DOI:10.16016/j.1000-5404.201603090

大鼠牙囊干细胞与珊瑚羟基磷灰石陶瓷生物相容性和成骨作用研究

聂 利,王 明,曾兴琪,李洁仪,李丛华 (401147 重庆,重庆医科大学附属口腔医学院,口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室,重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室)

[摘要] **目的** 观察大鼠牙囊干细胞(rat dental follicle stem cells, rDFCs)在珊瑚羟基磷灰石生物玻璃陶瓷(coralline hydroxyapatite ,CHA)上的附着增殖以及成骨因子表达情况,探索二者间生物相容性。**方法** 10 只 6 d 龄 SD 大鼠,雌雄各半,处死后剥离双侧下颌骨磨牙区牙囊组织,通过组织块酶消化法获得 rDFCs,rDFCs 与 CHA 体外复合培养,扫描电镜(SEM)观察 rDFCs 与 CHA 黏附增殖情况,RT-PCR 法测定 rDFCs、rDFCs-CHA 及 rDFCs 成骨诱导组黏附增殖 5、7、9 d 成骨基因 OPN、ALP、Osterix 的表达。**结果** SEM 观察到 rDFCs 在 CHA 上能正常黏附、生长、增殖,4 d 时细胞开始相互接触,成片状黏附于 CHA 表面,7 d 时,细胞外基质已完全覆盖 CHA 表面。RT-PCR 结果显示 rDFCs 与 CHA 共培养 5、7、9 d 时,CHA 促进了成骨基因 OPN、ALP、Osterix 的表达,rDFCs-CHA 组与 rDFCs 组相比,Osterix 基因表达:7 d 时前者是后者 267 倍;OPN 基因表达:7 d 时是 24.7 倍,ALP 基因表达:5 d 时 rDFCs-CHA 组是 rDFCs 组的 3.1 倍($P<0.01$)。**结论** CHA 能促进 rDFCs 黏附、增殖、成骨分化及表达成骨因子,二者生物相容性良好。

[关键词] 牙囊干细胞;珊瑚羟基磷灰石生物玻璃陶瓷;扫描电镜;生物相容性;成骨分化
[中图法分类号] R318.08; R322.41; R329.2 [文献标志码] A

In vitro osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in coralline hydroxyapatite bioglass ceramics

Nie Li, Wang Ming, Zeng Xingqi, Li Jieyi, Li Conghua (Chongqing Key Laboratory of Oral Disease and Biomedical Sciences, Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 401147, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the proliferation and expression of osteogenic factors of rat dental follicle stem cells (rDFCs) on coralline hydroxyapatite (CHA) in order to assess the biocompatibility of rDFCs and CHA. **Methods** Ten 6-day-old SD rats of both sexes were sacrificed for the dental follicle tissues, and then the rDFCs were isolated by enzymatic digestion. The obtained cells were cultured with CHA *in vitro*. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the adhesion of rDFCs on/in CHA. RT-PCR was employed to detect the expression of the osteogenic genes, osteopontin (OPN), alkaline phosphatase (ALP) and Osterix in the rDFCs-CHA on 5, 7 and 9 d after co-culture and the rDFCs in presence and absence of osteogenic differentiation for the same periods. **Results** SEM showed that rDFCs could adhere, grow and proliferate on CHA, and began to merge on the surface of CHA after 4 days' co-culture, and extracelluar martix completely covered the CHA surface on the 7th day. RT-PCR analysis indicated that CHA promoted the expression of osteogenic genes OPN, ALP and Osterix after 5, 7 and 9 days' co-culture of rDFCs and CHA. Compared to the rDFCs group, Osterix was expressed by 267 times higher on day 7, OPN was 24.7 times higher on day 7, and ALP genes was 3.1 times on day 5 in the rDFCs-CHA co-culture group ($P<0.01$).

[基金项目] 重庆市卫计委重点项目(2012-1-056)
[通信作者] 李丛华,电话:023-65714733,E-mail:liconghua@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160601.0840.006.html(2016-06-01)

Conclusion CHA promotes the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of rDFCs. And rDFCs and CHA are of good biocompatibility.

[**Key words**] rat dental follicle stem cells; coralline hydroxyapatite bioglass ceramics; scanning electron microscopy; biocompatibility; osteogenic differentiation

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission (2012-1-056). Corresponding author: Li Conghua, Tel: 86-23-65714733, E-mail: liconghua@163.com

牙周炎是口腔常见病与多发病,是人类缺牙的主要原因,主要表现为牙龈出血、牙周溢脓、牙槽骨吸收和牙周袋形成,恢复丧失的牙周骨组织一直是临床上的重点与难点,牙周组织工程技术为治疗提供了新思路[1]。rDFCs(rat dental follicle stem cells, rDFCs),是形成牙周组织的前体细胞[2],CHA 作为优良的植骨材料被广泛地应用于临床骨缺损病例中[3],本实验拟观察 rDFCs 在 CHA 上的黏附增殖与成骨分化,初步探讨 rDFCs 与 CHA 应用于牙周组织工程的可行性,为后期 rDFCs 与 CHA 复合物应用于体内牙周骨组织再生提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

PBS、DMEM/F12(Hyclone 公司)、fetal bovine serum(FBS)、0.25% 胰酶、双抗(Gibico 公司)、Ⅰ型胶原酶、地塞米松、抗坏血酸、β-磷酸甘油(Sigma 公司)、戊二醛、4% 多聚甲醛、茜素红染液(索莱宝公司)、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)、手术器械包。本实验所使用的 CHA 由天博固齿公司提供,以天然珊瑚为原料,经加工制成成品-珊瑚羟基磷灰石生物玻璃陶瓷(coralline hydroxyapatite ,CHA)。

成骨诱导培养基(DMEM/F12、1% 双抗、10% FBS、10 mmol/L 地塞米松、50 mg/L 抗坏血酸,100 nmol/L β 磷酸甘油),普通培养基(DMEM/F12、1% 双抗、10% FBS)

1.2 方法

1.2.1 rDFCs 的原代培养 rDFCs 的原代培养与分离纯化方法参照本课题组前期实验操作步骤[4]。取 10 只 SD 大鼠下颌牙囊组织,酶组织块消化法及梯度离心消化法获取纯化的 rDFCs。细胞每 2 ~ 3 天换液,细胞融合度达 80% 左右时按 1∶2传代,观察记录每代细胞形态。

1.2.2 rDFCs 的成骨诱导茜素红染色 取生长状态良好第 3 代 rDFCs,弃去培养液,PBS 清洗,0.25% 胰酶消化,离心力 150 × g,离心 3 min,重悬后接种于 24 孔板内,待细胞约 80% 贴壁时设普通培养基组,成骨诱导培养基组,每 2 ~ 3 天换液,连续培养 21 d 后进行茜素红染色,PBS 清洗,4% 多聚甲醛(200 μL/孔)室温固定 30 min,PBS 清洗后加入茜素红染色液,常温孵育 20 min,移去染色液后显微镜下观察并记录实验结果。

1.2.3 rDFCs 与 CHA 支架材料黏附实验 取第 3 代rDFCs,普通培养基重悬细胞,调节细胞浓度至 2 × 10^6个/mL。CHA 浸泡于普通培养基中 2 h 后,弃去培养基,吸取细胞悬液 500 μL 缓慢滴加于 CHA,使细胞悬液充分进入 CHA 空隙内部,4 h 后加足普通培养基,每天换液。分别取复合 1 ~ 7 d 的细胞支架复合物,吸走培养基,PBS 清洗两遍,放入 2% 戊二醛中固定,梯度酒精脱水,然后乙酸异戊酯置换酒精,CHA 及 rDFCs-CHA 复合物干燥后喷金,扫描电镜下观察细胞黏附情况。

1.2.4 CHA 促进 rDFCs 成骨标志物表达实验 取生长良好的第 3 代 rDFCs,消化离心重悬,调节细胞浓度至 2 × 10^6个/mL。实验分组及处理如下,rDFCs 组:rDFCs 组取 1 mL 细胞悬液直接加入 6 孔板中,补足普通培养基;rDFCs 成骨诱导组:取 1 mL 细胞悬液至于 6 孔板中,2 h 后细胞贴壁更换成骨诱导培养基;rDFCs-CHA 复合组:50 mg CHA 提前浸泡于普通培养基中 2 h,吸走 CHA 中培养基,吸取细胞悬液 1 mL 缓慢滴加于 CHA 表面,4 h 后补足普通培养基。每 2 ~ 3 天换液 1 次。分别于第 5、7、9 天进行 RT-PCR,检测成骨相关基因 OPN、ALP、Osterix 的表达情况,按 TaKaLa 试剂盒提取 RNA,反转录及 RT-PCR,引物序列如下:Beta-actin 上游:5′-CCCGCGAGTACAACCTTCTTG-3′,下游:5′-GTCATCCATGGCGAACTGGTG-3′;ALP 上游:5′-CCTGCAGGATCGGAACGTCAATTA-3′,下游:5′-TGAGTTGGTAAGGCAGGGTCC-3′;OPN 上游:5′-CCAGCCAAGGACCAACTACA-3′, 下 游: 5′-AGTGTTTGCTGTAATGCGCC-3′; osterix 上 游: 5′-GCCAGTAATCTTCGTGCCAG-3′, 下 游: 5′-TAGTGAGCTTCTTCCTGGGGA-3′(Order-No. 14529)。

1.3 统计学方法

实验中所有数据采用 SPSS 20.0 软件分析,两组

间比较用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rDFC 是原代培养及细胞形态观察

组织块酶消化法消化大鼠牙囊组织,组织块在贴壁后细胞爬出,4~5 d 铺满瓶底约 80%,单层排列,形态存在多形性,主要以多角形、长梭形两种形态存在(图 1A)。原代细胞中见较多杂细胞,经梯度消化法传至第 3 代时,细胞基本已达到纯化(图 1B)。本课题组前期实验已对 rDFCs 进行了细胞鉴定[2],免疫组化 rDFCs 波形蛋白表达阳性,角蛋白表达阴性,流式细胞术中 CD31、CD146、Stro-1 阳性,rDFCs 来源于间充质干细胞,具有干细胞特性。

2.2 rDFCs 的成骨诱导茜素红染色

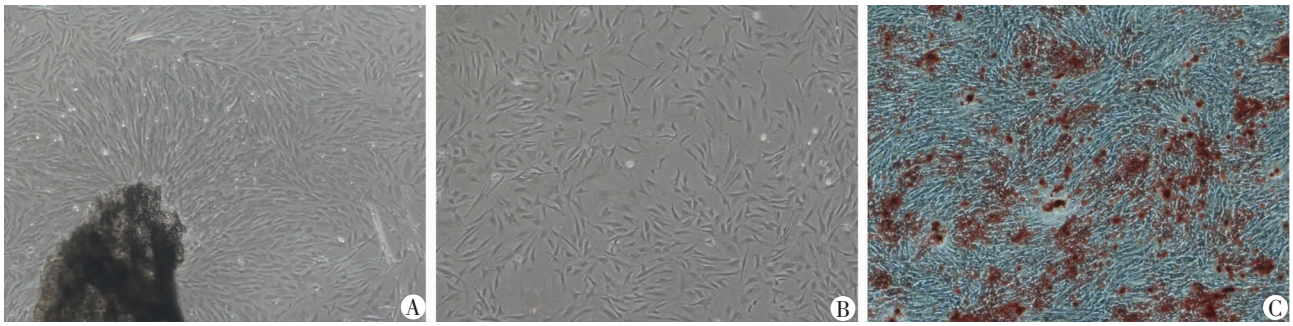
倒置显微镜下观察 rDFCs 成骨诱导培养 21 d 后茜素红染色结果,普通培养基组未见明显的钙盐沉积和钙结节形成,成骨诱导组可见散在的橘红色钙结节(图 1C)。

2.3 rDFCs 与 CHA 黏附实验

扫描电镜(SEM)下观察到 CHA 孔隙多且孔孔相通,空隙大小在 100~600 μm(图 2A),培养 24 h 时,rDFCs 已于 CHA 表面形成牢固的黏附,细胞呈成长梭形、不规则形,并有伪足伸出(图 2B),随着时间推移 rDFCs 逐渐增多并有向 CHA 空隙内部生长趋势,呈跨孔生长,4 d 时细胞分泌的胞外基质相互接触,开始成片状黏附于 CHA 表面(图 2C),7 d 时,rDFCs 及其分泌的胞外基质已完全覆盖 CHA 表面(图 2D)。

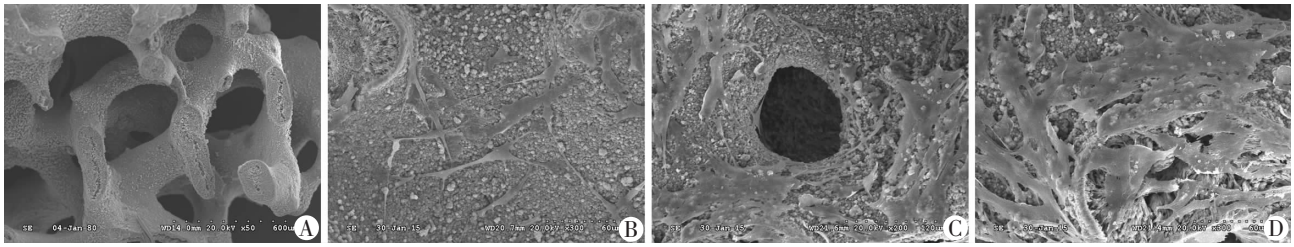
2.4 CHA 促进 rDFCs 成骨标志物表达实验

在第 5、7、9 d 对 3 个组应用 RT-PCR 对 ALP、OPN、Osterix 基因分析。在第 5、7 天时,rDFCs 成骨诱导组和 rDFCs-CHA 组 Osterix 基因表达差异无统计学意义($P>0.05$),表明 CHA 促 rDFCs 表达Osterix 基因表达与成骨诱导液诱导 rDFCs 基因表达量一致。其余各时间点及各组间比较中,rDFCs-CHA 组成骨相关基因表达明显高于 rDFCs 组($P<0.01$),但小于成骨诱导组,差异有统计学意义($P<0.01$)。rDFCs-CHA 组与 rDFCs 组相比,Osterix 基因表达:5 d 时 rDFCs-CHA 组是 rDFCs 组的 36.9 倍,7 d 时是 267 倍,9 d 时是 94.9 倍, OPN 基因表达:5 d 时 rDFCs-CHA 组是 rDFCs 组的 6.2 倍,7 d 时是 24.7 倍,9 d 时是 29.2 倍;ALP 基因表达:5 d 时 rDFCs-CHA 组是 rDFCs 组的 3.1 倍,7 d 时是 1.3 倍,9d 时是 2.9 倍(图 3)。



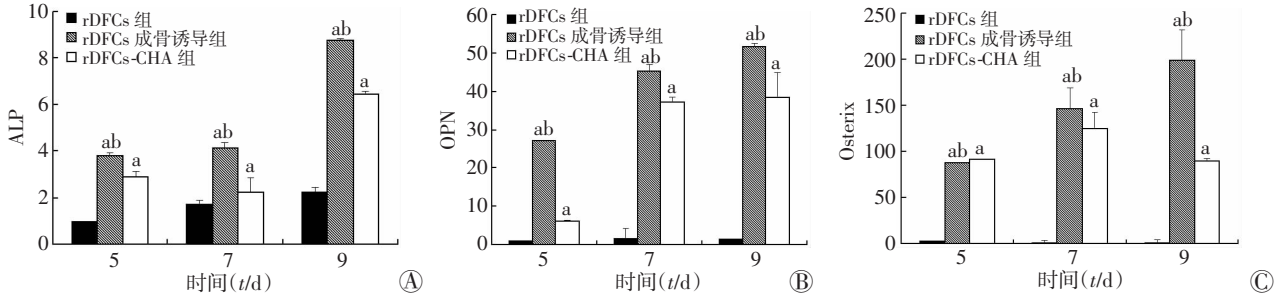
A:原代 rDFCs;B:第 3 代;C:第 3 代 rDFCs 成骨诱导 21 d 后

图 1 倒置显微镜观察 rDFCs 原代和第 3 代 rDFCs 形态及 rDFCs 成骨诱导 21 d 后茜素红染色显色染成橘红色的钙结节 (×40)



A:CHA 三维多孔疏松结构(×50);B:rDFCs 定植于 CHA 表面 2 d(×500);C:rDFCs 定植于 CHA 表面 4 d 时材料表面已有细胞外基质覆盖(×200);D:rDFCs 在 CHA 表面生长 7 d 后分泌的细胞外基质覆盖在材料大部分表面(×500)

图 2 扫描电镜观察 CHA 及 rDFCs 定植于 CHA 表面后 CHA 表面的变化



A:ALP;B:OPN;C:Osterix a:$P<0.01$,与 rDFCs 组比较;b:$P<0.01$,与 rDFCs-CHA 组比较

图 3 RT-PCR 定量检测 CHA 促进 rDFCs 表达 ALP、OPN、Osterix 基因 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

临床病例中牙周病的治疗方法有龈上洁治、龈下刮治、药物缓释治疗、物理治疗、牙周手术治疗等,虽然能有效清除牙菌斑和牙结石,控制牙周炎症,但并不能有效恢复丧失的牙周骨组织,故恢复牙周骨缺损成为牙周炎治疗的热点与难点,也是牙周组织再生的关键。为解决这一难题,许多学者开辟了新的方法,组织工程技术被认为是牙周骨组织再生的有效方法[5-6]。种子细胞和支架材料是组织工程技术两个非常重要的因素[7-8],现仍然处于研究阶段。本实验选择 rDFCs 作为种子细胞,CHA 作为支架材料进行体外研究。本实验通过组织块酶消化法和梯度离心消化法从牙囊组织中分离纯化获取 rDFCs,rDFCs 是形成牙周组织的前体细胞,即可分化形成牙骨质,牙周膜和固有牙槽骨[2]。Wise[9]首次分离培养出大鼠牙囊细胞(rDFCs),而后学者研究发现 rDFCs 表达干细胞表面标志物,如 Stro-1、Notch-1、nestin,鉴定得知 rDFCs 来源于间充质干细胞[4],具备干细胞特性[10],有多向分化潜能,一定诱导条件下,能向成骨细胞分化[4]。文献[3]报道 CHA 可作为组织工程化骨良好的支架。多孔的 CHA 三维结构类似于骨组织,具有骨诱导作用,含钙、磷成分,在体内能游离到材料表面,机体吸收代谢后形成新的骨组织,已应用于组织工程研究[11-12]。本实验探讨了 rDFCs 与 CHA 二者间生物相容性及 CHA 对 rDFCs 成骨向分化影响,为 rDFCs 与 CHA 体外形成组织工程化骨用于动物实验提供体外实验依据。

本研究发现在 rDFCs 植入 CHA 7d 后,SEM 观察到 rDFCs 及其分泌的胞外基质已完全覆盖 CHA 表面。这说明 rDFCs 能稳定黏附伸展于 CHA,并能在 CHA 表面及内部空隙内稳定生长增殖,证明 rDFCs 与 CHA 二者生物相容性良好。国内外研究认为 CHA 拥有良好的细胞相容性[13-15],骨髓间充质干细胞(BMSCs)能在 CHA 表面及空隙侧壁黏附,能作为组织工程支架材料应用于动物实验,与本研究 rDFCs 与 CHA 的黏附增殖实验结果相似。这可能是因为 CHA 的多孔三维的特殊表面结构,因其骨诱导性从而有利于的细胞的黏附增殖[13-14]。

本研究也发现,在细胞培养 5、7、9 d 时,rDFCs-CHA 组成骨相关基因 ALP、OPN、Osterix 表达明显高于 rDFCs 组($P<0.01$)。ALP、OPN、Osterix 三者为细胞向成骨细胞分化不同时期所表达的重要标志物,ALP 为早中期成骨分化指标 OPN 和 Osterix 为中、晚期矿化组织的重要检测指标,表达量越高说明细胞矿化能力越强,向成骨方向分化能力越强。研究发现 CHA 具有促进 BMSCs 成骨向分化的作用[13],严宁等[15]将成骨细胞与 CHA 共培养,发现 CHA 并不影响成骨细胞功能,且在共培养 2、8 d 时,其促进了成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)的表达,与本研究 rDFCs 与 CHA 体外共培养实验结果相似。CHA 具有促进 rDFCs 的成骨向分化的作用,这可能基于它的特殊三维结构和与骨组织相似的化学成分,CHA 来源于天然珊瑚,孔隙率 30% ~70%,孔径 100 ~600 μm,排列规则,其多孔的三维结构与人松质骨骨小梁结构相似,能诱导新生骨组织长入孔内,为形成组织工程化骨起着良好的支架作用[16-17],CHA 主要成分为羟基磷灰石,占 90% 以上,所含钙、磷成分能游离到材料表面,为细胞成骨向分化提供必要的营养成分。本实验结果也表明 CHA 促进了 rDFCs 的成骨向分化,具有骨诱导作用。

综上所述,本研究表明 rDFCs 能良好黏附伸展于 CHA 表面,且稳定生长增殖,二者生物相容性好;CHA 能促进 rDFCs 成骨相关基因 ALP、OPN、Osterix 的表达。CHA 作为支架材料在体外能促进 rDFCs 向成骨细胞分化,表达成骨相关基因。本实验为下一步动物体内研究提供了理论基础。但是否在加入一种生长因子后 CHA 的促成骨作用更强尚需要进一步实验研究。

CHA 与 rDFCs 的复合物在体内是否具有成骨作用还需进一步研究。

参考文献:

[1] Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(5110): 920-926.

[2] Bosshardt D D, Schroeder H E. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars[J]. Anat Rec, 1996, 245(2): 267-292.

[3] Luo Z B, Zhang Q B, Zhang Z Q, *et al*. Performance of coralline hydroxyapatite in sinus floor augmentation: a retrospective study[J]. Clin Oral Invest, 2013, 17(9): 2003-2010. DOI: 10.1007/s00784-013-0922-6

[4] Li C, Yang X, He Y, *et al*. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(10): 862-871. DOI: 10.7150/ijms.5027

[5] Xu L, Lv K, Zhang W, *et al*. The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB, BMSCs, and beta-TCP scaffolds[J]. J Mater Sci Mater Med, 2012, 23(4): 1073-1084. DOI: 10.1007/s10856-012-4558-x

[6] Eick S, Strugar T, Miron R J, *et al*. *In vitro*-activity of oily calcium hydroxide suspension on microorganisms as well as on human alveolar osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts[J]. BMC Oral Health, 2014, 14: 9. DOI: 10.1186/1472-6831-14-9

[7] Wan W, Zhang S, Ge L, *et al*. Layer-by-layer paper-stacking nanofibrous membranes to deliver adipose-derived stem cells for bone regeneration[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 1273-1290. DOI: 10.2147/IJN.S77118

[8] Liu G, Zhang Y, Liu B, *et al*. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold[J]. Biomaterials, 2013, 34(11): 2655-2664. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.004

[9] Wise G E, Lin F, Fan W. Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars[J]. Cell Tissue Res, 1992, 267(3): 483-492.

[10] Vollkommer T, Gosau M, Felthaus O, *et al*. Genome-wide gene expression profiles of dental follicle stem cells[J]. Acta Odontol Scand, 2015, 73(2): 93-100. DOI: 10.3109/00016357.2014.956143

[11] 李丛华, 向学熔, 杨霞. 152 例胶原生物膜联合羟基磷灰石生物陶瓷治疗牙周和根尖骨缺损的临床疗效分析[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(7): 744-747. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.07.038

[12] Vacanti C A. The impact of biomaterials research on tissue engineering[J]. MRS Bull, 2001, 26(10): 798-799. DOI: 10.1557/mrs2001.207

[13] Bjerre L, Bunger C, Baatrup A, *et al*. Flow perfusion culture of human mesenchymal stem cells on coralline hydroxyapatite scaffolds with various pore sizes[J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 97(3): 251-263. DOI: 10.1002/jbm.a.33051

[14] Khetan S, Burdick J A. Patterning network structure to spatially control cellular remodeling and stem cell fate within 3-dimensional hydrogels[J]. Biomaterials, 2010, 31(32): 8228-8234. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.035

[15] 严宁, 张汉东, 周磊, 等. Y500R 可吸收珊瑚羟基磷灰石人工骨体外成骨细胞相容性研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2006, 22(8): 456-459. DOI: 10.3969/j.issn.1003-1634.2006.08.003

[16] Georgiannos D, Lampridis V, Bisbinas I. Phenolization and coralline hydroxyapatite grafting following meticulous curettage for the treatment of enchondroma of the hand. A case series of 82 patients with 5-year follow-up[J]. Hand (N Y), 2015, 10(1): 111-115. DOI: 10.1007/s11552-014-9674-2

[17] Kumar G, Tison C K, Chatterjee K, *et al*. The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape[J]. Biomaterials, 2011, 32(35): 9188-9196. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.054

(**收稿**:2016-02-26;**修回**:2016-04-26)

(编辑 栾 嘉)