of ovariectomy-induced osteoporosis in rats by Panax notoginseng saponins[J]. J Nat Med, 2010, 64(3): 336-345.

[12] Mrozik K, Gronthos S, Shi S, *et al*. A method to isolate, purify, and characterize human periodontal ligament stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2010, 666: 269-284.

[13] Xu J, Wang W, Kapila Y, *et al*. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells[J]. J Stem Cells Dev, 2009, 18(3): 487-496.

[14] Ikeda H, Sumita Y, Ikeda M, *et al*. Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells[J]. Ann Biomed Eng, 2011, 39(1): 26-34.

[15] Zhang W, Walboomers X F, van-Osch G J, *et al*. Hard tissue formation in a porous HA/TCP ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(2): 285-294.

[16] Ornitz D M, Itoh N. Fibroblast growth factors[J]. Genome Biol, 2001, 2(3): REVIEWS3005.

(**收稿**:2012-12-25;**修回**:2013-02-26)

(编辑 张 维)