

[文章编号] 1000-1182(2009)03-0340-04

# 碱性成纤维细胞生长因子对 牙周膜细胞表皮生长因子受体基因表达的影响

陈莹 林崇韬 高颖

(吉林大学口腔医院 牙周病科, 吉林 长春 130041)

[摘要] 目的 研究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人牙周膜细胞(PDLC)表达表皮生长因子受体(EGFR)的影响,探讨bFGF在牙周组织分化再生中的意义。方法 体外原代培养人PDLC,有限稀释法形成单细胞克隆,用外源性bFGF刺激单细胞克隆,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测克隆细胞内EGFR基因表达的变化。结果 bFGF促进人PDLC内EGFR mRNA的合成,并且随着质量浓度的增加促进作用增强。结论 bFGF对EGFR的促进作用很可能是牙周炎损伤修复过程中一个重要的调节因素,为牙周组织分化再生提供部分理论基础。

[关键词] 碱性成纤维细胞生长因子; 表皮生长因子受体; 牙周膜细胞; 细胞分化

[中图分类号] Q26 [文献标识码] A

**Effect of basic fibroblast growth factor on the gene expression of epidermal growth factor receptor by periodontal ligament cells in culture** CHEN Ying, LIN Chong-tao, GAO Ying. (Dept. of Periodontology, Stomatology Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of basic fibroblast growth factor(bFGF) on the gene expression of epidermal growth factor receptor(EGFR) by periodontal ligament cells(PDLC) in culture and discuss the effect of bFGF in cell differentiation and periodontal regeneration. **Methods** Human PDLC were cultured *in vitro* and cell clone was obtained by the method of limiting dilution. PDLC were stimulated by bFGF, and then gene expression of EGFR was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** The mRNA expression of EGFR was promoted by bFGF and the effect was dose-dependent. **Conclusion** The promotion effect of the mRNA expression of EGFR in PDLC may be one of important factors which participate in the healing process of periodontitis and provide partly theoretical basis of cell differentiation and periodontal regeneration.

**[Key words]** basic fibroblast growth factor; epidermal growth factor receptor; periodontal ligament cells; cell differentiation

牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLC)的表型分化对牙周组织在2种硬组织之间维持自身稳定性起重要作用。在牙周组织再生过程中,牙周膜细胞的表型分化决定治疗的预后和转归。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是肝素黏合多肽,分布于多种组织中,它是重要的有丝分裂促进因子,也是形态发生和分化的诱导因子<sup>[1]</sup>。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是牙周膜细胞成纤维表型的标记物<sup>[2]</sup>。本实验利用有限稀释法形成PDLC细胞克

隆,用外源性碱性成纤维细胞生长因子进行刺激,观察其对PDLC细胞克隆成纤维表型的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

高糖DMEM培养基、Ⅰ型胶原酶(Gibco公司,美国),胎牛血清(PAA公司,奥地利),青霉素(石家庄华北制药集团有限公司),链霉素(大连美罗制药厂),抗波形丝蛋白、角蛋白抗体(武汉博士德生物工程有限公司),SP试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),bFGF(Cytolab公司,英国),二乙基焦磷酸酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)(Sigma公司,美国),TRIZOL试剂(Invitrogen公司,美国),一步法RT-PCR试剂盒、PCR Maker(Takara公司,日本)。

[收稿日期] 2008-12-28; [修回日期] 2009-02-26

[基金项目] 吉林省科技厅基金资助项目(200705342)

[作者简介] 陈莹(1981-),女,安徽人,硕士

[通讯作者] 林崇韬, Tel: 0431-88796039

## 1.2 牙周膜细胞的培养和鉴定

1.2.1 细胞培养 收集因正畸需要拔除的12~18岁患者前磨牙,刮取根中1/3的牙周膜组织,采用胶原酶消化组织块法行牙周膜细胞原代培养。待细胞和组织块贴壁后常规培养。每3 d换1次培养液。待细胞生长至90%融合时,0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 细胞鉴定 采用免疫组化SP法进行波形丝蛋白、角蛋白染色,波形丝蛋白阳性、角蛋白阴性为牙周膜细胞。阴性对照组用PBS代替一抗。

## 1.3 有限稀释法制备人牙周膜细胞克隆

取PDLC原代细胞,用0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞密度为每毫升5个的细胞悬液,接种于96孔板中,每孔加液0.1 mL,放入培养箱中进行培养。次日,在倒置显微镜下观察培养板中各孔细胞数,挑选只含1个细胞的孔,标记后补加0.1 mL培养液,继续培养。待克隆长至孔底面积的1/3~1/2时,用消化法分离克隆细胞,转入24孔培养板扩大培养。

## 1.4 外源性碱性成纤维细胞生长因子刺激牙周膜细胞

克隆PDLC以每孔 $1.0 \times 10^5$ 个转入24孔板,标准环境下以含有10%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的DMEM培养液孵育24 h,弃去原培养液。将克隆细胞分为实验组和空白对照组,实验组分别加入含有1 mL 0.1、1、10 ng/mL bFGF的10%FCS的DMEM培养液。每浓度3孔;空白对照组加入不含bFGF的10%FCS的DMEM培养液,标准环境下培养4 d。

## 1.5 检测细胞内表皮生长因子受体mRNA的变化

1.5.1 引物设计 用Primer Premier 5.0软件分别设计EGFR和内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物,送至上海生工公司合成引物。EGFR引物序列为5'-ACCTGCGTGAAGAAGTGTTC-3', 5'-CACATCTCCATCACTTATCTCC-3'; GAPDH引物序列为5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT-3', 5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'。

1.5.2 细胞内总RNA的提取及纯度测定 按照TRIZOL试剂说明书分别提取各组PDLC内的总RNA。取4  $\mu$ L RNA样品加蒸馏水到1 mL,用1 mL蒸馏水作为空白对照,分光光度计上测定260、280、230 nm处的光密度值,计算 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 和 $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ 的比值,来表示RNA的纯度。取10  $\mu$ L RNA样品(约2  $\mu$ g RNA)进行甲醛琼脂糖凝胶电泳,检测28 S/18 S带的情况,来检测RNA的完整性。

1.5.3 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 按照RT-PCR试剂盒说明书进行逆转录及cDNA的扩增。EGFR和

GAPDH的PCR扩增程序为:50  $^{\circ}\text{C}$  30 min逆转录反应,94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,以后94  $^{\circ}\text{C}$  30 s、55  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,共30个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  8 min延伸终止反应,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.4 PCR产物的检测 PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后取出凝胶,进行光密度值扫描,得到各扩增带光密度值和面积值。

1.5.5 数据整理和统计分析 GAPDH为体内恒定表达的基因,以其作为EGFR基因表达程度的参照标准,在测量完各扩增带数值后,计算EGFR(光密度值 $\times$ 面积值)/GAPDH(光密度值 $\times$ 面积值),比较各组间的差异,半定量确定EGFR mRNA的表达。

## 2 结果

### 2.1 细胞来源的鉴定

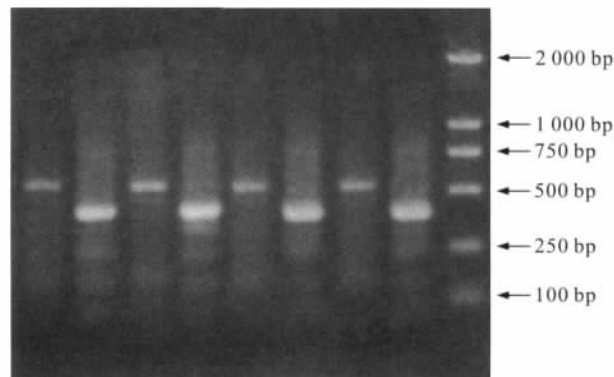
培养细胞呈梭形,核较大,呈圆形或椭圆形,位于细胞中央,免疫组化SP法结果显示,波形蛋白阳性,角蛋白阴性,证明所培养细胞为牙周膜细胞。

### 2.2 牙周膜细胞的克隆

共观察到PDLC克隆细胞117个,其中44个克隆细胞具有增殖能力,占37.6%(44/117),可用于实验。

### 2.3 RT-PCR反应结果

采用一步法提取各组PDLC中EGFR mRNA,其 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 值为1.823,  $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ 值为1.741,均在正常范围内,表明所提取RNA基本无蛋白质污染,无残存的盐分。甲醛琼脂糖凝胶电泳结果表明RNA无明显降解。RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果有2条带,分别位于Marker的500 bp及500 bp与250 bp之间,与预期EGFR为516 bp及GAPDH为393 bp结果一致(图1)。



从右到左依次为Marker、0.1 ng/mL的EGFR和GAPDH、1 ng/mL的EGFR和GAPDH、10 ng/mL的EGFR和GAPDH、空白对照组EGFR和GAPDH

图1 实验组和对照组EGFR和GAPDH扩增后的电泳结果

Fig 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of RT-PCR products for EGFR and GAPDH

图像经过GIS凝胶分析系统分析,测得EGFR和GAPDH的光密度值和面积值,代入公式进行计算,0.1 ng/mL组、1 ng/mL组、10 ng/mL组、空白对照组的比值分别为0.30、0.47、0.58、0.27。bFGF促进人PDLC内EGFR mRNA的合成,并且随着浓度的增加促进作用增强。

### 3 讨论

牙周膜细胞的表型分化对于牙周组织在2种硬组织之间维持自身稳定性起重要作用。在牙周组织再生过程中,牙周膜细胞的表型分化决定了治疗的预后和转归。目前认为牙周膜细胞为一群异质性细胞,包括成纤维细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞及这些细胞的前体细胞<sup>[3]</sup>。Lin等<sup>[2]</sup>在分析PDLC群的异质性时认为PDLC群细胞可分为2大类,一类是具有成骨表型的细胞,以碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)等为标记;一类是具有成纤维表型的细胞,以表达EGFR、

胶原等为特征。牙周膜能在牙槽骨和牙骨质这2种矿化组织间始终保持一定的宽度而不矿化,提示一定存在某种机制使成纤维表型和成骨表型达到了动态平衡。

EGFR在生长发育和正常组织的代谢和创伤愈合过程中起重要作用,而在多种类型肿瘤中存在过度表达和变异等异常活化,属于受体酪氨酸激酶家族成员(receptor tyrosine kinases, RTKs)<sup>[4]</sup>。有研究显示,无论是组织切片或体外细胞培养检测,EGFR在成熟的PDLC中无表达或仅为低浓度表达,而在牙周组织中某些前体细胞和牙周再生组织中表达明显提高<sup>[5]</sup>,这可能是由于EGFR对于细胞分化具有负性调节作用。Matsuda等<sup>[6]</sup>发现在矿化液的促进下成骨标志ALP的表达增加,而EGFR的表达下降。李纾等<sup>[7]</sup>也认为EGFR在PDLC的矿化过程中起着负调控作用,与牙周膜自身结构的稳定性有关。体内放射自显影技术分析,前成骨细胞和前成软骨细胞表达大量的EGFR,随着分化其表达急剧降低,分化成熟的成骨细胞和软骨细胞则没有EGFR的表达<sup>[8]</sup>。经表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)或转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\alpha$ 作用的牙周膜细胞不仅可以增加EGFR mRNA的表达,同时降低自主性的和地塞米松诱导的ALP活性,EGF和TGF- $\alpha$ 可以特异性地结合EGFR并刺激EGFR的合成<sup>[9]</sup>。所有这些都提示上调EGFR的表达可以抑制PDLC成骨方向的分化,EGFR有维持PDLC成纤维表型的功能,EGFR的变化反映了PDLC成纤维表型的变化。

bFGF作为一种有丝分裂促进因子具有多种生物学功能。有研究认为bFGF可能通过诱导未成熟牙周膜细胞的生长及抑制牙周膜细胞分化为矿化组织形成细胞来促进牙周再生<sup>[10]</sup>。体外实验显示,bFGF可以增强PDLC的增殖反应,且存在剂量依赖性,其最大的促有丝分裂作用质量浓度为10 ng/mL。此外,bFGF可以抑制ALP活性以及矿化小结形成,bFGF对于层粘连蛋白有显著的正向调解作用,而对于型胶原合成存在负向调节<sup>[11]</sup>。bFGF还抑制牙周膜相关蛋白(periodontal-ligament-associated protein-1, PLAP-1)的表达,而PLAP-1在PDLC的矿化过程中起正向调节作用<sup>[12]</sup>。以上均显示bFGF抑制PDLC向矿化组织形成细胞分化,其通过诱导未成熟PDLC的生长在创伤的愈合和加速牙周组织再生过程中起重要作用。

本研究表明,bFGF可促进体外培养的PDLC中EGFR的表达,并且成质量浓度依赖性。在不加入外源性bFGF的阴性对照组中,EGFR的表达较低,随着外源性bFGF的质量浓度增高,EGFR的表达明显增加。大量研究表明,PDLC虽然具有强的胶原合成活性,并且具有完全分化的成纤维细胞的形态特征,但在体外经适当条件的诱导,PDLC可以表达高的碱性磷酸酶活性,并形成矿化结节,分化成成骨细胞样细胞<sup>[13]</sup>。而从EGFR的表达角度看,PDLC仍具有某些未分化细胞的特性,EGFR通过负向调控PDLC向矿化组织形成细胞方向分化,bFGF促进EGFR的表达说明bFGF维持PDLC成纤维表型的稳定,抑制其向成骨细胞分化,从而维持牙周膜结构的稳定。bFGF可能通过促进血管再生和诱导未成熟牙周膜细胞的生长及抑制牙周膜细胞转化为矿化组织形成细胞来促进牙周再生<sup>[10]</sup>,bFGF对EGFR的促进作用是否是这个过程的调节因素还不清楚,也许这种促进作用能抑制牙周膜细胞转化为矿化组织形成细胞。

总之,牙周组织再生是一个十分复杂的过程,而牙周膜细胞在牙周组织再生中的具体作用还不甚清楚。对各种生长因子在牙周组织再生过程中的作用机制和生长因子的综合作用的研究还需要一个漫长的过程。本研究通过研究bFGF对牙周膜细胞中EGFR基因表达的影响来探讨bFGF在牙周膜细胞分化中的作用,为牙周组织再生提供一定的理论基础。

### [参考文献]

- [1] 涂小丽. 生长因子与牙周组织工程[J]. 国外医学生物医学工程分册. 2002, 25(2): 70-72.



- TU Xiao-li. Growth factors and periodontal tissue engineering[J]. Foreign Medical Sciences Biomedical Engineering, 2002, 25(2): 70-72.
- [2] Lin DG, Kenny DJ, Barrett EJ, et al. Storage conditions of avulsed teeth affect the phenotype of cultured human periodontal ligament cells[J]. J Periodontal Res, 2000, 35(1): 42-50.
- [3] 峰煜, 周彬. 牙周韧带细胞的表型分化及其表面标记物[J]. 国外医学口腔医学分册, 2003, 30(4): 280-282.
- FENG Yu, ZHOU Bin. Phenotype differentiation and surface marker of periodontal ligament cell [J]. Foreign Medical Sciences (Stomatology), 2003, 30(4): 280-282.
- [4] Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family[J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12(Suppl 1): S17-S27.
- [5] Parkar MH, Kuru L, Giouzei M, et al. Expression of growth factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells[J]. Arch Oral Biol, 2001, 46(3): 275-284.
- [6] Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, et al. Evidence for up-regulation of epidermal growth-factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cells associated with stabilization of phenotype *in vitro*[J]. Arch Oral Biol, 1993, 38(7): 559-569.
- [7] 李纾, 杨丕山, 曹金芳, 等. 表皮生长因子受体在人牙周膜成纤维细胞体外矿化中的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2006, 24(1): 11-14.
- LI Shu, YANG Pi-shan, CAO Jin-fang, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human periodontal ligament cells during their mineralization *in vitro*[J]. West China J Stomatol, 2006, 24(1): 11-14.
- [8] Cho MI, Garant PR, Lee YL. Periodontal ligament fibroblasts, preosteoblasts, and prechondrocytes express receptors for epidermal growth factor *in vivo*: A comparative radioautographic study [J]. J Periodontal Res, 1988, 23(5): 287-294.
- [9] Antosz ME, Bellows CG, Aubin JE. Effects of transforming growth factor beta and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells [J]. J Cell Physiol, 1989, 140(2): 386-395.
- [10] Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor[J]. J Periodontal Res, 1999, 34(7): 425-430.
- [11] Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells[J]. J Periodontal Res, 1997, 32(8): 667-675.
- [12] Yamada S, Ozawa Y, Tomoeda M, et al. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells[J]. J Dent Res, 2006, 85(5): 447-451.
- [13] Bar-Kana I, Savion N, Narayanan AS, et al. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium[J]. Eur J Oral Sci, 1998, 106(Suppl 1): 357-364.

(本文编辑 王晴)

(上接第339页)

- 20(1): 9-12.
- [7] 钦征骑. 新型陶瓷材料手册[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1995: 106.
- QIN Zheng-qi. New ceramic material handbook [M]. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 1995: 106.
- [8] 高如琴, 王健东. MgO对Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的影响[J]. 现代技术陶瓷, 2000, 85(3): 23-26.
- GAO Ru-qin, WANG Jian-dong. Effect of MgO on properties of alumina ceramics[J]. Advanced Ceramics, 2000, 85(3): 23-26.
- [9] 郭瑞松, 郭多力, 齐海涛, 等. 添加稀土氧化物对氧化铝复相陶瓷性能的影响[J]. 硅酸盐学报, 2002, 30(1): 112-116.
- GUO Rui-song, GUO Duo-li, QI Hai-tao, et al. Effects of adding rare earth oxides on properties of zirconia-toughened alumina ceramic[J]. J Chinese Ceramic Society, 2002, 30(1): 112-116.
- [10] 赵克, 巢永烈, 杨世源. 牙科纳米氧化铝陶瓷的烧结研究[J]. 口腔医学纵横, 2001, 17(4): 253-255.
- ZHAO Ke, CHAO Yong-lie, YANG Shi-yuan. Sintering research on nano dental alumina ceramics[J]. J Comprehensive Stomatol, 2001, 17(4): 253-255.
- [11] 吴镇江, 臧丽坤, 陈运法, 等. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>凝胶注模成型及添加TiO<sub>2</sub>烧结助剂的影响[J]. 过程工程学报, 2001, 1(4): 398-401.
- WU Zhen-jiang, ZANG Li-kun, CHEN Yun-fa, et al. Gelcasting of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> with TiO<sub>2</sub> added: The effects of sintering aid and dispersant[J]. Chinese J Process Engineering, 2001, 1(4): 398-401.
- [12] 刘大成. 氧化铝陶瓷及其烧结[J]. 中国陶瓷, 1998, 34(5): 13-15.
- LIU Da-cheng. Alumina ceramics and sintering[J]. China Ceramics, 1998, 34(5): 13-15.
- [13] 李国华, 陈树江, 窦叔菊, 等. 纳米级TiO<sub>2</sub>添加剂对Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>微观结构与烧结性能的影响[J]. 鞍山科技大学学报, 2006, 29(1): 12-15.
- LI Guo-hua, CHEN Shu-jiang, DOU Shu-ju, et al. Effect of nanosized TiO<sub>2</sub> as additive on microstructure and sintering characteristic of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramic[J]. J Anshan University Science Technology, 2006, 29(1): 12-15.
- [14] Xue LA. Effect of liquid-forming additives on low-temperature superplastic deformation of alumina[J]. J Mater Sci Letters, 1992, 11(21): 1395-1397.
- [15] Zeng YP, Jiang DL, Greil P. Tape casting of aqueous Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> slurries[J]. J Eur Ceram Soc, 2000, 20(11): 1691-1697.

(本文编辑 汤亚玲)