doi:10.11659/jjssx.04E016044

釉原蛋白对人牙周膜干细胞迁移、粘附及增殖能力的影响

赵 希,熊 宇 (第三军医大学西南医院口腔科;重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探究釉原蛋白(AML)对牙周膜干细胞(PDLSCs)迁移、粘附和增殖的影响。**方法** 流式细胞仪分选 Stro-1 + PDLSCs,采用 Transwell 法检测 AML 对 PDLSCs 迁移的影响,粘附实验检测 AML 对 PDLSCs 粘附的影响,MTT 检测 AML 对 PDLSCs 增殖能力的影响。**结果** Transwell 结果显示,AML 能够作用于 PDLSCs,促进其迁移,并且此影响呈正相关;粘附实验结果显示,PDLSCs 的粘附同样受 AML 的影响,该作用随培养时间延长而增加;MTT 结果显示,AML 能够促进 PDLSCs 增殖,且随着剂量增加该促进作用增强。**结论** 体外 AML 能够作用于 PDLSCs,促进其迁移、粘附和增殖。

[关键词] 牙周膜干细胞;釉原蛋白;迁移;增殖;粘附
[中图分类号] R781.4 +2 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-04-13

Effect of amelogenin on the migration, adhesion and proliferation of periodontal ligament stem cells

ZHAO Xi[1], XIONG Yu[2] (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of amelogenin (AML) on the migration, adhesion and proliferation of periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Methods** STRO-1 + PDLSCs were selected by Flow cytometer. The transwell system was used to detect the effect of AML on migration of PDLSCs. Cells attachment assay was used to detect the effect of AML on adhesion of PDLSCs. MTT was used to detect the effect of AML on the proliferation of PDLSCs. **Results** The results of transwell showed that AML could induce the migration of PDLSCs with positive correlation. Cells attachment assay showed that the adhesion of PDLSCs was effected by AML as well, and the effect was increased with the extension of incubation time. Results of MTT showed that AML could promote the proliferation of PDLSCs in a dose dependent manner. **Conclusion** AML could increase the proliferation, adhesion and migration potential of PDLSCs.

Keywords: PDLSCs; amelogenin; migration; adhesion; proliferation

慢性牙周炎是成人最常见的口腔疾病之一,严重影响人们的口腔健康和生活质量,是成人丧失牙齿的重要原因。慢性牙周炎对成人牙周组织形成慢性破坏性损伤,使得牙周组织缺损,进而导致牙齿的松动、脱落[1]。近年来,牙周组织再生成为治疗牙周组织损伤的研究热点,目前关于牙周组织再生的研究主要集中在牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSCs)移植的方法[2-4],然而,其具体再生作用机制仍不明确。PDLSCs 因具有多向分化潜力及牙周再生能力,受到越来越多的关注[5-8]。釉原蛋白(Amelogenin, AML)是釉基质蛋白的主要成分,研究发现 AML 有促进牙周组织再生修复的作用[9],但其机制还不清楚。本实验通过探讨 AML 对 PDLSCs 的增殖、迁移及粘附的作用,以期为 AML 促进牙周组织再生修复作用机制的的阐明提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Ⅰ型胶原酶、胰蛋白酶(Biochem, USA),DMEM (Sigma-Aldrich USA),胎牛血清 (Biocell, USA),1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen, USA),STRO-1 IgM 抗体(Invitrogen,美国),10% formalin(Fischer Scientific, USA),violet blue(Sigma-Aldrich, USA),碱性磷酸酶试剂盒(碧云天公司,中国);Transwell 孔板(corning,美国),MTT 液(Invitrogen,美国);茜素红(Sigma,美国);吲哚美辛(Sigma,美国);胰岛素(Sigma,美国);流式细胞仪(Beckman Coulter, Fullerton,美国);倒置相差显微镜(OlympusIX70 日本);酶联免疫检测仪(BIOTEK 美国)。

1.2 PDLSCs 的收集、分离及培养

选取 2015 年 7 月 1 日至 2015 年 9 月 1 日于我科门诊口腔科因正畸原因拔除的健康上下第一前磨牙就诊的 12 ~ 15 周岁在校学生。经患者及其家属知情同意后,将拔除健康牙体组织在超净工作台内备用。用含 1% 双抗的 PBS 反复冲洗后,用 15 号手术刀由牙冠方向往牙根方向进行碟瓦式单向由上至下搔刮,分离上述前磨牙牙根中 1/3 处牙周膜,收集、离心,弃上清,用 3 mg/mL Ⅰ型胶原酶和 4 mg/mL 胰蛋白酶、37 ℃消化 1 h;将分离得到的细胞置入含 10% 胎牛血清的 10 cm 培养皿 DMEM 培养基内,在设置培养条件为

[基金项目] 重庆市卫生计生委科研项目(2015XMSB0001369)
[通信作者] 熊 宇,E-mail:xytmmu@163.com

37 ℃, 5% CO_2培养箱中培养,3 d后在显微镜视野内观察培养的细胞形态。

1.3 流式细胞仪检测 FACS 鉴定分选

胰酶消化分离培养后的 PDLSCs 细胞,收集于离心管内,待高速离心结束后,倒出上清液,利用 PBS 轻轻吹打,并重悬。放置于0 ℃环境 20 min,STRO-1 IgM 抗体(2l g/mL)孵育 1 h。使用流式细胞仪分选 STRO-1 + 细胞,即得到 PDLSCs,将细胞进行传代培养,使用第 2 代细胞进行后续实验。

1.4 多向分化检测

取第 2 代 PDLSCs 以 5×10^4/mL 的细胞浓度,加入24 孔板中,24 h 恒温 37 ℃培育,然后将培养液更换为成骨诱导液或是成脂诱导液,倒置显微镜视野下观察,72 h 更换培养液 1 次。从第 1 次换液到最后一次换液,时长 3 周,3 周后成骨诱导组采用茜素红染色,观察培养板内矿化结节形成情况;油红‘O’染色行成脂诱导,观察脂滴形成情况。

1.5 MTT 细胞增殖检测

将 PDLSCs 按 4×10^4 个/孔浓度种于 96 孔板,在不同浓度的 AML(0、25、50、100 μg/mL)培养液中培养 48 h,每孔加入 10 μL MTT 试剂,细胞培养箱内孵育 2 h,置于摇床震动 1 min 混匀体系,用 570 nm 波长测定各孔吸光度(OD)值。

1.6 细胞粘附实验

取 24 孔板,加入含 AML 的 PBS 每孔 2 mL,对照组加入等量的 PBS,静置 16 h 后,用 PBS 清洗。加入 PBS(含 3% BSA),放置 2 h 且不再摇床震动。将 PDLSCs 按每孔 3×10^4 接种于孔板中,于 37 ℃培养箱中分别培养 4 h 和 8 h 后,用 PBS 轻轻洗去未粘附细胞,收集粘附于孔板的 PDLSCs 进行计数。

1.7 Transwell 检测 PDLSCs 迁移

取 12 孔板,孔内放置 Transwell 小室,以 2×10^5/mL 的浓度将第 2 代 PDLSCs 接种于上室,下室加入 AML 或者 10% FBS DMEM 培养液,37 ℃恒温条件下培养 10 h。对迁移过小室底薄膜、粘附在小室底部的 PDLSCs 进行固定、染色,倒置显微镜视野下计数。

1.8 统计分析

采用 SPSS 11.0 软件分析。单因素方差分析用于多组实验数据比较,而两组独立样本组间数据分析则采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PDLSC 形态观察

流式细胞仪分选出 Stro-1 + 细胞(图 1 方框内红色标记),有限稀释法培养提纯 PDLSC,显微镜视野视野下见 PDLSCs 呈细长梭形,贴壁生长(图 2)。

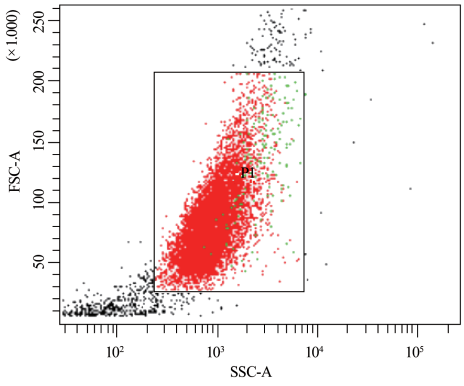


图 1 流式细胞仪分选 Stro-1 + 细胞

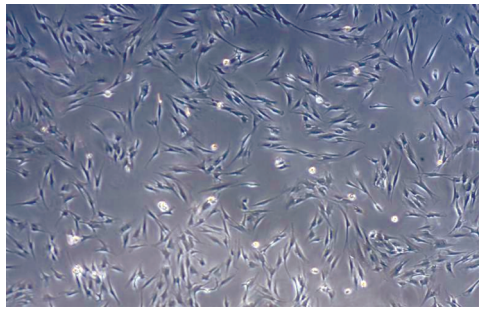
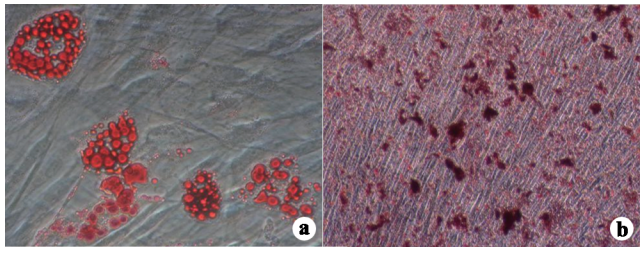


图 2 显微镜视野下 PDLSCs 形态(×100)

2.2 PDLSCs 多向分化潜能鉴定

PDLSCs 成脂诱导培养 21 d 后,行油红“O”染色,见串珠样脂滴(图 3a);PDLSCs 经成骨诱导 21 d 后,行茜素红染色,发现 PDLSCs 出现矿化结节(图 3b),证明 PDLSC 具有多向分化潜能。



a:PDLSCs 经成脂诱导 b:PDLSCs 经成骨诱导

图 3 PDLSCs 多向分化潜能鉴定

2.3 AML 对 PDLSCs 增殖的作用

PDLSCs 经不同浓度 AML(0、25、50、100 μg/mL)刺激 48 h 后,MTT 检测结果显示,随着浓度的增加,AML 对 PDLSCs 增殖的促进作用增强。100 μg/mL 组 OD 值为(1.96 ± 0.12),显著高于 50 μg/mL 组水平的(1.46 ± 0.17),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 AML 对 PDLSCs 粘附的作用

利用 AML 刺激 PDLSCs 4 h 后,显微镜视野下观察细胞数量,结果显示,PDLSCs 被 AML 刺激 4 h 后的粘附数量增多;AML 刺激 PDLSCs 8 h 后,显微镜下视野

内观察细胞数量,PDLSCs 被 AML 刺激时间达 8 h 后,粘附的细胞数量增多(图 5)。

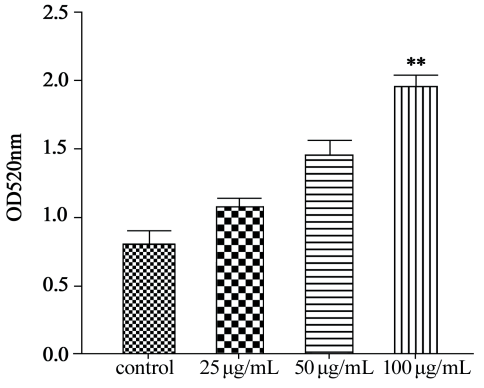
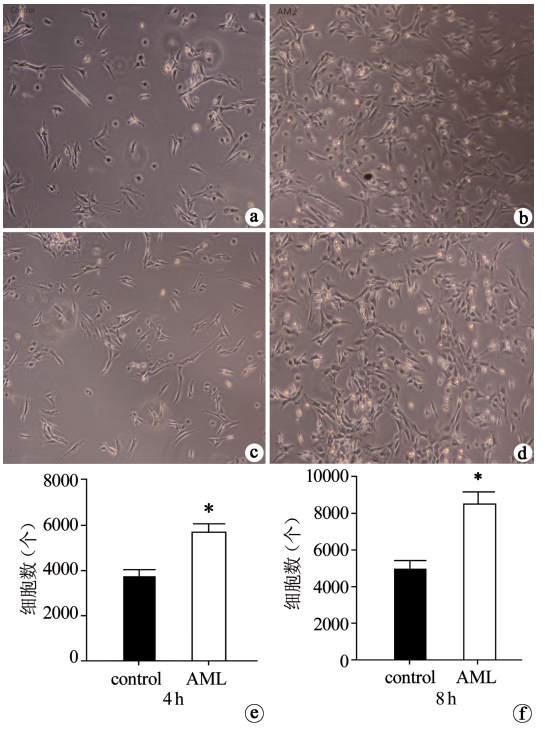


图 4 AML 对 PDLSCs 增殖的作用



a、c:对照组;b、d:AML 组;a、b:AML 刺激 4 h;c、d:AML 刺激 8 h;e:AML 刺激 4 h 对 PDLSCs 粘附的作用定量分析;f:AML 刺激 8 h 对 PDLSCs 粘附的作用定量分析

图 5 AML 对 PDLSCs 粘附的作用

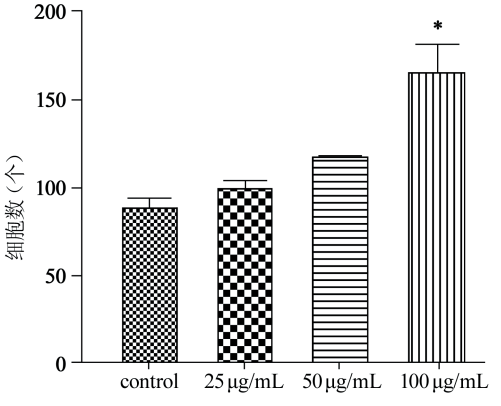


图 6 AML 对 PDLSCs 迁移的影响

2.5 AML 对 PDLSCs 迁移的影响

PDLSCs 经不同浓度 AML(0、25、50、100 μg/mL)刺激后,随着 AML 浓度的增大,PDLSCs 迁移数目增多。100 μg/mL 组细胞数量为(166.3 ± 7.31),显著高于 50 μg/mL 组的(118.6 ± 4.81),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

慢性牙周炎作为口腔常见的疾病,严重危害人类的口腔健康。目前,对于慢性牙周病的治疗主要是一方面控制局部的炎症,避免牙周炎症的扩大,防止进一步侵害牙周骨组织,造成骨质的破坏;另一方面,治疗慢性牙周炎采用生物支架或生物膜性材料,将干细胞贴附于牙周组织促进牙周组织的修复[10]。对于已发生的牙周组织缺损,牙周再生术成为当前研究热点[11]。釉原蛋白(AML)是由内釉上皮细胞分泌的细胞外基质蛋白,近年来越来越多的研究发现,AML 能够参与调控细胞的多个生物学特性,在细胞的增殖、迁移、粘附等方面发挥重要的作用。研究发现,AML 能够运用到牙周再生修复中,可促进牙周膜干细胞向成骨细胞系分化,促进牙周组织的骨质形成[12-13],AML 影响牙周膜干细胞的多向分化能力可能是其促进牙周修复的机制之一。对于 AML 是否还存在其他功能,使其在牙周组织重生修复中对牙周膜干细胞产生作用,目前研究较少。PDLSCs 因具有多向分化潜能及促进牙周组织重生修复能力,近年来越来越受到人们的关注。Chen 等[14]指出,牙周组织部分损伤后,存留的牙周组织仍存在 PDLSCs。如果能应用某些细胞因子促进这些干细胞向缺损部位迁移、归巢,就有可能促进该区域的牙周组织重生修复。Zhou 等[15]发现,牙周膜干细胞所表达某些信号通路,能够被某些因子调控,进而影响牙周膜干细胞的增殖分化等生物学特性。

本实验发现,经过 AML 刺激后,牙周膜干细胞的增殖能力明显增强,MTT 检测结果显示,100 μg/mL 组 OD 值显著高于 50 μg/mL 组。Matsuzawa 等[16]发现,TOPGAL 转基因小鼠的牙周膜细胞及成骨细胞在体外培养,经 AML 作用后,可激活牙周膜干细胞的某些信号通路,进而激活下游多个细胞信号分子,使得牙周膜干细胞的增殖能力提高,说明 AML 能够促进牙周膜干细胞的增殖,与本实验结果相符。然而,Kadkhoda 等[17]人发现,当 AML 刺激浓度达 50 μg/mL 时,其刺激小鼠牙周膜干细胞增殖能力达到最大,AML 刺激浓度为 100 μg/mL 与 50 μg/mL 比较,AML 促进牙周膜干细胞的增殖能力并没有显著提高。而本研究却发

现,AML 刺激浓度为 100 μg/mL 与 50 μg/mL 比较,AML 促进牙周膜干细胞增殖能力明显增强,推测可能是由于种属差异,导致人与小鼠的牙周膜干细胞对 AML 的最大刺激浓度不同。Shang 等[18]发现,大鼠的牙周膜干细胞经过 AML 刺激后,其表达的某些生物学特性相关信号通路得到激活,导致大鼠的牙周膜干细胞迁移能力明显增强,推测 AML 能够促进大鼠干细胞的迁移。说明 AML 可能有促进大鼠干细胞迁移的作用。本实验发现,经 AML 刺激后,牙周膜干细胞迁移数从 50 μg/mL 组的 118.6 个,提升至 100 μg/mL 组的 166.3 个,提示 AML 能够促进人 PDLSCs 的迁移,与 Shang 等[18]发现的 AML 能够促进大鼠的牙周膜干细胞细胞生物学特性发生改变,促进干细胞的迁移一致。本实验发现,AML 分别刺激牙周膜干细胞 4 h 和 8 h 后与对照组相比粘附数量明显增多,说明 AML 能够促进人 PDLSCs 的粘附, Amin 等[19]的研究发现,一定浓度的 TRAP(AML 的一种多肽)可以通过激活牙周膜细胞相关生物学信号,诱导牙周膜细胞的迁移而促进牙周膜细胞的成血管作用。与本实验结果发现的 AML 能够促进牙周膜干细胞迁移一致。Li 等[20]的研究发现,一定浓度的重组猪 AML 可在体外促进人牙龈上皮细胞的生长、粘附和迁移。同本实验发现的 AML 可促进人 PDLSCs 的粘附、迁移以及增殖类似。

因此,AML 对人牙周膜干细胞的粘附、迁移以及增殖确有促进作用,但这些作用的分子机制及是否还存在 AML 对牙周膜干细胞其他生物学特性产生影响尚不清楚,还需进一步研究证实。对于不同种属的牙周膜干细胞对 AML 的最大刺激浓度不同,是否相关的信号通路差异,仍需下一步的试验证实。

[参考文献]

[1] 李胡锐,倪 佳,黄雁红,等. 牙周内窥镜下刮治与传统刮治对龈下牙石清除效果的比较[J]. 广东牙病防治,2013,21(5):261 - 264.

[2] Feng F, Akiyama K, Liu Y, et al. Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases[J]. Oral Dis, 2010, 16(1): 20 - 28.

[3] Yamada Y, Ueda M, Hibi H, et al. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report[J]. Int J Periodontics Restorative Dent, 2006, 26(4): 363 - 369.

[4] Shang F, Ming L, Zhou Z, et al. The effect of licochalcone A on cell-aggregates ECM secretion and osteogenic differentiation during bone formation in metaphyseal defects in ovariectomized rats[J]. Biomaterials, 2014, 35(9): 2789 - 2797. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.12.061.

[5] Liu J, Yu F, Sun Y, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2015, 33(3): 627 - 638. doi: 10.1002/stem.1909.

[6] Vasandan AB, Shankar SR, Prasad P, et al. Functional differences in mesenchymal stromal cells from human dental pulp and periodontal ligament[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(2): 344 - 354. doi: 10.1111/jcmm.12192.

[7] 罗金英,钟建鑫,舒绍兵,等. Glil 基因对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化调控机制的研究[J]. 局解手术学杂志,2015,24(3)245 - 248. doi: 10.11659/jjssx.03E015025.

[8] Haruyama N, Hatakeyama J, Moriyama K, et al. Amelogenins: Multi-Functional Enamel Matrix Proteins and Their Binding Partners [J]. J Oral Biosci, 2011, 53(3): 257 - 266.

[9] Fu X, Jin L, Ma P, et al. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine[J]. J Periodontol, 2014, 85(6): 845 - 851. doi: 10.1902/jop.2013.130254.

[10] Yamada Y, Ueda M, Hibi H, et al. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report[J]. Int J Periodontics Restorative Dent, 2006, 26(4): 363 - 369.

[11] Wang F, Okawa H, Kamano Y, et al. Controlled Osteogenic Differentiation of Mouse Mesenchymal Stem Cells by Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation of Amelogenin [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145677. doi: 10.1371/journal.pone.0145677.

[12] Jingchao H, Rong S, Zhongchen S, et al. Human amelogenin up-regulates osteogenic gene expression in human bone marrow stroma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(3): 437 - 441. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.042.

[13] Olivares-Navarrete R, Vesper K, Hyzy SL, et al. Role of the N-terminal peptide of amelogenin on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Eur Cell Mater, 2014, 14(28): 1 - 10.

[14] Chen Y, Zhou N, Huang X. Cell sheet technology and its application in bone tissue engineering[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2012, 26(9): 1122 - 1125.

[15] Zhou Z, Li B, Dong Z, et al. Nicotine deteriorates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through α7 nicotinic acetylcholine receptor regulating Wnt pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83102. doi: 10.1371/journal.doi; 10.1371/journal.pone.0083102.

[16] Matsuzawa M, Sheu TJ, Lee YJ, et al. Putative signaling action of amelogenin utilizes the Wnt/beta-catenin pathway [J]. J Periodontal Res, 2009, 44(3): 289 - 296.

[17] Kadkhoda Z, Safarpour A, Azmoodeh F, et al. Histopathological Comparison between Bone Marrow-and Periodontium-derived Stem Cells for Bone Regeneration in Rabbit Calvaria[J]. Int J Organ Transplant Med, 2016, 7(1): 9 - 18.

[18] Shang YC, Wang SH, Xiong F, et al. Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(11): 1761 - 1774.

[19] Amin HD, Olsen I, Knowles J, et al. A tyrosine-rich amelogenin peptide promotes neovasculogenesis in vitro and ex vivo [J]. Acta Biomater, 2014, 10(5): 1930 - 1939. doi: 10.1016/j.actbio.2013.11.027.

[20] Li X, Shu R, Liu D, et al. Different effects of 25-kDa amelogenin on the proliferation, attachment and migration of various periodontal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 581 - 586. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.023.

(编辑:刘 艺)