

[文章编号 1000-1182(2005)03-0187-04]

基础研究 ·

人类牙乳头细胞的体外培养及细胞生物学性状研究

谢家敏, 田卫东, 汤 炜, 陈希哲, 郑晓辉, 王 涛

(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 体外分离培养人类牙乳头细胞, 并对传代细胞的生物学特性进行研究。方法 选择3~4月胎龄的自然流产人胚胎, 分离牙乳头, 组织块法培养人类牙乳头细胞并鉴定。观察细胞的生长特性, 经型胶原、纤维粘连蛋白和层粘连蛋白免疫细胞化学染色及细胞矿化诱导后的钙盐染色对细胞的生物学性状进行研究。结果 分离培养的人类牙乳头细胞在体外生长良好, 细胞及分泌基质中的型胶原、纤维粘连蛋白和层粘连蛋白表达阳性。将培养细胞行矿化诱导后, 细胞可形成钙化基质。结论 通过机械分离及贴壁法可获得人类牙乳头细胞, 其传代细胞在基质形成和矿化能力方面与体内人牙乳头细胞有相似性, 有潜力作为牙组织工程的种子细胞。

[关键词] 牙乳头细胞; 细胞培养; 基质; 矿化

[中图分类号] R 780.2 **[文献标识码]** A

Culture and Characteristics of Human Dental Papilla Cells *in vitro* XIE Jia-min, TIAN Wei-dong, TANG Wei, CHEN Xi-zhe, ZHENG Xiao-hui, WANG Tao. (Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To culture human dental papilla cells (HDPCs) and to study its cytobiological characters *in vitro*. **Methods** HDPCs were isolated and cultured with explant culture technique *in vitro*; Type collagen, fibronectin and laminin were detected in HDPCs and its secreted matrix with the immunocyto-chemical stain; HDPCs were incubated in mineralized promoting solution containing 10 mmol/L -glycerophosphate, 100 mg/L of ascorbic acid and 10 nmol/L dexamethasone supplemented with 10% FBS and the form of mineralized nodules was tested with Alizarin Red S staining. **Results** Cultured HDPCs *in vitro* were well growing in DMEM/F12. Type collagen, fibronectin and laminin staining were all positive in both HDPCs and its secreted matrix, and laminin was stained with bunchiness in matrix. Mineralized nodules formed after cultured 27 days by Alizarin Red S staining. **Conclusion** HDPCs isolated and cultured are well growing *in vitro*, have a capability of synthesizing and secreting matrix and in mineralized promoting solution, are able to form mineralizer, so, HDPCs have a capacity of seed cell of tissue engineering regeneration tooth.

[Key words] dental papilla cell; cell culture; extracellular matrix; mineralization

牙髓-牙本质复合体构成牙齿的主体, 是组织工程化牙齿构建的第一步¹。关于组织工程化牙髓-牙本质复合体种子细胞的研究, 主要以牙间充质细胞和牙髓干细胞为主, 对牙乳头细胞的研究较少, 对人类牙乳头细胞的研究更少。人类牙乳头细胞是牙髓细胞、牙本质细胞上游的“近亲”细胞, 具有重要的研究价值。本实验对人类牙乳头细胞 (human dental papilla cells, hDPCs) 的体外分离培养及生物学特性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

超净工作台 (苏州净化仪器设备厂); CO₂ 细胞培养箱 (FORMA 公司, 美国); 倒置显微镜及照相系统 (OLYMPUS 公司, 美国); 体视解剖显微镜及照像系统 (重庆光学仪器厂产品); 解剖器械、培养瓶、细胞计数板等。

DMEM (dubecco's modified eagle medium) / F12 培养基 (1:1)、胰蛋白酶、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitor factor, LIF)、-甘油磷酸钠和 L-抗坏血酸均购自美国 GIBCO 公司; 地塞米松和纤粘连蛋白 (fibronectin, Fn) 均购自美国 Sigma 公司; 广谱鼠抗人细胞角蛋白 (pan cytokeratin, PCK) 多克隆抗体、鼠抗人波形丝蛋白 (vimentin) 单克

[收稿日期 2005-01-04; 修回日期 2005-04-01]

[基金项目] 教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划资助项目 (2003682); 国家科技部重大基础研究前期专项资金资助项目 (2002CCC00700)

[作者简介] 谢家敏 (1969-), 男, 四川人, 讲师, 博士

[通讯作者] 田卫东, Tel: 028-85503406

隆抗体、兔抗人型胶原单克隆抗体、兔抗人纤维粘连蛋白单克隆抗体、兔抗人层粘连蛋白(laminin, LN)和LsAB免疫组化检测试剂盒多克隆抗体均购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离和原代培养 选择自然流产的3~4个月胎龄的人胚胎,口腔黏膜消毒,切取上、下颌标本, Hank's液冲洗3次,无菌条件下分离上、下颌磨牙牙胚,置入pH7.2的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中。PBS冲洗3次后经5 g/L的胰蛋白酶4消化10 min。体视显微镜下在含血清的培养基中将牙乳头与成釉器分离。分离的牙乳头行组织块法培养,培养液为含 10^6 U/L LIF及10% FBS的DMEM/F12(1:1),每3 d换液1次,待细胞停止游出时,去除牙乳头组织块。

1.2.2 细胞传代培养及鉴定 当培养瓶中原代细胞长满瓶底面积90%时,用消化贴壁法传代并纯化细胞,去除残留上皮细胞。取第4代细胞做细胞爬片,行细胞角蛋白和波形丝蛋白免疫细胞化学染色以鉴定细胞来源,行苏木精-伊红染色观察细胞形态。

1.2.3 细胞生长曲线和倍增时间测定 取第4代人牙乳头细胞,用2.5 g/L胰酶消化制成细胞悬液,以 3×10^5 个/毫升的密度接种于24孔板内,每孔100 μ l。每天取3孔细胞计数,每次重复计数1次,连续8 d,取平均值,绘制生长曲线。取对数生长期细胞计算倍增时间(double time, DT),其计算公式为: $DT = \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0) \times t$,其中 N_0 和 N_t 分别表示接种时和培养t小时后的细胞数。

1.2.4 免疫细胞化学染色 取第4代人牙乳头细胞,2.5 g/L胰酶消化制成细胞悬液,以 2×10^4 /ml的密度接种于置有盖玻片的24孔板内制备细胞爬片。爬片用0.01 mol/L PBS漂洗,4%多聚甲醛固定30 min后,吹干, LsABN免疫组化染色法染色后光镜观察。

1.2.5 细胞矿化培养 实验分实验组和对照组。实验组:将第4代人牙乳头细胞培养于含有10 mmol/L-甘油磷酸钠、100 mg/L维生素C、10 nmol/L地塞米松和10% FBS的DMEM/F12培养液中进行矿化诱导。对照组:将第4代人牙乳头细胞培养于只含10% FBS的DMEM/F12培养液中。倒置显微镜下观察两组细胞形态变化及矿化情况。培养后的细胞爬片用4%多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次,加0.1%的茜素红37下染色30 min, PBS洗涤后光镜下观察。

2 结果

2.1 细胞培养及鉴定结果

组织块培养3~5 d后可见细胞从组织块周围向

外迁移。5~6 d细胞在组织块周围形成放射状排列,向外延展连接成片。13~14 d细胞可长满瓶底面积80%~90%。移出细胞呈长梭形,逐渐变为梭形、三角形和多角形,边缘突起,胞浆宽大,密集生长后细胞呈梭形(图1)。细胞透明度高,折光性强,轮廓模糊,胞核位于中央,核仁清晰,少数核呈分离相。免疫细胞化学染色显示,细胞波形丝蛋白表达阳性(图2),细胞角蛋白染色表达阴性(图3),提示细胞来源于外胚层间叶组织。



图1 人牙乳头细胞呈梭形或三角形,胞浆丰富 HE $\times 20$

Fig 1 The hDPCs shape was fusiform or triangle and cytoplasm was abundant HE $\times 20$



图2 人牙乳头细胞波形丝蛋白表达阳性 LsAB $\times 10$

Fig 2 The positive staining of vimentin in cytoplasm of hDPCs LsAB $\times 10$



图3 人牙乳头细胞角蛋白表达阴性 LsAB $\times 40$

Fig 3 The negative staining of cytokeratin in hDPCs LsAB $\times 40$

2.2 细胞生长曲线和倍增时间

本实验绘制的 hDPCs 生长曲线呈“S”形(图 4)。从图 4 可见,接种 2 d 后细胞数量开始增加,3 d 后细胞快速增殖进入对数生长期,第 7 d 达到高峰,以后增殖速度减慢进入平台期,细胞倍增时间为 $(55 \pm 4.6) \text{ h}$ 。

2.3 人牙乳头细胞的免疫细胞化学观察结果

人牙乳头细胞的免疫细胞化学观察结果见图 5~7。从图 5 可见,型胶原表达于细胞及其分泌的基质,说明细胞具有合成分泌型胶原的能力。从图 6 可见, FN 在细胞及部分基质中阳性表达,说明细胞具有合成分泌 FN 的能力。从图 7 可见, LN 不但在细胞及分泌基质中表达阳性,而且在基质中还呈束状分布,说明细胞具有合成分泌 LN 的能力。

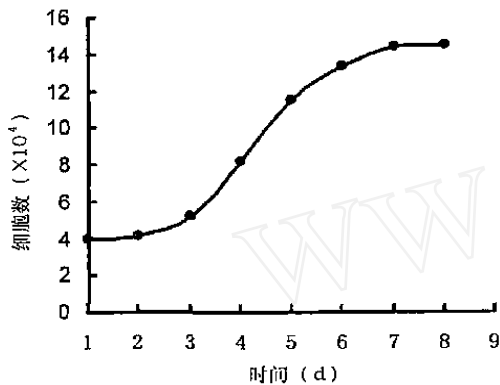


图 4 人牙乳头细胞生长曲线

Fig 4 The growth curve of hDPCs



图 5 型胶原在体外培养的人牙乳头细胞及细胞外基质中表达阳性 LsAB $\times 20$

Fig 5 The positive staining of type collagen in hDPCs and its secreted matrix LsAB $\times 20$

2.4 细胞的矿化培养

实验组人牙乳头细胞诱导培养前 3 d,细胞形态与对照组无明显差别;5 d 细胞出现聚集样生长;12 d 细胞呈复层生长,出现圆形或卵圆形结节,结节区细胞团中央出现颗粒样改变,连接成片,出现肉眼可见的白色结节(图 8)。白色结节逐渐增大,中央出现不

透光区;27 d 结节茜素红染色呈褐红色(图 9)。对照组只见细胞生长密集,茜素红染色无钙盐结节形成。

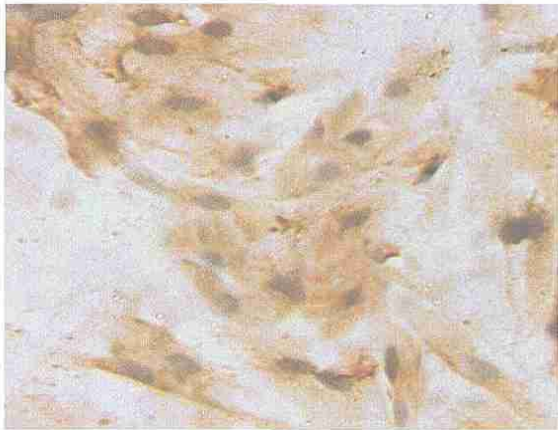


图 6 FN 在体外培养的人牙乳头细胞及部分基质中表达阳性 LsAB $\times 20$

Fig 6 The positive staining of FN in hDPCs and its secreted matrix LsAB $\times 20$

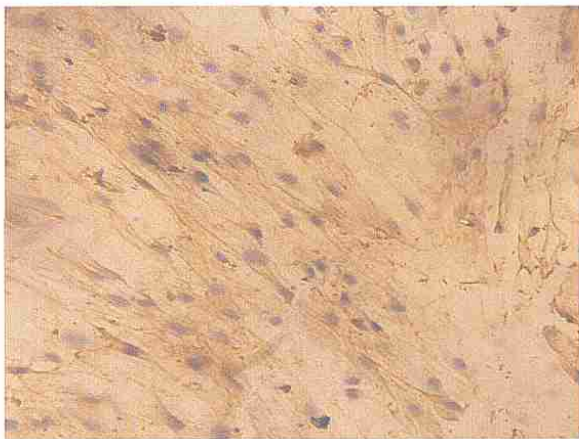


图 7 LN 在体外培养的人牙乳头细胞及基质中表达阳性,基质中呈束状分布 LsAB $\times 10$

Fig 7 The positive staining of LN in hDPCs and its secreted matrix and staining with bunchiness in matrix LsAB $\times 10$

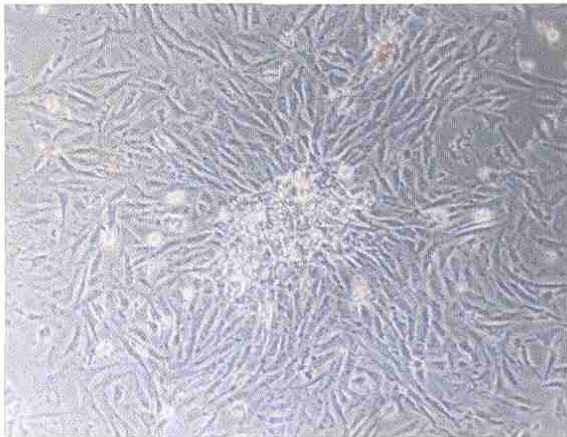


图 8 实验组人牙乳头细胞矿化诱导 12 d 后形成肉眼可见的白色结节 $\times 10$

Fig 8 The white nodules formed after cultured 12 days $\times 10$



图9 实验组人牙乳头细胞矿化诱导 27 d 后形成褐色结节
茜素红染色 $\times 20$

Fig 9 Fusco-ferruginous mineralized nodules formed after cultured 27 days Alizarin Red S staining $\times 20$

3 讨论

消化贴壁法是一种简单有效、对细胞损伤小的细胞纯化方法。它利用间充质细胞贴壁速度较上皮细胞快的特点,去除了部分上皮细胞利于细胞纯化。由于间充质细胞对胰酶的耐受性较低,先脱壁,可进一步去除上皮细胞。本实验通过消化贴壁法获得了较高纯度的人类牙乳头间充质细胞,为人类牙乳头细胞的研究提供了可行性。

人类牙胚与周围组织界限清楚,容易解剖分离,取出的牙胚经过高浓度的胰酶处理后,在体视显微镜下,能将牙乳头与周围组织彻底分离。波形丝蛋白是正常间叶细胞的特异性标志,而广谱细胞角蛋白是正常上皮细胞的表达蛋白,Lesot 等² 对小鼠磨牙胚的研究证实波形丝蛋白仅存在于牙乳头,所以本实验用波形丝蛋白和细胞角蛋白的双重染色对细胞进行鉴定,结果证实培养细胞为牙乳头间充质细胞。

要构建组织工程再生牙,作为种子细胞必须具有体外合成分泌细胞外基质的能力。研究体外培养的人类牙乳头细胞的基质形成能力,对体外组织工程牙的构建有着十分重要的作用。本实验研究发现,型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白在人类牙乳头细胞及细胞外基质中表达活跃,说明经过体外分离培养的人类牙乳头细胞仍具有合成并分泌细胞外基质的能力。

牙齿硬组织是由细胞和矿化的细胞外基质组成,所以体外培养的种子细胞除了要具有分泌合成细胞外基质能力外,细胞的矿化基质形成能力与牙齿硬组

织的构建也密切相关^{3,4}。当胶原蛋白提供了胞外基质矿化所需的支架和空间时,矿化蛋白作为矿化结晶调控分子进入预先形成的结构基质中,通过结合钙离子形成纳米羟基磷灰石,并与晶体进一步作用调控钙盐沉积、结晶大小和形态^{5,6}。Bouvier 等⁷ 研究发现,细胞复层生长能力是形成细胞结节的先决条件,结节形成标志是钙盐染色阳性。本实验亦对人类牙乳头细胞的体外矿化能力进行了研究,结果显示体外培养的人类牙乳头细胞在含-甘油磷酸钠、抗坏血酸、地塞米松和 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,细胞出现聚集样复层生长,并逐渐形成了茜素红阳性染色的钙盐结节,说明牙乳头细胞在体外环境下,亦具有形成矿化基质的能力。

本实验通过机械分离及贴壁法成功获得人类牙乳头细胞,研究发现体外培养的人类牙乳头细胞经扩增传代后,其合成分泌胞外基质的能力仍然活跃,能形成钙盐基质,在基质分泌和矿化能力方面与体内人牙乳头细胞有相似性,但其分泌基质和形成的钙盐结节成分及是否具有形成牙本质的潜能还需做进一步研究。

[参考文献]

- 1] Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds J. J Dent Res, 2002, 81(10): 695-700.
- 2] Lesot H, Meyer JM, Ruch JV, et al. Immunofluorescent localization of vimentin, prekeration and actin during odontoblast and ameloblast differentiation J. Differentiation, 1982, 21(2): 133-137.
- 3] Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins J. Connect Tissue Res, 2003, 44(suppl 1): 33-40.
- 4] MacDougall M, Simmons D, Gu TT, et al. MEPE/OF45, A new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21 J. Connect Tissue Res, 2002, 43 (2-3): 320-330.
- 5] He G, Dahl T, Veis A, et al. Nucleation of apatite crystals *in vitro* by self-assembled dentin matrix protein 1 J. Nat Mater, 2003, 2 (8): 552-558.
- 6] Wallwork ML, Kirkham J, Chen H, et al. Binding of dentin noncollagenous matrix proteins to biological mineral crystals: An atomic force microscopy study J. Calcif Tissue Int, 2002, 71 (3): 249-255.
- 7] Bouvier M, Joffe A, Magloire H. *In vitro* mineralization of a three-dimensional collagen matrix by human dental pulp cells in the presence of chondroitin sulphate J. Arch Oral Biol, 1990, 35(4): 301-309.

(本文编辑 王 晴)