

[文章编号] 1000-1182(2009)01-0020-04

人牙周韧带细胞和牙髓细胞表型特征的比较

吴莉萍¹ 韦曦² 凌均桢² 刘路²

(1.中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院 正畸科; 2.牙体牙髓科, 广东 广州 510055)

[摘要] 目的 研究人牙周韧带细胞(PDLCs)和牙髓细胞(DPCs)表型特征以及体外传代对其表型特征的影响, 为选择适宜的表面标记分选生物性状同源性的细胞亚群提供依据。方法 采用酶消化法体外培养PDLCs和DPCs, 免疫组化检测和流式细胞仪分析细胞表面标记的表达。结果 PDLCs和DPCs的STRO-1和CD146免疫组化染色阳性。流式细胞仪分析显示: 获得的第1代PDLCs和DPCs表达间充质干细胞表面标记STRO-1、CD146、CD29、CD44和CD106, 基本不表达CD34。PDLCs的STRO-1、CD29和CD44阳性表达百分比与DPCs间的差异无统计学意义($P>0.05$), PDLCs的CD106阳性表达百分比高于DPCs, CD146阳性表达百分比低于DPCs, 且差异有统计学意义($P<0.001$)。PDLCs和DPCs表达STRO-1和CD146的阳性表达百分比随传代而逐渐减低。结论 PDLCs表面抗原表达与DPCs相似, 而且其中成体干细胞的成分随传代逐渐减少。

[关键词] 牙周韧带细胞; 牙髓细胞; 干细胞; 表面抗原

[中图分类号] Q254 **[文献标识码]** A

The surface antigen expression of periodontal ligament cells and dental pulp cells *in vitro* WU Li-ping¹, WEI Xi², LING Jun-qi², LIU Lu². (1. Dept. of Orthodontics, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China; 2. Dept. of Endodontics, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of surface antigen of human periodontal ligament cells (PDLCs) and dental pulp cells (DPCs) and the impact of *ex vivo* expansion to the expression of surface antigen. To provide basis of proper surface antigen for further selection of homogenous stem cell subpopulation from PDLCs and DPCs. **Methods** PDLCs and DPCs were isolated and cultured by collagenase type I and dispase. The expression of surface antigen was analyzed by immunohistochemistry and flow cytometry. **Results** Positive expression of STRO-1 and CD146 were observed in PDLCs and DPCs by immunocytochemistry. Similar to DPCs, PDLCs expressed mesenchymal stem cell markers STRO-1, CD146, CD29, CD44 and CD106, and displayed negative expression for CD34 at passage 1 by flow cytometry. There were no significant difference of STRO-1, CD29 and CD44 expression level between PDLCs and DPCs ($P>0.05$). PDLCs expressed significantly higher level of CD106 and significantly lower level of CD146 than DPCs ($P<0.001$). The proportion of STRO-1 and CD146 positive cells decreased steadily with passages in PDLCs and DPCs. **Conclusion** PDLCs have some similar surface antigen as DPCs, and the stem cells properties of PDLCs and DPCs decreased steadily with passages.

[Key words] periodontal ligament cells; dental pulp cells; stem cell; surface antigen

人牙周韧带细胞(periodontal ligament cells, PDLCs)和牙髓细胞(dental pulp cells, DPCs)是来源于间质组织的异质性细胞群, 包括处于不同分化方向和分化阶段的细胞^[1]。PDLCs和DPCs中有成体干细胞, 与骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)表型相似, 表达STRO-1和CD146, 植入免

疫缺陷鼠体内形成牙骨质/牙周膜样结构和牙髓/牙本质样复合体^[2-3], 预示PDLCs和DPCs在牙周组织工程的应用前景。本研究分离培养同一组个体来源的PDLCs和DPCs, 比较其表型特征及传代培养对表型特征的影响, 为选择合适的表面抗原和自PDLCs和DPCs中分选生物性状同源性的细胞亚群提供依据。

[收稿日期] 2008-01-21; [修回日期] 2008-06-06

[基金项目] 广东省科技计划基金资助项目(2008B0301075)

[作者简介] 吴莉萍(1968-), 女, 宁夏人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 凌均桢, Tel: 020-83862621

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

α -MEM、0.02% 乙二胺四乙酸(ethylenediamine

tetraacetic acid, EDTA)(Gibco公司, 美国), 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL链霉素(华北制药股份有限公司), 胶原酶 型(Worthington Biochem公司, 美国), DAB 显色试剂盒、SABC免疫组化染色(武汉博士德生物工程有限公司), 抗STRO-1多克隆抗体(R&D Systems公司, 美国), 抗CD146多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc., 美国), 抗CD29、CD44、CD106、CD34多克隆抗体(BD Bioscience公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 选取中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院正畸科就诊的11~18岁青少年因正畸需要拔除的健康前磨牙18颗, 分为3组, 刮取牙根中1/3部位的牙周膜组织和髓腔内牙髓组织, 3 mg/mL 胶原酶 型和4 mg/mL Dispase溶液37 $^{\circ}$ C分别消化20~30 min, 经70 μ m筛网过滤, PBS洗涤3次, 洗净胶原酶, 用含20%胎牛血清的 α -MEM培养液重悬细胞, 置入25 cm培养瓶中培养, 3~4 d换液1次, 镜下观察培养瓶中细胞, 约14 d左右细胞长满瓶底, 0.25%胰酶和0.02%EDTA消化, 1:3传代培养。

1.2.2 免疫组化检测PDLCs和DPCs表面抗原的表达 取相同个体来源的第1代PDLCs和DPCs, 以每毫升 2×10^4 个细胞接种于22 mm \times 22 mm的爬片, 24 h后用4%多聚甲醛固定15 min, 免疫组化ABC和DAB显色法进行抗STRO-1和CD146抗体染色, STRO-1浓度为0.01 μ g/ μ L, CD146浓度为0.002 μ g/ μ L。未

加抗体的PDLCs和DPCs作为阴性对照。

1.2.3 流式细胞仪检测PDLCs和DPCs表面抗原的表达 取相同个体来源的第1代PDLCs和DPCs, 消化离心后用PBS制成单细胞悬液, 与0.5 μ g/100 μ L IgM抗体STRO-1和IgG抗体CD146、CD29、CD44、CD106、CD34于4 $^{\circ}$ C孵育30 min, PBS清洗后, 与1 μ g/100 μ L异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)或藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的二抗4 $^{\circ}$ C孵育30 min, 样本单独与二抗孵育作为同种匹配阴性对照, 行表面抗原检测。将第1代PDLCs和DPCs传至3、5、7、9代时, 检测STRO-1和CD146的表达。重复选取3组不同个体来源样本进行检测。

1.3 统计学分析

采用SPSS 12.0软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 t 检验比较PDLCs和DPCs之间表面抗原表达上的差异。采用随机区组实验的方差分析比较不同个体来源和不同代PDLCs和DPCs的同一表面抗原表达差异, 若有统计学意义, 采用LSD- t 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测结果

PDLCs和DPCs表面抗原的免疫组化检测结果见图1、2。部分PDLCs和DPCs表面抗原STRO-1、CD146染色阳性。



图1 PDLCs阴性对照(左)、STRO-1(中)、CD146(右)的免疫组化检测结果 SABC $\times 400$

Fig 1 The expression of control(left), STRO-1(middle), CD146(right) were observed in PDLCs by immunocytochemistry SABC $\times 400$

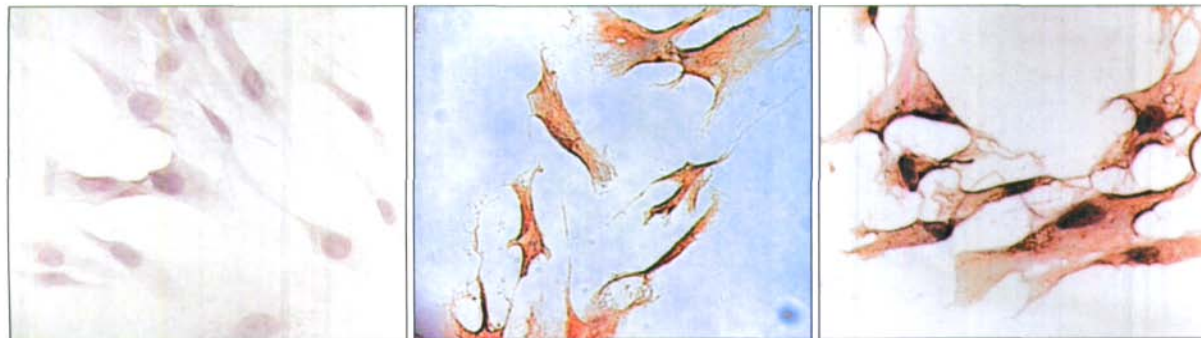


图2 DPCs阴性对照(左)、STRO-1(中)、CD146(右)的免疫组化检测结果 SABC $\times 400$

Fig 2 The expression of control(left), STRO-1(middle), CD146(right) were observed in DPCs by immunocytochemistry SABC $\times 400$

2.2 流式细胞仪检测结果

不同个体来源的细胞样本之间，各表面标记阳性表达百分比的差异无统计学意义($P>0.05$)。第1代PDLCs的STRO-1、CD29和CD44阳性表达百分比与DPCs间的差异无统计学意义($P>0.05$)，PDLCs的CD106阳性表达百分比高于DPCs，CD146阳性表达百分比低于DPCs($P<0.001$)(表1)。

表 1 第1代PDLCs和DPCs的表面抗原阳性表达百分比(% , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Surface antigen expression of PDLCs and DPCs at passage 1(% , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

表面抗原	PDLCs	DPCs	P值
STRO-1	16.4±1.2	22.4±8.4	0.189
CD146	55.3±4.5	95.3±3.9	0.000
CD29	98.1±1.0	96.8±1.0	0.161
CD44	94.9±1.7	92.1±1.9	0.261
CD106	77.8±3.9	2.7±1.9	0.000
CD34	1.5±0.3	2.6±1.7	0.272

连续培养后PDLCs和DPCs的STRO-1和CD146阳性表达百分比随传代逐渐下降，同代PDLCs和DPCs间STRO-1的表达差异无统计学意义，CD146的表达差异有统计学意义($P<0.001$)(表2、3)。

表 2 PDLCs和DPCs的STRO-1阳性表达百分比(% , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Expression of STRO-1 in PDLCs and DPCs(% , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

代数	STRO-1阳性表达百分比		P值
	PDLCs	DPCs	
P1	16.4±1.2	22.4±8.4	0.189
P3	11.6±1.1	16.5±4.2	0.151
P5	11.0±0.6	13.7±4.9	0.396
P7	6.4±0.7	10.2±4.4	0.217
P9	4.8±0.2	6.0±2.9	0.513

表 3 PDLCs和DPCs的CD146阳性表达百分比(% , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Expression of CD146 in PDLCs and DPCs(% , $n=3$, $\bar{x}\pm s$)

代数	CD146阳性表达百分比		P值
	PDLCs	DPCs	
P1	55.3±4.5	95.3±3.9	0.000
P3	47.9±2.5	95.3±3.7	0.000
P5	45.1±0.5	93.8±3.2	0.000
P7	44.2±2.1	92.2±3.3	0.000
P9	43.9±7.4	89.9±4.2	0.000

LSD- t 检验结果显示PDLCs的STRO-1表达除第3和5代及第7和9代之间无显著性差异外($P>0.05$)，其余各代细胞之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)；CD146的表达除第9代和各代之间差异有统计学意义外($P<0.05$)，其余各代细胞之间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

成体PDLCs和DPCs中存在高度增殖和多向分化潜能的干细胞。目前，牙源性成体干细胞的鉴定和分选多采用BMSCs的表面标记，BMSCs的表面标记抗原具有非特异性，表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面抗原STRO-1、CD146、CD29、CD44和CD106等。其中STRO-1是BMSCs和幼红细胞前体细胞表达的细胞表面蛋白，对于STRO-1阳性的细胞，其成纤维细胞克隆形成单位(the frequency of colony forming units-fibroblasts, CFU-F)显著增加，能够分化形成多向间质细胞系^[4]。因此，STRO-1被认为是间充质干细胞标记，被广泛应用于BMSCs的纯化和鉴定。研究表明，STRO-1阳性细胞群落表现出高度的增殖活力以及多向分化的潜能，显示出较均一的生物性状^[2,5]。Yang等^[6-7]证实STRO-1阳性的牙髓细胞群具有更确定的多系分化潜能，STRO-1阳性和未分选的牙髓细胞能够分化形成成牙本质细胞，STRO-1阴性的牙髓细胞群显示成纤维样细胞表型，不能分化形成成牙本质细胞。CD146是一种细胞膜糖蛋白和内皮细胞黏附分子，主要表达于正常的间质组织，包括平滑肌细胞、内皮细胞、肌纤维母细胞和雪旺细胞，造血细胞不表达，其功能主要是通过跨膜信号参与各种细胞过程，包括黏附、细胞骨架重组、形态改变、迁移与增殖^[8]。CD29、CD44和CD106分别是整合素家族标记、透明质酸酶/纤维结合蛋白受体和血管细胞黏附分子-1，参与造血细胞与骨髓基质细胞的黏附、增殖和迁移，被作为基质细胞和间质细胞相对特异性的表面标志^[8]。CD34一直被认为是造血系的始祖细胞或干细胞的表面抗原标记，BMSCs不表达CD34。本研究分离培养的第1代PDLCs与DPCs相似，表达STRO-1、CD146、CD29、CD44和CD106，基本不表达CD34，具有与BMSCs相似的表型特征^[9]。研究证实分离培养的PDLCs和DPCs中均存在一定数量早期未定向分化的干细胞。同时，STRO-1/CD106/CD146均为血管周细胞表面抗原，提示PDLCs和DPCs中的干细胞定位于所在微环境的血管周围^[5,10]。

最近，有学者利用STRO-1/CD106/CD146筛选来源于牙周膜和牙髓中的间充质干细胞，发现

STRO-1阳性或CD106阳性的PDLCs和DPCs均具有高度增殖能力,低密度接种形成细胞克隆,表达CD44、CD166、核心结合因子 α 1、型胶原、骨涎蛋白和肌腱特有的转录因子Scleraxis等,植入免疫缺陷鼠体内分别形成牙骨质/牙周膜样结构和牙髓/牙本质复合体^[2,10]。CD146阳性的DPCs不表达成牙本质特有的牙本质涎蛋白,属于未成熟的前成牙本质细胞群,植入免疫缺陷鼠体内形成牙本质^[5]。STRO-1/CD106/CD146均可作为有效分选干细胞的标记,但哪个表面标记更具应用优势仍不清楚。本研究发现PDLCs的STRO-1阳性表达百分比高于Nagatomo等^[1]报道的结果(1.2%),较DPCs的STRO-1阳性表达低,但差异无统计学意义,表明PDLCs和DPCs中STRO-1阳性细胞数量相近。PDLCs中CD106阳性表达百分比与Kern等^[11]报道的BMSCs中CD106阳性细胞结果相近。PDLCs中CD106阳性表达百分比高于DPCs,CD146阳性表达百分比低于DPCs,差异有统计学意义。这提示应用CD106或CD146对PDLCs或DPCs进行分选时具有不同优势,而CD106和CD146在PDLCs和DPCs的不同表达是否对于细胞功能具有重要作用尚需进一步研究。

STRO-1在未成熟细胞上有高水平的表达,当长期培养后大量其他分化抗原或细胞功能性标志物出现时,它们的水平明显下降^[12]。将STRO-1和CD146同时用于筛选BMSCs,发现STRO-1/CD146阳性的BMSCs的CFU-F增加 2×10^3 倍,没有检测到成骨标记核心结合因子 α 1和骨钙素(osteocalcin, OCN),经体外扩增后表达核心结合因子 α 1和OCN,提示STRO-1/CD146可以作为BMSCs分化早期的标记^[5]。Banfi等^[13]认为随着BMSCs大量扩增,会发生复制性老化。这种老化现象是由于BMSCs在体外扩增时缺失端粒酶活性或者是端粒酶活性减少,端粒酶在细胞分裂期间对维持端粒长度和染色体稳定发挥重要作用,加强端粒酶活性可以明显增强BMSCs的增殖生命期和成骨潜能^[14]。STRO-1阳性/碱性磷酸酶阴性的PDLCs经过21 d培养后,克隆形成有效率自60%下降至30%^[1]。提示STRO-1是干细胞分化早期的标记物。本研究对STRO-1和CD146阳性表达百分比进行多代追踪,发现3组不同来源PDLCs与DPCs的STRO-1或者CD146阳性细胞均随传代而逐渐减少,其中STRO-1阳性细胞减少较明显,推测PDLCs和DPCs在体外随着培养时间的延长,其中的干细胞可能发生自分化和老化,STRO-1和CD146表达下降。

本研究证实PDLCs和DPCs中存在一定数量的成体干细胞,干细胞成分随体外传代而减少。提示在

利用STRO-1/CD146等表面标记分选生物性状同源性的细胞亚群时应选择扩增培养早期代数的PDLCs和DPCs,以便获得理想的种子细胞数目。

[参考文献]

- [1] Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells[J]. J Periodontal Res, 2006, 41(4) 303-310.
- [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] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells(DPSCs) *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25) :13625-13630.
- [4] Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1[J]. Blood, 1991, 78(1) 55-62.
- [5] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(4) :696-704.
- [6] Yang X, Zhang W, van den Dolder J, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells *in vitro*[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1(2) :128-135.
- [7] Yang X, van den Dolder J, Walboomers XF, et al. The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells *in vitro*[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1(1) :66-73.
- [8] Peister A, Mellad JA, Larson BL, et al. Adult stem cells from bone marrow(MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential[J]. Blood, 2004, 103(5) :1662-1668.
- [9] Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, et al. Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells(hDPSCs) and human mesenchymal stem cells(hMSCs) for tissue engineering cell therapy[J]. Biomaterials, 2006, 27(20) :3766-3781.
- [10] Gronthos S, Mrozik K, Shi S, et al. Ovine periodontal ligament stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential[J]. Calcif Tissue Int, 2006, 79(5) :310-317.
- [11] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue[J]. Stem Cells, 2006, 24(5) :1294-1301.
- [12] Stewart K, Walsh S, Screen J, et al. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(8) :1345-1356.
- [13] Banfi A, Bianchi G, Notaro R, et al. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells[J]. Tissue Eng, 2002, 8(6) :901-910.
- [14] Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(6) :592-596.

(本文编辑 王晴)