DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.039


论著

文章编号:1000-5404(2002)07-836-04

# 体外人牙髓细胞的连续培养

何 飞[1],谭颖徽[1],杨峥嵘[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院口腔科,重庆 400037;[2]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨体外连续培养过程中人恒牙牙髓细胞向成牙本质样细胞分化的可行性。方法 采用细胞连续培养、酶动力学法、透射电镜观察、免疫组化等方法,对体外人牙髓细胞在连续培养过程中的生物学特性进行研究。结果 部分人牙髓细胞在体外可以出现复层生长,形成细胞结节,并可进一步钙化;与成牙本质细胞相似,它们具有高碱性磷酸酶活性,可合成Ⅰ型胶原,其超微结构有许多与成牙本质细胞相似的特征,胞间基质中可见膜被基质小泡,某些基质小泡内含针状晶体。结论 体外连续培养的人牙髓细胞可向成牙本质细胞分化,此过程可作为研究体内牙髓损伤修复细胞增殖、分化的体外模型。

关键词:成牙本质细胞;细胞分化;细胞培养
中图法分类号:R322.41;R329.2 文献标识码:A

## Consecutive culture of human dental pulp cells *in vitro*

HE Fei, TAN Ying-hui, YANG Zheng-rong (Department of Stomatology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract**: Objective To study if human dental pulp cells can differentiate into odontoblast-like cells during long-term culture. Methods The fourth to tenth passaged human dental pulp cells were cultured up to 7, 14, 21 and 30 d. The cells were observed under light microscopy (LM), and transmission electron microscopy (TEM). The expression of alkaline phosphatase and type Ⅰ collagen were assayed. Results Some of the long-term cultured human dental pulp cells formed mineralized nodules. The immunohistochemical study revealed that, as odontoblasts, pulp cells contributing to the nodules formation express type Ⅰ collagen and had similar ultrastructure as odontoblasts under TEM. Conclusion The results suggest that long-term cultured human dental pulp cell have the calcification ability and can differentiate into odontoblast-like cells. This long-term culture system represents a useful in vitro model for proliferation and differentiation of pulp cells into odontoblast-like cells during pulp wound healing.

**Key words**: odontoblasts; differentiation; cell culture

牙髓组织损伤修复机制是倍受口腔临床医生和科研工作者关注的热点问题之一,但由于牙髓被牙体硬组织包围,体内研究存在许多困难。多年来许多学者致力于利用组织培养技术建立体内牙髓损伤修复的模型,探索和揭示牙髓组织活动。近年来,在对鼠、牛及人乳牙的牙髓细胞的体外培养[1,2]及对厚牙齿切片进行牙本质—牙髓器官培养[3]过程中发现,牙髓细胞具有成牙本质细胞的某些特性,提示体外培养的牙髓细胞在一定的条件下可分化为成牙本质细胞。这里,我们采用体外连续培养技术,对恒牙牙髓细胞向成牙本质样细胞分化的生物学特征进行了研究,以期寻找一种简单可行的牙髓损伤修复的模型,为进一步研究打下基础。

## 1 资料和方法

### 1.1 材料

高糖DMEM培养液(Dubecco's modified eagle medium,美国Gibio公司);优等胎牛血清(Fetal bovine serum FBS,Hyclon公司);Ⅰ型胶原抗体(博士德公司);β-磷酸甘油钠(Sigma,USA);S-P试剂盒(博士德公司);碱性磷酸酶测定试剂盒(北京中生生物制品公司);1 g/L TritonX-100(华美生物工程公司);酶联免疫检测仪(Beckman,USA);胰蛋白酶(Gibco;USA);24孔细胞培养板(Gibco,USA);YMT-Z型倒置显微镜(Olympus;Japan);$CO_2$孵箱(QUEUE,USA);YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂)

### 1.2 人牙髓细胞的培养

选因阻生而拔除的健康恒牙,用组织块法进行原代培养,成功后行常规传代培养,本实验选用第4~10代传代细胞。用DMEM将细胞调至$2\times10^4$个/ml,种植于50 ml培养瓶内,每瓶4 ml,每3 d换液1次,平均约7 d传代。培养条件为DMEM+10%FBS+2 mmol/L β-磷酸甘油,5%$CO_2$,相对湿度100%。倒置显微镜观察细胞生长情况。

### 1.3 碱性磷酸酶(ALP)活性测定

选择生长良好的第5~10代人牙髓细胞以$3\times10^7$/L浓度接种24孔培养板,每孔500 μl,培养液为10% FBS的DMEM培养液,在37 ℃、5%$CO_2$孵箱中培育7、14、21、28 d,弃孔内液体和未贴壁细胞,无血清培养液洗3遍,每孔加入1 g/L的TritonX-100 50 μl,置4 ℃冰箱过夜,然后加入ALP底物,每孔100 μl,37 ℃孵箱内置30 min,以每孔加入0.2 mol/L NaOH 50 μl终止反应,在酶联免疫检测仪上选择410 nm波长测各孔$A$值,按试剂盒方法计算ALP活性(nmol·mg protein$^{-1}$·min$^{-1}$)。

### 1.4 钙质染色(Von Kossa染色)[3]

培养30 d的细胞以70%乙醇固定1 h,蒸馏水稍冲洗后,1%硝酸银处理20 min,蒸馏水冲洗,2.5%硫代硫酸钠处理

基金项目:全军医药卫生科研基金资助项目(01MA165)
作者简介:何 飞(1972-),女,黑龙江省兰西县人,博士研究生,医师,主要从事牙髓损伤修复方面的研究。电话(023)68753282
收稿日期:2001-04-20;修回日期:2002-01-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5 min。

### 1.5　透射电镜观察

用 0.01 mol/L(pH7.2)PBS 稍浸洗, 3% 戊二醛液 4 ℃下固定 1 h, 10 g/L 四氧化锇液后固定 1 h, 0.1 mol/L PBS 清洗 3× 5 min, 300～1 000 g/L 梯度丙酮脱水, 环氧树脂 Epon812 包埋液浸 20 min, 显微镜下选取结节原位包埋[4], 常规制作超薄切片, 经醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色后, 透射电镜观察。

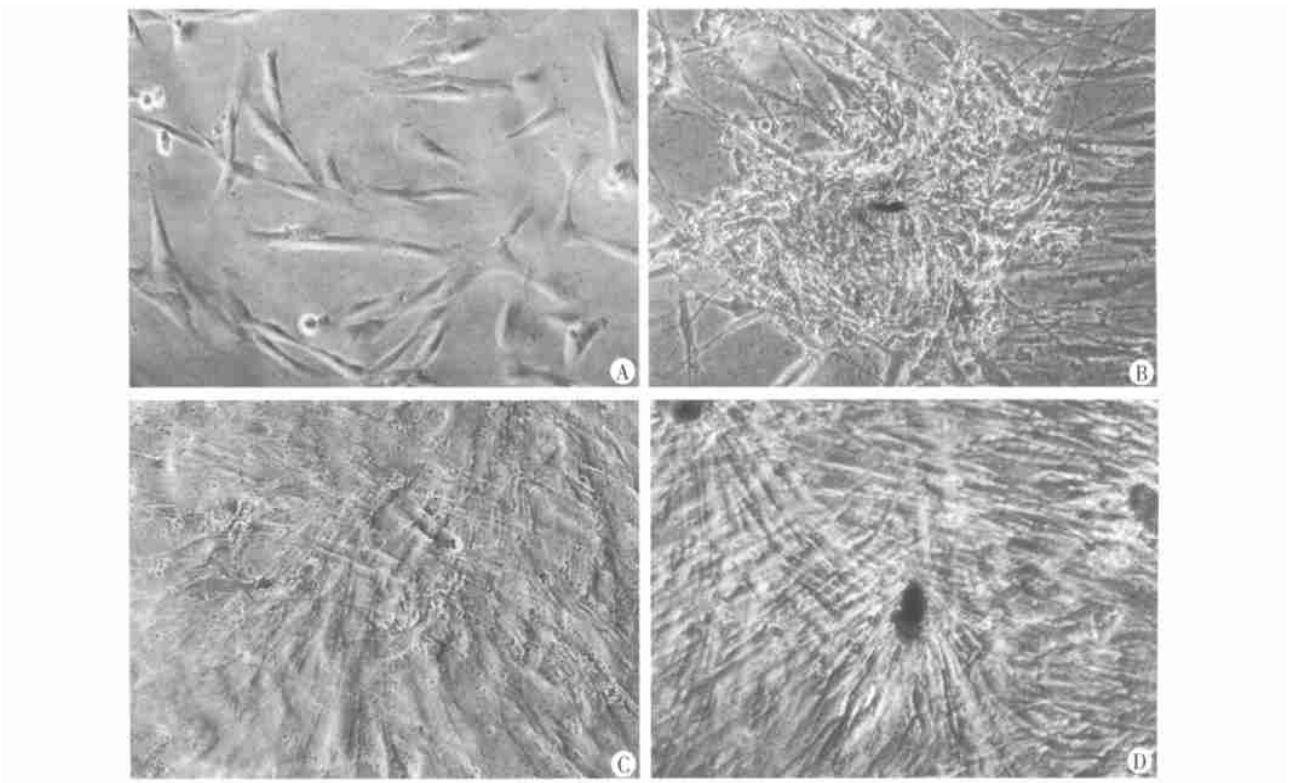
### 1.6　Ⅰ型胶原的表达(免疫组化法)

以 1× $10^7$/L 细胞浓度接种于铺有无菌盖玻片(10 mm× 10 mm)的 24 孔板中, 每孔 500 μl, 标准环境下在 DMEM 培养液中连续培养 30 d, 将载有细胞的盖玻片自 24 孔培养板中取出, PBS 洗 3 遍, 丙酮固定, 常规 S-P 法行Ⅰ型胶原免疫组化染色。

## 2　结果

### 2.1　牙髓细胞连续培养的倒置显微镜观察

原代牙髓细胞有 3 种类型, 大多数为有多个突起的成纤维细胞样细胞, 少数为细长的梭形细胞和内皮样细胞; 传至 4 代后细胞基本均呈成纤维样见图 1。




A: Cultured cells are fibroblast-like and well-attached to wall 24 h after passage; B Human dental pulp cells become multilayered 10 d after consecutive culture; C Cellular nodules are formed in human detal pulp cells 15 to 25 d after consecutive culture; D Black secretion is seen in the nodules of human detal pulp cells 28 d after consecutive culture

图 1　牙髓细胞连续培养的倒置显微镜观察　(LM× 100)

**Fig 1　Long-term cultured human dental pulp cells under an inverted microscope**　(LM× 100)

连续培养的牙髓细胞生长大概分为以下几个阶段:

牙髓细胞增殖期— 正常情况下细胞传代贴壁后散在生长, 见图 1A。约 5～7 d 可铺满瓶底, 牙髓细胞数量增加显著, 铺满培养瓶底后呈放射状或束状排列;

复层生长期(约第 10 天)部分牙髓细胞出现复层生长, 镜下可见细胞交叠呈网状或小团块状, 见图 1B;

细胞结节形成期(约第 15～25 天)细胞复层生长, 其中央部分细胞密集, 形成细胞团, 周围细胞呈放射状排列, 细胞体积较大, 呈梭形, 见图 1C;

细胞结节钙化期(约第 30 天)细胞团中央出现黑色分泌物沉积, 随培养时间延长增多, 见图 1D。

### 2.2　碱性磷酸酶(ALP)活性测定结果

牙髓细胞连续培养过程中, ALP 活性随培养时间的延长逐渐增加, 第 21 天(细胞结节形成)时最高, 到钙化期稍下降, 见图 2。

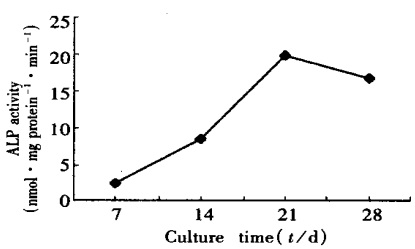



图 2　连续培养的不同阶段牙髓细胞 ALP 活性变化

**Fig 2　ALP activity of human dental pulpal cells cultured for different times**

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

### 2.3 钙质染色(Von Kossa 染色)结果

牙髓细胞连续培养 30 d 钙质染色为阳性,细胞结节中央阳性区为深褐色,周围逐渐变浅。提示细胞结节中有明显的钙盐沉积,见图 3。



图 3 牙髓细胞连续培养 **30 d**,钙质染色阳性,主要位于细胞结节中央区,为深褐色,周围逐渐变浅 (Von Kossa× 100)

**Fig 3 Brown stained calcium contents in the center of nodules and gradually lightened surrounding in human detal pulp cells cultured for 30 d** (Von Kossa staining× 100)

### 2.4 透射电镜观察

结节区牙髓细胞有长的胞质突起,细胞核极化,胞质内可见大量高尔基氏器位于中央区,其成熟面有密度不等的泡状结构,有大量的粗面内质网和线粒体沿细胞长轴分布;有含致密小体的泡状结构,类似于基质小泡,见图 4。部分基质小泡开始有钙盐沉积。

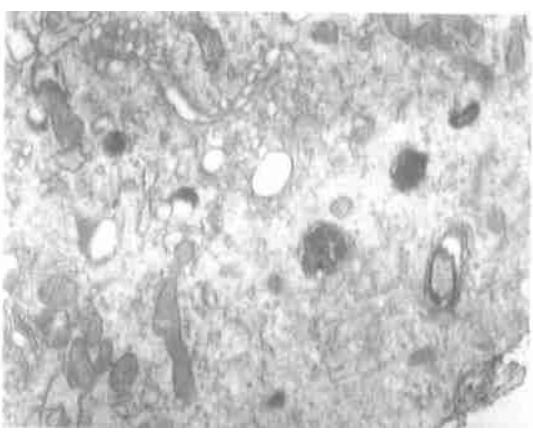


图 4 牙髓细胞有长的胞质突起,细胞核极化,胞质内可见大量高尔基氏器、粗面内质网和线粒体 并有含致密小体的泡状结构,类似于基质小泡 (TEM× 5 000)

**Fig 4 Electron micrograph of dental pulp cells shows that the elongated cells have long processes and polarized nuclei with plenty of Golgi apparatuses rough endoplasmic reticula, mitochondria and matrix vesicle-like structure containing compact bodies** (TEM× 5 000)

### 2.5 Ⅰ型胶原的表达

免疫组化染色Ⅰ型胶原为阳性,主要位于牙髓细胞胞膜及胞质,胞核为阴性。

## 3 讨论

近年来的研究表明,体外培养的牙髓细胞在一定条件下具有复层生长、矿化能力[2~5]。本实验结果与文献报道相似,培养液中加入 2 mmol/L β-磷酸甘油,人恒牙牙髓细胞连续培养约 10 d 可出现复层生长,约 14 d 形成细胞结节,30 d 左右出现钙化。提示人恒牙牙髓细胞在连续培养中,部分细胞也可出现复层生长,形成细胞结节,且具有一定的矿化能力。β-磷酸甘油是细胞合成基质的原料,是常用的促进细胞分化和钙化的化学条件培养液成分之一,它在牙髓细胞体外分化、钙化中是否必须尚无定论。与 About[6] 认为"无 β-磷酸甘油的条件下不能形成细胞结节及钙化"不同的是,本实验所用的牙髓细胞,多次传代(约 10 代)后即使在无 β-磷酸甘油的培养条件下也可出现复层生长,只是形成细胞结节及钙化的时间较有 β-磷酸甘油的条件下晚,认为培养牙髓细胞的这种生长特性是由其内在性质决定的。

体外培养的牙髓细胞有一定的合成胶原和糖蛋白的功能,如纤维粘连蛋白(FN)、Ⅰ型胶原 、骨形成蛋白等,并可分泌碱性磷酸酶(ALP)。Ⅰ型胶原是构成牙本质的主要胶原;ALP 是参与骨等钙化组织代谢和再生的一种功能性标志酶,牙髓成纤维细胞的 ALP 活性可以反映牙髓成纤维细胞向成牙本质样细胞分化的能力[7]。本实验中连续培养的牙髓细胞胞质内有Ⅰ型胶原表达,且具有较高的 ALP 活性。

Bouvier 等[8] 观察体外牙髓细胞的矿化特征认为,细胞复层生长的能力是形成细胞结节的先决条件,而细胞结节所具有的三维结构似乎又是形成钙化的先决条件。我们对细胞结节进行研究发现:结节钙盐染色为阳性,细胞内有发育良好的高尔基器、粗面内质网和极化的细胞核,细胞内及细胞间基质中可见针状小晶体及含这些小体的泡状结构。到目前为止,关于成牙本质样细胞尚无明确定义,但多数学者认为具有这种结构特征的细胞是分化中的前成牙本质细胞,其矿化方式可能与基质小泡有关;基质膜泡的出现是钙化活动重要的超微结构影像,基质膜泡可能来自变性细胞的分解物,通常是钙化的起始点[1]。About 等[6] 用 FTIR 显微分光镜对含 β-磷酸甘油的培养基中人牙髓细胞矿化结节进行检测发现,体外矿化结节与体内牙本质矿化前沿处有极相似的特性,如波的数目、分布、波峰和波段的类型等,认为此牙髓细胞分泌的胞外基质的矿化特性与牙本质相同。

综上所述,体外连续培养的人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,且具有分泌Ⅰ型胶原、高碱性磷酸酶活性等特征,说明牙髓细胞连续培养过程中可向成牙本质样细胞分化;此过程作为研究牙髓组织损伤修复过程中牙髓细胞增殖、分化的体外模型,其细胞来源容易获得,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

无需特殊培养条件，具有一定的应用价值。

参考文献：

[1] Hayashi Y, Imai M, Goto Y, *et al*. Pathological mineralization in a serially passaged cell line from rat pulp[J]. J Oral Pathol Med, 1993, 22(4): 175－179.
[2] Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, *et al*. Regulatory role of transforming growth factor-β, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extrancellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells[J]. Dev Biol, 1994, 162(1): 18－28.
[3] Sloan A J, Shelton R M, Hann A C, *et al*. An *in vitro* approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine-pulp complex from rat incisor teeth[J]. Arch Oral Biol, 1998, 43(6): 421－430.
[4] Ballou R J, Simpson W G. A convenient method for *in situ* processing of cultured cells for cytochemical localization by electron microscopy[J]. J Pathol, 1985, 147(3): 223－226.
[5] 彭 彬，樊明文. 体外人牙髓细胞的矿化特性[J]. 中华口腔医学杂志，1997, 32(5): 285－287.
[6] About I, Bottero M J, Denato P D, *et al*. Human dentin production *in vitro*[J]. Exp cell Res, 2000, 258(1): 33－41.
[7] 彭 彬. 体外牙髓细胞的生物学特征[J]. 国外口腔医学体外牙髓细胞分册，1994, 21(5): 291－294.
[8] Bouvier M, Joffre A, Magloire H. *In vitro* mineralization of a three-dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate[J]. Archs Oral Biol, 1990, 35(4): 301－309.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2002)07-0839-01

# 个案与短篇

## 微波及气囊扩张治疗食道狭窄的手术配合

## Cooperative procedure of microwave and air balloon dilataltion on the treatment of esophageal constriction

高晋华，彭贵勇，王振华 （第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038）

食道狭窄的病因包括食道癌、食道术后吻合口的瘢痕狭窄、食道癌放疗术后的瘢痕狭窄及食道化学烧伤所致的瘢痕狭窄等。多数食道狭窄均可通过内镜进行治疗[1,2]。本研究总结了我院自 1995 年以来内镜治疗的各种食道狭窄，并将我们进行这一手术的配合情况报告如下。

### 1 资料和方法

#### 1.1 一般资料

经内镜治疗的食道狭窄 92 例，其中男 64 例，女 28 例，年龄 25～84 岁，平均年龄 45.8 岁。其中术后吻合口狭窄 35 例，放疗术后狭窄 21 例，癌性狭窄 21 例（其中术后复发 7 例），化学烧伤后狭窄 13 例，不明原因性狭窄 2 例。均有进水进食困难、呕吐粘液、贫血及消瘦等临床表现。

#### 1.2 术前准备

1.2.1 病人准备 ①食道吞钡及胃镜检查明确狭窄的程度、范围及性质；②检查心电图、出、凝血时间；③禁食 4 h。

1.2.2 器材准备 ①OLYMPUS GIF-230 或 240 电子胃镜；②微波治疗仪：南京新技术研究所；③扩张气囊及充气泵：自制扩张气囊、国产扩张气囊及充气泵。

#### 1.3 手术配合

1.3.1 治疗方法 ①微波治疗：将微波导线经胃镜活检孔插入，将导线前端的微波发射头置于狭窄部位，多点环行烧灼。功率为 70 W，每次烧灼时间为 3～5 s。烧灼后粘膜发白。②气囊扩张：扩张气囊扩张直径为 1.0～1.8 cm。将活检钳插入胃镜活检孔，露出于胃镜前端，用活检钳夹住气囊前端的牵引线，后退活检钳于胃镜活检孔内，将扩张气囊固定于胃镜外，经胃镜引导放入气囊至狭窄口上方，再插入活检钳，通过活检钳的引导将气囊放入狭窄部位，用充气泵进行气囊注气扩张，压力为 0.2 MPa，每次持续 1～2 min，反复数次。

1.3.2 选择治疗方案 ①隆起型食道癌所致的狭窄采用单纯微波治疗。②狭窄口直径＞0.4 cm 的良性食道狭窄及浸润型食道癌所致的狭窄采用单纯气囊扩张治疗。根据狭窄口的大小不同，分别采用直径为 1.0～1.8 cm 的气囊进行扩张。③狭窄口直径＜0.4 cm 的良性食道狭窄及混合型食道癌所致的狭窄采用微波治疗加气囊扩张治疗，见表 1。

1.3.3 术中护理 ①术中密切观察生命体征；②观察病人胸部胀痛症状，嘱病人胀痛时抬手示意，说明扩张有效。③固定好牙垫，防止脱落。④对恶心明显者，嘱做深呼吸以减轻症状。

1.3.4 疗效判断 显效：症状明显改善，狭窄口明显扩大，胃镜（Olympus GIF-XQ240）能通过狭窄口进入胃腔。有效：症状改善，狭窄口扩大，但胃镜不能通过狭窄口进入胃腔。无效：症状无改善，狭窄口无变化。

### 2 结果

92 例中显效 71 例（77.12%），有效 19 例（20.65%），无效 2 例（2.17%），其中 1 例发生食道穿孔，见表 2。于微波治疗后第 2～5 天，80% 患者均有不同程度的吞咽困难加重，其后吞咽困难症状逐步缓解或消除。治疗后有 85 例能进普食或半流质，体重逐步增加。有 36 例经 1 次治疗后缓解，有 53 例缓解期为 0.5～26 个月，反复治疗 2～43 次，随着治疗次数的增加缓解期逐渐延长，其中一例治疗 43 次者，目前缓解期已＞2 年。患者气囊扩张治疗过程中有胸骨后胀痛，灼热感，治疗结束后消失。

（下转 842 页）

作者简介：高晋华（1963－），女，山西省沁源县人，主管技师，主要从事消化内镜方面的研究。电话：(023)68754010

收稿日期：2002-05-23；修回日期：2002-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net