

[文章编号] 1000-1182(2011)04-0429-05

鼠根端乳头条件培养基诱导下的牙周膜细胞膜片与牙本质管和煅烧骨间的牙周膜再生

宁慧影 刘宏伟

(同济大学附属口腔医院 牙周科, 上海 200072)

[摘要] 目的 利用鼠根端乳头条件培养基(APTG-CM)与牙周膜细胞(PDLCs)建立间接共培养体系,探讨牙周组织再生的研究。方法 胶原酶联合组织块法获得人PDLCs,用波形蛋白和角蛋白鉴定PDLCs的来源。APTG-CM诱导PDLCs 28 d,通过免疫细胞化学法检测PDLCs中骨钙素(OCN)、Ⅰ型胶原(COL I)、骨涎蛋白(BSP)的表达;观察细胞外部形态。体外构建牙本质管与牙周膜细胞膜片和煅烧骨(CBB)颗粒移植体,植入裸鼠皮下8周,观察牙周组织再生情况。结果 体内实验结果显示:经过APTG-CM诱导后,PDLCs在牙本质和CBB表面均有牙骨样基质形成,且在CBB表面有纤维组织的黏附和垂直嵌入。对比而言,PDLCs的生长在CBB的表面要好于在牙本质管。而对照组无纤维的垂直嵌入。结论 经过APTG-CM孵育的PDLCs有向成牙骨质细胞谱系转化的功能,APTG-CM有利于牙周组织再生。

[关键词] 根端乳头细胞; 根端乳头条件培养液; 牙周膜细胞; 细胞外基质; 微环境

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.04.024

Periodontal ligament regeneration using apical tooth germ cell-conditioned medium induced periodontal ligament cells sheet between dental tube and ceramic biologic bone Ning Huiying, Liu Hongwei. (Dept. of Periodontology, School of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to establish an indirect co-culture system of rat apical tooth germ-conditioned medium(APTG-CM) and periodontal ligament cells(PDLCs). **Methods** PDLCs were isolated and cultured through the method of enzyme-digestion. Vimentin and cytokeratin(CK) were used to demonstrate the cells' mesenchymal derivation. Co-culture system of APTG-CM and PDLCs for 28 days, osteocalcin(OCN), collagen type (COL I) and bone sialoprotein(BSP) were detected in PDLCs by immunocytochemistry. Morphological changes were observed by inverted microscope. With building a transplant by dental tube, periodontal ligament cell sheet and ceramic biologic bone(CBB) *in vitro*, then, the combinations of dental tube and PDLCs incubated by APTG-CM were implanted subcutaneously into athymic mice for 8 weeks. **Results** This study demonstrated that cellular cementum-like tissue formed along the dentin surface and CBB, with fibrous tissue adjacent or inserted into CBB *in vivo*. PDLCs were grown better in the CBB than in dentin tubes. And the vertical fibers can't embed in the control. **Conclusion** PDLCs, embedded within this APTG-CM, exhibit several phenotypic characteristics of cementoblast lineages. Thereby it contributes to the main processes of periodontal tissue regeneration with rat APTG-CM.

[Key words] apical tooth germ cell; apical tooth germ-conditioned medium; periodontal ligament cell; extracellular matrix; microenvironment

从发育学的角度考虑,牙周组织的发育受细胞和微环境的复杂调控,涉及上皮和间充质的相互调控以及多种细胞因子的参与^[1]。促进牙周组织再生的

机制大致相同,均是在调动机体固有潜在修复能力的基础上,利用牙周膜中存在的前体细胞及周围间充质细胞的增殖、分化,促进牙周组织再生。本实验的目的就是利用经过鼠根端乳头条件培养基(apical tooth germ-conditioned medium, APTG-CM)诱导的牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs)膜片与牙本质管和煅烧骨(ceramic biologic bone, CBB)构建一个新的复合体,植入裸鼠体内。观察经APTG-CM诱导的牙周膜细胞膜片(periodontal ligament cell

[收稿日期] 2010-07-02; [修回日期] 2011-04-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30772418);上海市科委重点攻关课题基金资助项目(074119514)

[作者简介] 宁慧影(1982—),女,黑龙江人,住院医师,硕士

[通讯作者] 刘宏伟, Tel: 021-66313739

sheet)在牙源性材料和非牙源性材料中的牙周膜再生情况。

1 材料和方法

1.1 主要制剂和仪器

SD大鼠(同济大学实验动物中心),胎牛血清、DMEM高糖培养基(Gibco公司,美国),型胶原酶、0.25%胰蛋白酶(Sigma公司,美国),青链霉素(Gibco公司,美国),SABC免疫细胞化学试剂盒(Dako公司,美国),DAB显色试剂盒(上海长岛生物技术有限公司),TRIzol Reagent(Life Technologies公司,美国),RNA抽提试剂盒和逆转录试剂盒(Fermentas公司,美国),DGL-2000 DNA Marker(北京天为时代),*Taq* DNA聚合酶、dNTPs和引物(上海生物工程公司),琼脂糖(Sigma公司,美国),二氧化碳恒温孵箱(Forma公司,美国),YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂),倒置相差显微镜及照相系统(Olympas公司,日本),6孔培养板(Falcon公司,美国),酶联免疫检测仪(南京华东电子管厂),凝胶成像分析仪(Vitber Tourmat公司,法国)等。

1.2 方法

1.2.1 APTG-CM的制备 选择3只2~3 d的SD仔鼠,脱颈处死,75%乙醇中浸泡5 min,0.01 mol·L⁻¹ PBS再漂洗3遍。分离上下颌第一磨牙完整牙胚,将牙胚颈部组织剪碎,加入型胶原酶,置于37℃细胞培养箱中消化0.5 h。消化结束后,反复吹打,加适量DMEM高糖培养基稀释胶原酶,800 r·min⁻¹离心2 min,弃上清,沉淀物用DMEM洗涤2次,每次1 000 r·min⁻¹,离心1 min,洗净残余胶原酶。沉淀物中加入含10% FBS的DMEM培养基,混匀,接种于25 cm²培养瓶,在37℃ 5% CO₂饱和湿度条件下培养,细胞密度达70%汇合,传为1代。然后,隔天换液1次,置换出来的培养液用0.22 μm小滤器过滤除去杂质,加入等量含10% FBS的DMEM制成条件培养液APTG-CM,备用。

1.2.2 牙周膜细胞膜片的制备 于同济大学附属口腔医院口腔外科门诊,取正畸拔除,无牙体龋坏、牙周组织炎症第一前磨牙4颗,0.01 mol·L⁻¹ PBS冲洗,刮取根中1/3区域牙周膜组织。切割成约1 mm³的小块,置于25 cm²培养瓶(含10% FBS、100 μm·L⁻¹抗坏血酸、0.292 mg·mL⁻¹谷氨酰胺、100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的DMEM培养)。在37℃、5% CO₂饱和湿度条件下培养5~8 d,直至有细胞从组织块边缘爬出。细胞生长达80%汇合时用胰酶和EDTA(pH=6.4)消化传代,标记为第1代。取第3~5代牙周膜细胞,APTG-CM条件培养基诱导,2~4周后,当细胞膜片

边缘分层时,细胞铲刮下膜片,即为牙周膜细胞膜片,保存备用。

1.2.3 煅烧骨的制备 第四军医大学口腔医学院组织工程中心友情提供,研磨成粉末,高温高压消毒,24 h内备用。

1.2.4 牙本质管的制备 取正畸拔除的牙齿,用预冷生理盐水反复漂洗,机械法去除牙齿所附的软组织并将根尖切除5 mm。去除釉质和牙骨质,用裂钻制备成内径1.5 mm,外径3 mm直径的圆盘状。用乙醚、乙醇脱脂、脱水各30 min,达到部分脱矿和脱蛋白的作用。然后,在4℃下,放入DMEM培养液中保存备用。

1.2.5 牙本质管-牙周膜细胞膜片-CBB复合体构建 将制备好的牙周膜细胞膜片从培养皿中刮出,平铺入预先准备好的无血清培养基中,膜片伸展,将CBB粉末放入膜片上,进而用膜片包裹住CBB。膜片具有弹性和黏性,可以包裹住粉团(粉团大小视牙本质管内径而定)。这时可以将其放入准备好的牙本质套管内叠加,则复合体构建完成,放入培养箱内孵育(约1 h),期间准备动物手术移植。

1.2.6 动物模型的建立 选取6周龄SCID免疫缺陷鼠7只,无菌条件下用眼科剪在颈后部皮肤正中剪开约1 cm,再以血管钳钝性分离制作皮下袋。共设计7组经APTG-CM诱导的膜片移植为实验组,分别为:1)10个牙本质管-牙周膜细胞膜片-CBB复合体(实验组、对照组各5个);移植分别植入5只SCID免疫缺陷鼠皮下,左右侧植入各1个,左侧定为实验组APTG-CM诱导的PDLCs,右侧定为对照组(未经诱导的PDLCs)。2)单纯牙本质管和CBB各2个,2个1组,植入2只裸鼠皮下,左侧为牙本质管,右侧为CBB团。

1.2.7 牙周膜细胞免疫细胞化学鉴定 制作细胞爬片:取对数生长期的PDLCs,消化制备成单细胞悬液,转移至预置10 mm×10 mm玻片的6孔培养板,制作细胞爬片。待细胞长满60%~70%,取出细胞爬片,0.01 mol·L⁻¹ PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定120 min,再用PBS清洗3次,室温干燥后置低温冰箱备用。SABC法免疫细胞化学染色,脱水,中性树胶封片,镜下观察波形蛋白(Vimentin)和角蛋白(cytokeratin, CK)的表达情况,从而鉴定PDLCs的来源。

1.2.8 RT-PCR检测 将与APTG-CM共培养及常规培养28 d的PDLCs行常规消化、离心后,用0.01 mol·L⁻¹ PBS洗2次,根据TRIzol Reagent产品说明提取总RNA。根据Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit操作说明将5 μg总RNA逆转录为cDNA。逆转录反应:

总RNA 5 μ g, Oligo(dT)18 1 μ L, 去离子水至总体积 12 μ L, 70 $^{\circ}$ C 5 min; 5 \times 缓冲液4 μ L; 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs混合物2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5 min, Revert Aid™ M-MuLV逆转录酶200 U, 终体积20 μ L。70 $^{\circ}$ C 10 min。取出, 冰上冷却, 即完成cDNA第1链的合成。按照 RT-PCR试剂盒说明书进行逆转录及cDNA的扩增。94 $^{\circ}$ C变性3 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s 35个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 72 $^{\circ}$ C延长1 min。预期产物分别为: 201 bp骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、297 bp骨钙素(osteocalcin, OCN)、300 bp 型胶原(collagen type I, COL I)、100 bp β -actin。引物序列如下。BSP-正义: 5'-GAACAACCTCCCCACCTT-TT-3', BSP-反义: 5'-TCTGACCATCATAGCCAT-CG-3'。OCN-正义: 5'-ATGAGAGCCCTCAGACT-CCTC-3', OCN-反义: 5'-CGGGCCGTAGAAGCG-CCGATA-3'。COL I-正义: 5'-CTGACCTTCCTG-CGCCTGATGTCC-3', COL I-反义: 5'-GTCTGG-GGCACCAACGTCCAAGGG-3'。

取PCR扩增产物10 μ L点样于10 g \cdot L⁻¹琼脂糖凝胶, DGL-2000 DNA Marker 10 μ L作参照, 80 V电压下电泳, 于紫外线箱中观察并照相记录。

1.2.9 动物标本苏木精-伊红染色 标本移植8周后取材, 4%多聚甲醛固定, 10%EDTA脱钙液脱钙8周, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 苏木精-伊红染色。

2 结果

2.1 牙周膜细胞的分离鉴定

以往研究证实^[2], 与其他间充质干细胞一样, 人PDLCS具有很强的克隆形成能力。免疫细胞化学染色显示: 波形蛋白阳性(图1), 提示细胞来源于间充质, 角蛋白阴性, 证明所获得的PDLCS无上皮来源的污染。

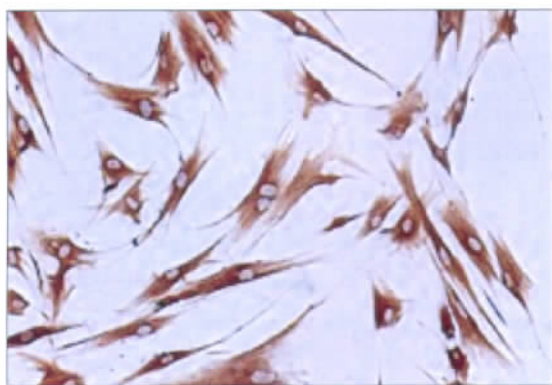


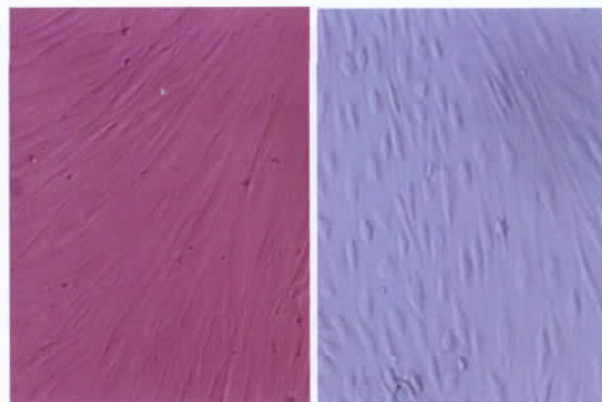
图1 PDLCS波形蛋白阳性染色 SABC \times 200

Fig 1 Positive expression of Vimentin in PDLCS SABC \times 200

2.2 诱导后PDLCS的形态改变

未诱导的PDLCS始终保持长梭形态, 即使是在标

准培养基内持续培养4周后, 其形态也未发生明显改变(图2左)。而在共培养组, 经APTG-CM诱导22 d的部分PDLCS, 逐渐丧失了其最初的长梭形态, 呈现出类似成牙骨质细胞或成骨细胞的短梭形或圆形(图2右)。不仅如此, 随着体外培养时间的延长, 这些短梭形或圆形细胞比例增加。



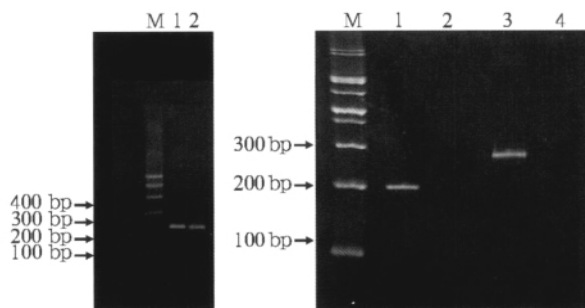
左: 对照组; 右: APTG-CM诱导组。

图2 PDLCS形态比较 倒置显微镜 \times 100

Fig 2 A comparison on the morphology of PDLCS inverted microscope \times 100

2.3 诱导后PDLCS基因表达的改变

RT-PCR检测结果显示: 实验组与对照组PDLCS均表达COL I(图3A), 经APTG-CM诱导28 d的PDLCS同时还表达BSP、OCN(图3B)。一般来说, BSP、OCN多表达于成牙骨质细胞和成骨细胞^[3-4]。



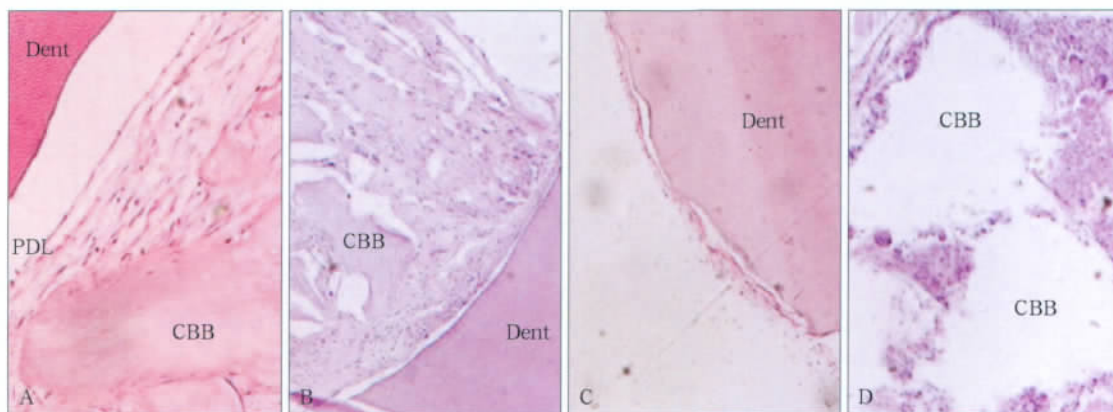
左侧M: Marker; 1: 诱导组COL I; 2: 对照组COL I。右侧M: Marker; 1: 诱导组BSP; 2: 对照组BSP; 3: 诱导组OCN; 4: 对照组OCN。

图3 RT-PCR检测对照组和诱导组的PDLCS的COL I、BSP和OCN的RNA表达

Fig 3 The RNA expression of COL I, BSP and OCN between control group and induction group of PDLCS by RT-PCR assay

2.4 苏木精-伊红染色结果

诱导组在CBB表面有牙周膜样纤维组织形成, 纤维排列有序, 与CBB表面垂直, 纤维与牙本质管表面平行并可见切片裂隙(图4A); 对照组纤维排列紊乱无序(图4B); 单纯移植的牙本质管无矿化基质形成(图4C); 单纯移植的煅烧骨无矿化基质形成(图4D)。



A: 经诱导的PDLCs HE ×200; B: 对照组 HE ×100; C: 单纯牙本质管 HE ×200; D: 单纯煅烧骨 HE ×200。

图4 PDLCs在牙本质管和煅烧骨间的再生

Fig 4 PDLCs regeneration between dental tube and ceramic biologic bone

3 讨论

牙齿的发生有赖于上皮(牙板)与间充质组织(神经脊来源的外胚间充质)间相互持续、有序的信号传递,因而上皮与外胚间充质细胞也参与了牙根和牙周组织的形成^[5-7]。要达到牙周组织结构与功能的完全恢复,以下两个因素至关重要:即恰当的细胞类型、适宜的微环境。根端牙胚组织作为牙根和牙周发育的器官始基,理论上能够为牙周间充质干细胞提供类似发育期的微环境。APTG-CM条件培养基提供胚胎发育早期细胞分泌的大量信息因子,与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)或生长因子间的相互作用引发细胞的定向迁移、增殖、分化,最终模拟完成牙周组织的形态发生。MacNeil等^[8-9]在实验中将牙囊细胞分别和去除和保留了基底膜的牙本质片重组,植入鼠眼前房。结果显示,在保留了基底膜的牙本质片的表面,牙囊组织的细胞能够形成牙骨质样的矿化组织,去除基底膜,只能形成钙化的组织且与牙本质片分离。还将Hertwig上皮根鞘(Hertwig's epithelial root sheath, HERS)加入牙囊和牙本质片之间进行重组,发现去除了基底膜的移植体与牙本质片也形成了牙骨质样组织,且在保留基底膜组有25%的移植体发育了完整的牙周膜组织。说明基底膜、HERS共同在牙骨质和牙周组织中发挥重大作用。APTG-CM提供了类似HERS的生长微环境,而PDLCs膜自身分泌的生物活性因子和ECM提供的基质微环境类似基底膜的作用。APTG-CM条件培养基为PDLCs提供了良好的牙周组织发育的微环境,促进PDLCs体外形成有利于牙周再生的细胞膜片。有效诱导PDLCs向成牙骨质细胞谱系的分化。

细胞的增殖和分化离不开特定的微环境,微环境中的间质细胞能够产生一系列生长因子或配体,控制着细胞的更新和分化^[10-11]。共培养诱导模式的最大

优势在于克服了以往单因子诱导的诸多不足,在一定程度上能够更加真实地模拟间充质干细胞分化的微环境^[12-13]。Yu等^[14]采用牙齿发育早期的牙胚细胞条件液来诱导牙髓干细胞的分化,成功构建出有规则形状的牙本质牙髓复合体。由于细胞膜片是通过细胞自身分泌的细胞外基质形成内源性支架,有利于细胞与细胞间、细胞与胞外基质间的交互作用和遗传信息的传递。牙齿是一种多胚层起源的器官,其中釉质来源于牙胚发育早期的牙源性上皮细胞,而牙髓牙本质复合体起源于其周围的牙源性间充质细胞,2种细胞通过信号分子产生复杂的交互作用发育成牙齿,这种交互作用调控牙胚发育朝着精确而有序的方向进行^[15]。利用细胞膜片技术可以使整体细胞群在保持细胞间正常连接的状态下以片状形态得到托付。因此细胞膜片可以最大限度的维持细胞之间的正常连接,保持细胞外基质的完整性,同时在APTG-CM提供的微环境的诱导下,细胞和细胞之间以及细胞和自身分泌的基质之间自行选择发生交联,从而由二维的细胞-细胞外基质膜片形成一个三维的细胞聚合体。而APTG-CM在此过程中始终为PDLCs提供一个牙周发育的原始微环境,使PDLCs以自身分泌的细胞外基质作为生物性内源性支架,不受到任何其他外源因素的干扰,有利于细胞与细胞间、细胞与胞外基质间的交互作用和信息的传递,有利于移植体的构建。

本实验中,PDLCs在APTG-CM条件培养基所提供的微环境的影响下只在CBB表面形成了明显的纤维垂直嵌入,类似牙周膜样纤维;在牙本质管的表面只有部分的平行附着但无嵌入,而大部分纤维都和牙本质管分离;实验组中牙本质管和CBB之间无垂直纤维出现,但是纤维在临近牙本质管的CBB表面垂直嵌入更加的明显,形成牙周膜样组织,可见牙本质管也同时参与影响着纤维在CBB表面的排列,只是牙本质管的这种影响机制还不清楚;在牙本质

管和CBB的表面都有少量矿化基质形成,但两者在组织学上并无明显不同。近年的研究表明:PDLCS具有异质性,包含异质性的细胞群,即由不同的亚型组成,这些细胞亚型可处于不同的分化阶段或者具有不定向的分化趋势。但是PDLCS作为一个混合性的细胞群体,其中含有大量的终末分化细胞,其组织再生的能力有限。牙周膜干细胞与其他间充质干细胞来源的干细胞一样,具有很高的克隆形成率,可塑性强于PDLCS。牙周膜样纤维组织在CBB上形成的结果优于牙本质管,这种现象也出现在本课题组的其它研究中。本实验对牙本质管表面的处理是否与实验结果有关待于探讨。细胞对支架材料具有选择性,有研究表明基质微环境的物理特征在干细胞谱系专向分化过程中发挥不同作用^[16]。本实验只是利用细胞团和牙本质管的嵌和性固位,在移植过程中可能存在松动。牙本质管的厚度可能过厚,也影响了营养成分的相互渗透和细胞分子之间的传递。

[参考文献]

- [1] Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, et al. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes[J]. *Circ Res*, 2005, 96(10):1039-1041.
- [2] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament[J]. *Lancet*, 2004, 364(9429):149-155.
- [3] Macneil RL, Sheng N, Strayhorn C, et al. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis[J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(10):1597-1606.
- [4] MacNeil RL, Berry J, Strayhorn C, et al. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis[J]. *Arch Oral Biol*, 1996, 41(8/9):827-835.
- [5] Kikuchi H, Suzuki K, Sakai N, et al. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional

- cell culture[J]. *Cell Tissue Res*, 2004, 317(2):173-185.
- [6] Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: Embryonic events as a template for dental tissue repair[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001, 12(5):425-437.
- [7] Yu JH, Shi JN, Deng ZH, et al. Cell pellets from dental papillae can reexhibit dental morphogenesis and dentinogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346(1):116-124.
- [8] MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment[J]. *J Periodontol*, 1993, 64(4):285-291.
- [9] MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface[J]. *J Periodontol*, 1993, 64(2):95-102.
- [10] Yang Z, Jin F, Zhang X, et al. Tissue engineering of cementum/periodontal-ligament complex using a novel three-dimensional pellet cultivation system for human periodontal ligament stem cells[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2009, 15(4):571-581.
- [11] Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, et al. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues[J]. *J Periodontal Res*, 2009, 44(2):199-210.
- [12] Kiger AA, Jones DL, Schulz C, et al. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue[J]. *Science*, 2001, 294(5551):2542-2545.
- [13] Xie T, Spradling AC. A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary[J]. *Science*, 2000, 290(5490):328-330.
- [14] Yu J, Deng Z, Shi J, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(11):3097-3105.
- [15] Tucker AS, Sharpe PT. Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: The right shape in the right place[J]. *J Dent Res*, 1999, 78(4):826-834.
- [16] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. *Cell*, 2006, 126(4):677-689.

(本文编辑 汤亚玲)

青岛市卫生人才中心招聘

为广泛引进国内外口腔医学人才,充实和加强青岛市口腔医学人才力量,适应青岛市对口腔医学人才的需求,促进青岛市口腔医学事业的全面可持续发展,特将2011年青岛市口腔医院对口腔医学人才的需求公告如下。

一、高层次人才1人

要求:口腔颌面外科或口腔医学各专业。主任医师资格,10年以上三级甲等医院或专科医院工作经历,专业科室副主任以上任职经历。硕士或博士生导师。副省级以上城市或省会城市专业学会副主任委员以上任职经历或国家级学会专业委员会委员任职经历。获得国家或省级科研奖励,有省部级以上在研课题,在国内同行业具有较高的知名度和影响力。

二、博士研究生3人

要求:口腔医学各专业。取得医师资格证书,熟练掌握本专业常见病、多发病的诊断和治疗,具备一定的诊治疑难病例的经验,具有一定的科研能力。

联系人:侯凤春,陈平。联系电话:0532-82821883。E-mail:qdsqyyrsk@163.com。

青岛市口腔医院