

[文章编号 1000-1182(2005)03-0198-03]

肝细胞生长因子对牙髓细胞增殖的影响

叶 玲¹, 凌均荣¹, 彭 栗², 谭 红², 周学东²

(1. 中山大学光华口腔医院 牙体牙髓科, 广东 广州 510060;

2. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨肝细胞生长因子对牙髓细胞生长增殖的影响。方法 以体外培养的牙髓细胞为实验对象, 以不同浓度肝细胞生长因子作用于牙髓细胞, 通过二甲基噻唑二苯基四唑溴盐比色法对细胞的增殖情况进行研究, 用流式细胞术对细胞的周期进行分析。结果 1~200 $\mu\text{g/L}$ 的肝细胞生长因子可明显促进牙髓细胞的增殖 ($P < 0.05$), 100 $\mu\text{g/L}$ 为最大效应浓度。100 $\mu\text{g/L}$ 的肝细胞生长因子作用牙髓细胞 3 d 对其细胞周期无显著性影响, 作用 5 d 缩短了 G₁ 期, 增加了 S 期比例。结论 肝细胞生长因子对牙髓细胞的增殖有促进作用。

[关键词] 肝细胞生长因子; 牙髓细胞; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R 780.2 [文献标识码] A

Effect of Hepatocyte Growth Factor on the Proliferation of Dental Pulp Cell YE Ling¹, LING Jun-qi¹, PENG Li², TAN Hong², ZHOU Xue-dong². (1. Dept. of Dentistry and Endodontics, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510060, China; 2. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** to study the effect of hepatocyte growth factor on the proliferation of dental pulp cell. **Methods** the 4th generation dental pulp cell cultured in vitro was used as target cell. 1~200 $\mu\text{g/L}$ hepatocyte growth factor was added in the test group while the pure cell culture DMEM as control. The MTT method and flowcytometry were applied to assay the proliferation and cell cycle of dental pulp cell of different groups. **Results** 1~200 $\mu\text{g/L}$ hepatocyte growth factor showed promoting effect to the proliferation of pulp cell since the 5th day ($P < 0.05$). 100 $\mu\text{g/L}$ was found to be the optimal concentration. Also on the 5th day, 100 $\mu\text{g/L}$ hepatocyte growth factor decreased the G₁ subcycle and increased the S subcycle of dental pulp cell ($P < 0.05$). While on the 3rd day, it had no effect on the cell cycle. **Conclusion** hepatocyte growth factor had positive effect on the proliferation of dental pulp cell, with 100 $\mu\text{g/L}$ as the optimal concentration.

[Key words] hepatocyte growth factor; dental pulp cell; cell proliferation; cell cycle

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种间充质来源的多效性细胞因子, 对组织器官的生长发育、形态发生、修复再生具有重要的生理调节功能¹。研究发现它可明显促进多种细胞的生长增殖^{2~4}, 在上皮间充质的相互作用中也起重要作用。

牙髓组织中的 HGF 与牙胚发育、牙髓炎有关^{5,6}, 但目前尚未见到 HGF 对牙髓细胞生物学作用的研究。本实验采用四甲基偶氮唑蓝比色法 (measurement of tritiated thymidine incorporation, MTT) 和流式细胞术研究 HGF 对体外培养的牙髓细胞生长的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料、试剂及仪器

肝细胞生长因子 (Chemicon 公司, USA), 高糖细

胞培养基 (dubecco's modified eagle media, DMEM) (Gibco 公司, USA), 优等胎牛血清 (fetal bovine serum, FCS) (Gibco 公司, USA), 胰蛋白酶、型胶原酶 (Sigma 公司, USA), 细胞培养瓶 (Corning 公司, USA), 细胞培养箱 (INFO-3, Japan), EPICS ELITE ESP 流式细胞仪 (Coulter 公司, USA), 倒置相差显微镜 (Olympus 公司, Japan)。

1.2 细胞培养

取 10~25 岁因正畸或阻生拔除的健康、完整和无龋坏的第三磨牙, 在高速涡轮机水冷条件下去除牙周膜及残余牙龈组织, 顺牙体长轴在牙体表面制备 1.5 mm 深沟槽。超净台上依次以 5% 碘酒、75% 酒精、生理盐水涂拭牙体表面。夹碎牙齿, 迅速取出牙髓, 用含双抗的 Hank's 液反复冲洗。将牙髓组织置于 2 ml DMEM 中, 剪碎成 1 mm × 1 mm, 置入离心管。2 ml 2.5 g/L 胰蛋白酶和 2 ml 0.5 g/L 型胶原酶加入离心管, 37℃ 水浴振荡床温和振荡消化 5 min, 加入 10% 胎牛血清培养液终止消化, 1 200 r/min 离心

[收稿日期 2005-02-10; 修回日期 2005-03-20]

[作者简介] 叶 玲 (1975-), 女, 重庆人, 讲师, 博士

[通讯作者] 周学东, Tel: 028-85501480

5 min后收集细胞,用培养液清洗2次。加入5 ml含10 %FCS的DMEM,转入细胞培养瓶,在37℃下5 %CO₂饱和湿度条件培养,每2~3 d更换1次培养液。

1.3 细胞来源的鉴定

用LsAB(labelled streptavidin biotin)法对细胞爬片进行波形丝蛋白、角蛋白免疫组化染色,马氏三色染色法进行胶原纤维染色,鉴定细胞来源。

1.4 MTT法测定细胞增殖

将细胞按 5×10^3 个/孔接种于96孔细胞培养板中,培养24 h待细胞贴壁后,换无血清培养基培养24 h使细胞同步化,弃去孔内的原培养液和未贴壁细胞。实验组共6组。实验组分别加入含有不同浓度HGF(1、5、10、50、100、200 $\mu\text{g/L}$)的10 %FCS DMEM各200 μL ,对照组加入不含HGF的10 %FCS DMEM 200 μL 。各组均作3孔,均在培养第1、3、5、7天加入20 μL 5 mg/ml的MTT,继续培养4 h后,弃去孔内液体终止反应。PBS清洗2次,每孔均加入200 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),轻轻振摇10 min,酶联法在570 nm波长下测定每孔的OD值,取3孔均值为样本检测值。

1.5 流式细胞术检测

将细胞按 1.25×10^5 个/瓶接种于瓶底为25 cm²的培养瓶中,培养24 h细胞贴壁,细胞同步化。参考MTT实验结果选择最佳作用浓度,在实验组加入含有浓度100 $\mu\text{g/L}$ HGF的10 %FCS DMEM 5 ml,对照组加入不含HGF的10 %FCS DMEM 5 ml。分别培养3、5 d,经0.25 %胰蛋白酶消化制成细胞悬液,1 200 r/min离心10 min,收集沉淀。70 %乙醇4 h过夜固定,PBS洗涤2次,去除固定液,以碘化丙啶一步插入法进行DNA定量染色,流式细胞仪检测, Multicycle分析软件进行细胞周期分析。

1.6 统计分析

采用SPSS 10.0统计软件进行数据的单因素方差分析和卡方检验。

2 结果

2.1 细胞生长观察及来源鉴定

相差显微镜下细胞为多角形,有突起(图1)。LsAB法染色显示波形丝蛋白阳性(图2),角蛋白免疫组化染色阴性。证明培养细胞为间充质来源的细胞。

2.2 细胞增殖检测

不同浓度HGF作用下牙髓细胞的MTT值见表1。从表1可见,与对照组相比,HGF加入后第5天开始出现明显的促增殖效应($P < 0.05$),且HGF浓度为1、5、10、50、100 $\mu\text{g/L}$ 时呈现剂量-效应关系,100 $\mu\text{g/L}$ 与200 $\mu\text{g/L}$ 的HGF对牙髓细胞增殖能力的促进作用

无显著性差异($P > 0.05$),即当浓度大于100 $\mu\text{g/L}$ 时不表现出相应的促进增强作用,说明肝细胞生长因子对牙髓细胞的最大效应剂量为100 $\mu\text{g/L}$ 。

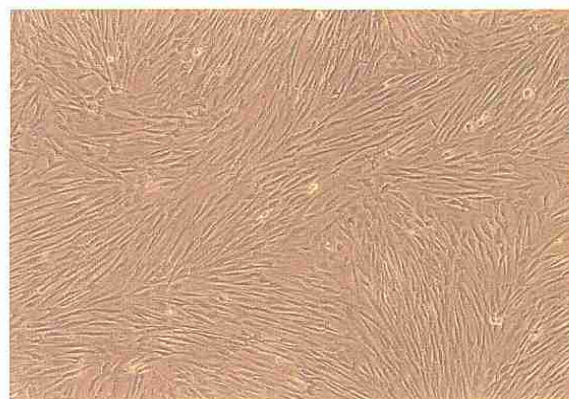


图1 倒置相差显微镜下的牙髓细胞 $\times 100$

Fig 1 The pulp cell in inverted phase contrast microscopy $\times 100$



图2 波形丝蛋白染色示波形丝蛋白阳性 LsAB $\times 200$

Fig 2 Immunostaining of vimentin was positive in the pulp cell LsAB $\times 200$

2.3 细胞周期情况

实验组和对照组细胞周期分期情况见表2。从表2可见第3天时实验组和对照组不同细胞亚期的比例相近($P > 0.05$),第5天实验组S期比例明显上升($P < 0.05$),说明100 $\mu\text{g/L}$ 的肝细胞生长因子作用5 d即对细胞的增殖有明显促进作用。

3 讨论

HGF由Michalopoulos等⁷于1982年从部分肝切除的大鼠血浆中提取,因可促进肝细胞生长,故命名为肝细胞生长因子。HGF基因大约70 kb,位于人的第7号染色体7q11-2-q21,其前体由728个氨基酸残基组成单链,经蛋白酶水解作用产生活性形式即由分子量69 kD的 α 链和34 kD的 β 链通过二硫键形成的异二聚体⁸。研究发现HGF可来源于除肝细胞外的多种组织细胞,如纤维母细胞、牙乳头细胞、牙龈成纤维细胞等^{9,10}。肝细胞生长因子的跨膜受体为c-met,HGF-c-met信号传导通路广泛存在于各种细胞,

HGF 与 c-met 结合后可通过激活 MAPK、PI3- K、Rho、Stat3 和 Bcl-2 等通路,起到显著的促细胞运动、分裂、分化、血管生成、凋亡调节等作用¹¹,此外它在上皮间充质的相互作用中也起着重要作用。

表1 不同浓度肝细胞生长因子作用下牙髓细胞的 MTT 值(n = 3, $\bar{x} \pm s$)
Tab 1 MTT value of different times and groups(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

| 时间 | 对照组 | HGF 浓度(μg/L) | | | | | |
|-----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 |
| 1 d | 0.087 ±0.002 | 0.088 ±0.011 | 0.078 ±0.006 | 0.081 ±0.005 | 0.102 ±0.038 | 0.083 ±0.004 | 0.091 ±0.002 |
| 3 d | 0.116 ±0.017 | 0.127 ±0.019 | 0.117 ±0.007 | 0.120 ±0.011 | 0.118 ±0.007 | 0.128 ±0.016 | 0.120 ±0.011 |
| 5 d | 0.167 ±0.023 | 0.292 ±0.020 | 0.297 ±0.025 | 0.309 ±0.005 | 0.317 ±0.003 | 0.334 ±0.016 | 0.333 ±0.033 |
| 7 d | 0.347 ±0.018 | 0.419 ±0.038 | 0.438 ±0.040 | 0.449 ±0.045 | 0.463 ±0.037 | 0.493 ±0.070 | 0.489 ±0.050 |

表2 实验组和对照组细胞周期分期情况(n = 3, %)
Tab 2 Subcycle proportion of dental pulp cells of two groups(n = 3, %)

| 细胞周期 | 实验组 | | 对照组 | |
|------------------|------|------|------|------|
| | 3 d | 5 d | 3 d | 5 d |
| G ₁ | 66.5 | 65.3 | 62.1 | 70.9 |
| S | 18.3 | 28.8 | 19.4 | 24.3 |
| G ₂ M | 15.2 | 5.9 | 18.5 | 4.8 |

有研究显示 HGF 可在人和鼠牙乳头细胞中表达,与牙齿的形态、牙本质牙髓发育关系密切^{2,3}。急性牙髓炎患者的牙髓组织中可检出 HGF 量的增加⁶。根尖囊肿的成纤维细胞可表达 HGF¹²,说明 HGF 与牙髓组织的病理生理过程密切相关。本实验首次采用 MTT 法和流式细胞术探讨了 HGF 对体外培养的牙髓细胞增殖的影响。

MTT 结果显示超过 100 μg/L 浓度的肝细胞生长因子未表现出促细胞增殖效应的增强,说明 100 μg/L 是肝细胞生长因子作用于牙髓细胞的最佳浓度。细胞增殖与分裂周期密切相关,完整的细胞分裂周期分为 G₁ 期、S 期和 G₂M 期¹³。细胞处于不同期的核酸量是不同的,通过荧光标记测定细胞核酸量,并划分细胞周期亚期。不同期细胞的比例可反应细胞群体的增殖活性,流式细胞仪是目前常用的进行细胞周期分析的方法¹⁴。肝细胞生长因子作用 3 d 对牙髓细胞的细胞周期无显著性影响,而作用 5 d 后可明显减少 G₁ 期比例,增加 S 期比例,表明牙髓细胞在肝细胞生长因子作用下可能加快了 mRNA 的转录和各种蛋白质的翻译合成以及各种细胞器的组装,发挥了对细胞的促增殖效应。本实验证实了 HGF 对体外培养的牙髓细胞增殖的促进作用,提示 HGF 在牙髓修复中可能具有一定的作用。但 HGF 对牙髓细胞分化和功能的影响还有待进一步研究,进而全面解释 HGF 在牙髓修复中的作用机制。

[参考文献]

1] 黄 韵,哈小琴,吴祖泽. 肝细胞生长因子对主要器官 L 组织

2] 杨 涛,牛 勃,程牛亮,等. 重组人肝细胞生长因子 的纯化与活性测定 J . 中国药物与临床,2004,4 (1) :28-30.

3] 蒋逸风,林晓耘,陈双红,等. 肝细胞生长因子对冠状动脉平滑肌细胞增殖迁移的影响 J . 第二军医大学学报,2003,24 (5) :523-524.

4] 周 青,王玉新,王绪凯,等. 肝细胞生长因子对大鼠颌下腺细胞增殖的影响 J . 中华实验外科杂志,2002,19 (6) :540-542.

5] Tabata M, Kim K, Liu J G, et al. Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars J . Develop - ment , 1996,122 (4) :1243-1251.

6] Ohnishi T, Suwa M, Oyanma N, et al. Prostaglandin E₂ predominatly induces production of hepatocyte growth factor/scatter factor in human dental pulp in acute inflammation J . J Dent Res ,2000,79 (2) :748-755.

7] Michalopoulos G, Cianciulli HD, Novotny AR, et al. Live regenera - tion studies with rat hepatocytes in primary culture J . Cancer Res , 1982,42 (11) :4673-4682.

8] Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor J . Nature ,1989 ,342 (6248) :440-443.

9] Kajihara T, Ohnishi T, Arakaki N, et al. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and c-met in human dental papilla and fi - broblasts from dental papilla J . Arch Oral Biol ,1999 ,44 (2) :135-147.

10] Ohshima M, Noguchi Y, Ito M, et al. Hepatocyte growth factor se - creted by periodontal ligament and gingival fibroblasts is a major che - moattractant for gingival epithelial cells J . J Periodontal Res , 2001 , 36 (6) :377-383.

11] Tajima H, Matsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell growth and cell motility by HGF and receptor expression in various cell species J . Exp Cell Res ,1992 ,202 (2) :423-431.

12] Ohshima M, Nishiyama T, Yamazaki Y, et al. Hepatocyte growth fac - tor is a predominant chemoattractant for gingival epithelial cells pro - duced by radicular cyst-derived fibroblast-like cells J . J Oral Sci , 2000,42 (2) :101-106.

13] 赵寿元,金承志,丁小燕,等译. 基础细胞生物学:细胞分子生 物学入门 M . 上海:上海科学技术出版社,2002 :501-502.

14] 宋平根,李素文主编. 流式细胞术的原理和应用 M . 北京:北 京师范大学出版社,1992 :130-131.

(本文编辑 王 晴)