基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0174-03

人牙髓细胞的体外培养及生物学特性研究

王 萍[1],王亚平[2],周 玥[2],杨明聪[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院口腔科,重庆 400016;2.重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆 400016;3.重庆医科大学附属口腔医院牙周黏膜病科,重庆 400015)

【摘 要】目的:从年轻恒牙的牙髓组织中分离培养牙髓细胞,研究其表型及生物学特性。方法:选取因正畸或阻生拔除的年轻健康双尖牙或第三磨牙,取出牙髓,组织块酶消化法分离培养人牙髓细胞,免疫细胞化学检测第 3 代人牙髓细胞表面标志,并对体外培养的人牙髓细胞的矿化能力进行研究。结果:体外培养的人牙髓细胞表达Ⅰ型胶原及波形丝蛋白,少数细胞增殖可形成克隆并表达间充质干细胞的表面标志 STRO-1。体外连续培养可形成钙化结节,加入矿化诱导液后钙化结节形成时间明显提前,牙髓细胞碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)活性增高。结论:人牙髓细胞中含有少量干细胞,体外培养的人牙髓细胞可向成牙本质细胞分化并形成钙化结节,体外矿化诱导可促进牙髓细胞向成牙本质细胞分化。

【关键词】牙髓细胞;细胞培养;矿化;碱性磷酸酶

【中国图书分类法分类号】R781.05 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-12

The characteristic of human dental pulp cells cultured in vitro

WANG Ping, et al

(*Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the characteristic of human dental pulp cells from permanent teeth of young people. *Methods*: The healthy teeth were selected from the young people because of orthodontics or obstruction. The dental pulp cells were separated and cultured by tissue block enzyme digestion method. Immunohistochemical studies were performed to characterize the pulp cells, and the capacity of mineralization was researched. *Results*: Collagen type I and Vimentin were expressed in human pulp cells. Colony and STRO-1 were expressed only in several cells. With continued culture, human dental pulp cells formed cell nodus. Applied with odontogenic induction medium, the time of cell nodus was advanced, and alkaline phosphatase activity was increased ($P<0.05$). *Conclusion*: There are only a few of human dental pulp stem cells in dental pulp. The continued culture of pulp cells has odontogenic differentiation.

【Key words】human dental pulp cells; cell culture; mineralization; alkaline phosphatase

牙髓组织受外界刺激或损伤时,牙髓细胞可分化为成牙本质细胞,形成修复性牙本质来防御或自我修复[1,2],牙髓具有自我更新和维持自身内环境稳定的能力。牙髓细胞体外培养及其生物学特点探讨是研究牙髓损伤修复机制的重要基础性工作。本实验通过体外分离培养牙髓细胞,观察牙髓细胞形态、表面标志的表达、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,ALP)活性及细胞矿化等特性,探讨体外培养的人牙髓细胞的生物学特性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

α-MEM 培养基,Ⅰ型胶原酶,Dispase,特级胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS),0.25%胰蛋白酶(Hyclone,USA),β-甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸(sigma,USA),鼠抗人Ⅰ型胶原单克隆抗体,鼠抗人波形丝蛋白(Vimentin)单克隆抗体,鼠抗人 STRO-1 多克隆抗体(Santa cruz,USA),SP 小鼠 IgM 二抗试剂盒(北京中杉生物技术有限公司),ALP 试剂盒(南京建成)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 经患者知情同意后,收集 14~28 岁因正畸或阻生拔除的完整、健康牙齿。参照 Gronthos 等的方法[3],去除牙体表面的软组织。无菌条件下自釉牙骨质界劈开牙齿,取出牙髓,剪去根尖 2 mm 牙髓,PBS 溶液反复清洗牙髓,将牙髓剪成 0.5 mm×0.5 mm 小块,以 1:1 体积比例加入 3 mg/ml 的Ⅰ型胶原酶和 2 mg/ml 的 dispase 消化液,37℃消化 0.5~1 h。α-MEM 培养液洗细胞 2 次,70 μm 细胞筛网过滤,收集单细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min,细胞沉淀用含 20%FBS、青霉

作者介绍:王 萍(1970-),女,副教授,博士,
研究方向:牙体牙髓病学。

通信作者:王亚平,男,教授,Email:ypwangcq@yahoo.cn。

素、链霉素各 100 U/ml 的 α-MEM 培养液重悬，接种于 25 cm^2 塑料培养瓶中。过滤后剩余牙髓组织块直接加入上述培养液置于另一培养瓶中，置 5% CO_2、相对湿度 100%的37℃恒温培养箱中培养。倒置显微镜下观察细胞贴壁后，每 3 d 换液 1 次。细胞生长达 70%~80%汇合时常规以 1:3 传代，扩增培养。

1.2.2 细胞克隆形成实验(Colong-forming unit-fibroblast，CFU-F) 原代或第一代牙髓细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板，常规培养，14 d 终止培养，甲醇固定 15 min，Giemsa 染色 20~30 min，显微镜下细胞克隆计数(≥50 个细胞的细胞团计数为 1 个克隆)。

1.2.3 免疫细胞化学检测 取第 4 代牙髓细胞以 1×10^4 个/ml 密度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，SP 法进行抗 Vimentin、抗Ⅰ型胶原的免疫细胞化学染色，DAB 显色，苏木素复染，常规脱水、透明、封片，光镜下观察。挑取克隆形成细胞扩大培养，取第 4 代克隆来源细胞同上法进行抗 STRO-1 免疫细胞化学染色。

1.2.4 ALP 活性检测及矿化结节形成测定 选取第 4 代人牙髓细胞，按 1×10^4 个/ml 接种于 96 孔培养板中，每孔 200 μl，每个样本设 6 个复孔。待细胞生长达 80%融合时更换为矿化诱导液(含 10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 mg/L 抗坏血酸、10 nmol/L 地塞米松和 10%FBS 的 α-MEM)培养，每 3 d 换液 1 次。对照组用 10% FBS 的 α-MEM 培养液培养。分别连续培养 3、7 d 和 14 d，pH7.4 的 PBS 洗 3 次，每孔加入 0.1%的 TritonX-100 100 μl，置 4 ℃冰箱过夜，加入 ALP 底物，每孔 100 μl，37 ℃条件下孵育 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，取平均值作统计学处理。取生长良好的第 4 代人牙髓细胞，按 1×10^4 个/ml 接种于培养瓶中，分为未诱导组和矿化诱导组，连续培养，镜下观察细胞出现复层生长期、结节形成期及钙化期的时间。

1.3 统计学处理

所有实验数据均用均数 ± 标准差表示，应用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析。采用重复测量资料的方差分析比较 2 组 ALP 活性的差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 倒置显微镜观察细胞形态

酶消化法分离的单个人牙髓细胞均以单细胞方式贴壁生长。在接种培养 24 h 时细胞呈类圆形或不规则形，伸展不完全；48 h 可见部分细胞贴壁生长，开始分裂增殖(图 1)。细胞体积较小，大多数为成纤维样细胞，梭形或多角形，单个或成簇生长。连续培养 1~2 周每 10^4 个牙髓细胞可以形成 12~35 个集落(CFU-F)，细胞克隆呈三角形、多角形等多种形态，细胞间排列紧密，界线不清，从中心向四周放散生长(图 2)。酶消化不完全的剩余组织块培养 72 h 可见组织块周缘有梭形细胞爬出，随培养时间延长向四周呈高密度放射状生长(图 3)。原代细胞培养 2~3 周基本长满，可进行传代，以后大约每 3~5 d 传代 1 次。随传代次数增多，细胞胞体逐渐增大，呈长梭形，核清楚。

2.2 牙髓细胞免疫表型

牙髓细胞Ⅰ型胶原和 Vimentin 免疫细胞化学染色为阳性(图 4、5)。克隆生长的牙髓细胞 STRO-1 免疫细胞化学染色为阳性(图 6)。

2.3 人牙髓细胞 ALP 活性检测

由表 1 可见，随着培养时间的延长，人牙髓细胞 ALP 活性(OD 值)逐渐增强，诱导组 ALP 活性明显高于对照组($P<0.05$)，14 d 时 ALP 活性最强。

2.4 矿化结节形成时间

未诱导的牙髓细胞贴壁后约 5~7 d 可铺满瓶底，呈放射状或束状排列。大约 14 d 进入复层生长期，部分细胞两层交叠呈网状或数层细胞重叠呈小团块状。20 d 左右有细胞结节形成，复层生长区中央部分细胞密集，形成细胞团，有晶体样物质出现，周围细胞呈放射状排列。30 d 时进入钙化期，细胞



图 1 培养 48 h 牙髓来源细胞部分贴壁并伸展(×100)



图 2 克隆生长的牙髓细胞(×100)

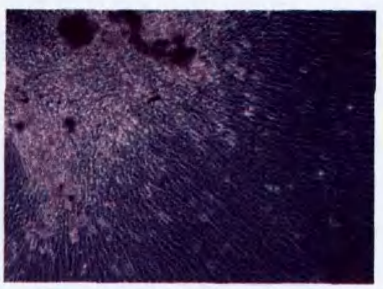


图 3 组织块周围牙髓细胞呈高密度放射状生长(×100)

表 1 人牙髓细胞 ALP 活性检测的 OD 值($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d
诱导组	0.284 ± 0.015*	1.043 ± 0.055*	1.525 ± 0.049*
对照组	0.223 ± 0.016	0.529 ± 0.032	0.784 ± 0.109

注：* 与对照组比较 $P<0.05$

团中央出现黑色分泌物，随培养时间延长增多。诱导组牙髓细胞贴壁后细胞数量迅速增加，约 3~5 d 可铺满瓶底，出现复层生长期、细胞结节期及钙化期的时间分别为 10、14 d 及 20 d 左右，较未诱导组明显提前(图 7 矿化结节)。



图 4　Ⅰ型胶原阳性表达细胞(×200)



图 5　Vimentin 阳性表达细胞(×200)



图 6　STRO-1 阳性表达细胞(×200)



图 7　矿化结节(×100)

3　讨　论

牙髓组织由细胞和基质组成，承担牙齿的营养代谢、感觉和修复等方面的重要生理功能。人牙髓细胞体外培养技术的发展为研究牙髓修复过程中的细胞学和分子学机制提供了有效的模式，离体培养所获得的人牙髓细胞对牙髓药理学和毒理学的研究也有着极其重要的意义。研究发现，组织块酶消化法是人牙髓细胞原代培养的最佳方法[4]。该方法所获得的细胞游出率、成活率较高，短时间可传代。本研究采用该方法成功地从牙髓组织中分离培养出了牙髓细胞。大量研究表明，体外连续培养的牙髓细胞可复层生长，并具有一定的矿化能力，其超微结构与成牙本质细胞相似，具有分泌Ⅰ型胶原、高 ALP 活性等特征[5,6]，表明连续培养的牙髓细胞具有向成牙本质细胞样细胞分化的潜能。矿化诱导液是研究体外培养细胞矿化常用的一种培养液，用于骨和牙本质等矿化组织的诱导形成。本实验采用目前最常用的矿化液，是含一定比例的地塞米松、抗坏血酸、β－甘油磷酸钠的培养液，其中抗坏血酸是合成胶原和骨形成的必需物质，地塞米松不仅能促进成骨细胞分化成熟，诱导成骨，还具有调节成骨样细胞产生胰岛素样生长因子和促进胶原合成，刺激 ALP 活性的作用[7]。β－甘油磷酸钠是 ALP 的底物，为矿化提供必需的磷离子。通过研究发现诱导组牙髓细胞出现复层生长期、细胞结节期及钙化期的时间均较未诱导组明显提前。ALP 是参与骨和牙齿等矿化组织形成、代谢和再生的重要物质，可通过调控磷酸盐的转运而参与骨和牙本质形成。ALP 活性增强被认为是牙髓细胞向成牙本质细胞分化和牙本质形成的早期标志[8,9]。本研究随着培养时间的延长，ALP 活性逐渐增高，且诱导组明显高于未诱导组，表明体外连续培养的人牙髓细胞可向成牙本质细胞分化并形成钙化结节，体外矿化诱导可促进牙髓细胞向成牙本质细胞分化。

2000 年 Gronthos 提出了牙髓干细胞的概念，证实了牙髓来源的细胞具有干细胞的特性。牙髓来源的细胞在体外培养的条件下经过诱导，不但可以在动物体外形成矿化沉淀，在移植到免疫缺陷的动物体内，还可以在动物体内形成牙本质样矿化物质[3]。近年来，国内外学者[10,11]对牙髓干细胞的研究逐渐深入，均报道成功获得了人牙髓干细胞的克隆，并利用其诱导形成牙髓牙本质复合体样结构。体外细胞克隆形成是成体干细胞具有自我更新能力的体现。通过 CFU-F 计数可间接反映干细胞的数量。STRO-1 是间充质干细胞特异性标志物，在骨髓间充质干细胞呈阳性表达。本研究发现，少数牙髓细胞增殖能力旺盛形成集落状克隆并表达间充质干细胞的表面标志 STRO-1，提示体外培养的牙髓细胞中含有牙髓干细胞成分，为牙髓中的未分化的间充质细胞，是一种成体干细胞。可以利用体外培养的人牙髓细胞及分离纯化的人牙髓干细胞进行牙的组织工程研究。

参　考　文　献

[1] Murray P E, Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration[J]. Stem Cells Dev, 2004, 13(3): 255-262.

[2] Ji Y M, Jeon S H, Park J Y, et al. Dental stem cell thrapy with calcium hydroxide in dental pulp capping[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(6): 1823-1833.

[3] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells(DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25): 13625-13630.

[4] 卢　婧，唐荣银，李　彦. 人牙髓细胞原代培养方法的比较研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，2006，16(6)：311-313.

[5] Tsutsui T W, Inaba T, Fisher L W, et al. In vitro chronmosome aberration tests using human dental pulp cells to detect the carcinogenic potential of chemical agents[J]. Odontology, 2006, 94(1): 44-50.

[6] 杨雪超，樊明文. 体外持续培养对人牙髓细胞分化能力的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志，2003，13(2)：62-65.

[7] 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.

[8] Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells[J]. J Endod, 2009, 35(11): 1529-1535.

[9] Wei X, Ling J, Wu L, et al. Expression of mineralization markers in dental pulp cells[J]. J Endod, 2007, 33(6): 703-708.

[10] 何　飞，谭颖徽，张　纲. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定[J]. 华西口腔医学杂志，2005，23(1)：75-78.

[11] Gronthos S, Brahim J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81(8): 531-535.

(责任编辑：冉明会)