

[文章编号] 1000-1182(2007)04-0331-04

牙髓干细胞向神经细胞方向的诱导分化实验

贺慧霞^{1,2}, 金 岩¹, 史俊南³, 罗玉庆⁴, 周艳妮², 彭 智², 许玉和²

(1.第四军医大学口腔医院病理科 组织工程中心, 陕西 西安 710032; 2.武警甘肃总队医院 口腔科, 甘肃 兰州 730050;
3.第四军医大学口腔医院 牙体牙髓科, 陕西 西安 710032; 4.兰州军区临潼疗养院三区 门诊部, 陕西 西安 710600)

[摘要] 目的 探讨克隆化培养分离的人牙髓干细胞是否具有向神经细胞方向分化的潜能, 并确定其诱导条件。方法 克隆化培养的人牙髓干细胞预诱导24 h, 然后换含一定浓度二甲基亚砜(DMSO)、丁羟基茴香醚(BHA)、forskolin、 β -巯基乙醇(β -ME)和氢化可的松(hydrocortisone)的联合诱导液连续诱导4 d, 对诱导细胞进行形态学观察, 神经胶质酸性蛋白(GFAP)、非特异性酯酶(NSE)免疫组化染色和GFAP mRNA RT-PCR检测。同时, 以未诱导细胞为对照。结果 诱导12 h时细胞形态开始改变, 24 h时分化为较为典型的神经细胞样细胞, 继续诱导分化细胞数量增多; 诱导细胞表达神经元细胞特异性标志NSE和GFAP蛋白; RT-PCR检测诱导细胞表达GFAP mRNA, 而未诱导细胞均无上述改变和表达。结论 人牙髓干细胞在一定的诱导条件下可横向分化为神经元样细胞。

[关键词] 牙髓干细胞; 诱导; 分化

[中图分类号] R781.1 [文献标识码] A

Experiment on inducing human dental pulp stem cells into neural-like cells HE Hui-xia^{1,2}, JIN Yan¹, SHI Jun-nan³, LUO Yu-qing⁴, ZHOU Yan-ni², PENG Zhi², XU Yu-he². (1. Research and Development Center for Tissue Engineering, Dept. of Oral Histology and Pathology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Dept. of Stomatology, Gansu Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force, Lanzhou 730050, China; 3. Dept. of Conservative Dentistry, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 4. Outpatient Department, The Third Region of Lintong Convalescent Hospital, Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Xi'an 710600, China)

[Abstract] Objective To explore the multi-differentiated capability of human dental pulp stem cells(hDPSCs) obtained by cell-clone culture approach and to determine the appropriate induced medium. Methods The cloned isolation and expansion of hDPSCs were preinduced for 24 h, and were subsequently replaced with neural-inductive medium containing certain concentration of dimethylsulfoxide(DMSO), butylated hydroxyanisole(BHA), forskolin, β -mercaptoethanol(β -ME) and hydrocortisone for 4 days. Then induced cells were analyzed by morphological observation, immunocytochemical staining for non-specific esterase(NSE) and glial fibrillary acidic protein(GFAP) expression, RT-PCR for GFAP mRNA. Meanwhile, the uninduced hDPSCs were used as negative control. Results The morphology of induced cells changed at the initial 12 h, and displayed a typical neuron-like cells at 24 h. There was a gradual increase in the number of these neuronal differentiated cells with continuous induction. Furthermore, immunocytochemical staining showed that the induced cell expressed NSE and GFAP, two marked enzymes of neuron cell. The GFAP mRNA was also detected in induced cells by RT-PCR assay. In contrast, the uninduced cells maintained its original appearance and had no expression on them. Conclusion hDPSCs may possess potential of multiple-differentiation and may differentiate into neuron-like cells on certain inductive condition.

[Key words] dental pulp stem cells; induction; differentiation

具有多向分化潜能是判断细胞为干细胞的重要

指标之一。牙髓干细胞除了能分化成为其来源组织的细胞——成牙本质细胞类型外, 还能否分化为其他组织类型的细胞? 本课题组^[1-2]采用克隆化培养方法, 从牙髓中初步分离了牙髓干细胞, 并从多方面分析了其结构、功能和表型特性。本实验在此基础上进一步探讨牙髓干细胞是否具有向神经细胞分化

[收稿日期] 2007-02-25; [修回日期] 2007-05-20

[基金项目] 甘肃省自然科学基金资助项目(3ZS061-A25-112); 国家“八六三”计划资助项目(2002AA205041)

[作者简介] 贺慧霞(1970-), 女, 甘肃人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 金 岩, Tel: 029-84776147

的潜能,为认识并鉴定牙髓干细胞提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM高糖型培养基、胎牛血清、Ⅰ型胶原酶、胰蛋白酶、dispase(Gibco公司,美国); β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol, β -ME)、forskolin、丁羟基茴香醚(butylated hydroxyanisole, BHA)、氢化可的松(hydrocortisone)(Sigma公司,美国);抗胶质纤维酸性蛋白单抗(glia fibrillary acid protein, GFAP)(Dako公司,美国);抗神经元特异性烯醇化酶单抗(neuron specific enolase, NSE)(Santa Cruz公司,美国);二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(西安化学试剂厂);碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF);TRIzol(Gibco BRL公司,美国);Access RT-PCR System Kit(Promega公司,美国);Superscript 反转录酶、Taq DNA聚合酶(Gibco公司,美国);GFAP、内参对照GAPDH引物(上海生物工程有限公司)。

CO₂孵箱(Heraeus公司,德国);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(Olympus公司,日本);PCR仪、台式低温高速离心机(Eppendorf公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养^[1] 收集新鲜拔除的健康人(19~29岁)阻生第三磨牙,无菌条件下劈开牙冠,取出牙髓,浓度为0.01 mol/L灭菌PBS冲洗后剪成约1 mm×1 mm×1 mm小块,体积分数为0.3%的Ⅰ型胶原酶和0.4%的dispase酶(1:1)37℃消化1 h,轻轻吹打离散单细胞团块,将形成的单细胞悬液通过孔径为70 μ m的细胞筛网,800 r/min离心5 min。将细胞沉淀用含体积分数为20%胎牛血清的高糖型DMEM培养液重悬,以浓度为每毫升1×10⁵个接种于5 mL培养瓶中培养,每3 d换液1次,并收集对数生长期的培养上清备用,细胞生长达80%汇合时,用质量浓度为2.5 g/L的胰酶消化传代。

1.2.2 克隆化培养分离牙髓干细胞^[1] 将上述收集的培养上清1 500 r/min离心10 min,经0.22 μ m直径的小滤器过滤后,与含体积分数为10%胎牛血清的高糖DMEM培养基以1:1混合作为克隆化培养的适应性培养基。取对数生长期的原代细胞,用适应性培养基倍比稀释,调整细胞浓度至每毫升10~15个,充分吹打混匀,接种于96孔板中,每孔100 μ L,培养12 h后标记单个细胞孔,每3 d换液1次,待长满孔底后胰酶消化,扩大培养。

1.2.3 牙髓干细胞向神经细胞方向诱导分化 配制

预诱导液:DMEM、体积分数为20%FBS、质量浓度为10 ng/mL bFGF;配制神经诱导体系:1 μ M氢化可的松、体积分数2% DMSO、浓度200 μ mol/L BHA、浓度10 μ mol/L forskolin、浓度0.1 mmol/L β -ME。

取对数生长期的牙髓干细胞,培养达70%~80%汇合时弃原培养液,加入预诱导液培养24 h后换诱导液继续培养4 d,每3~4 h观察细胞形态变化1次,根据细胞状态调整换培养液次数。以未诱导细胞为对照,同时制作细胞爬片。

1.2.4 免疫细胞化学染色 取细胞爬片,进行抗GFAP、抗NSE染色,以未诱导细胞为对照,操作步骤按ABC法试剂盒操作说明。

1.2.5 RT-PCR检测 观察诱导细胞80%左右呈现出神经元样细胞形态时(4 d)收集细胞,以浓度为0.01 mol/L PBS洗两遍,加入TRIzol,每管1 mL,按说明书操作步骤提取细胞总RNA。采用Primer 5.0软件设计GFAP引物,上游引物:5'-CTGTTGCCAGAGATGGAGGTT-3';下游引物为:5'-TCATCGCTCAGGAGGTCCTT-3'。预期产物为382 bp。常规方法反转录合成cDNA,PCR条件为:在200 μ L PCR反应专用管中依次加入10 \times PCR Buffer(含浓度为20 mmol/L MgSO₄)5 μ L, dNTPs(浓度为10 mmol/L)1 μ L, GFAP(上游)(浓度为100 pmol/ μ L)1 μ L, GFAP(下游)(浓度为100 pmol/ μ L)1 μ L, Taq DNA聚合酶0.5 μ L, cDNA模板1 μ L。加无菌去离子水至40.5 μ L置于Gradient PCR仪中。反应程序:94℃ 2 min, 94℃ 45 s, 56℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃ 延长7 min。

以GAPDH为内参对照,预期长度为900 bp,反应体系中除GAPDH上下游引物各1 μ L外,其余成分及反应条件同前。反应结束后,取样品行琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统观察,摄片。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

预诱导液调整细胞状况后,细胞生长旺盛,成簇样或漩涡状生长,4 d达80%汇合。加入诱导液后3 h,可见少量死细胞浮于培养液上,细胞形态无明显改变;12 h死亡细胞数量增加,少数细胞胞体开始变圆,突起变细变长,多为双极;24 h时,圆形长突起细胞数量明显增多,多数双极,单极或三极细胞量少,部分细胞圆形或不规则形,无突起(图1)。细胞换液继续诱导,死亡细胞数量减少,随培养时间延长,多数细胞变为极化细胞,细胞大小不等,有些细胞体积变大,呈卵圆形或三角形,两侧伸出细长突起,胞浆颗粒状,胞核位于胞体中央。

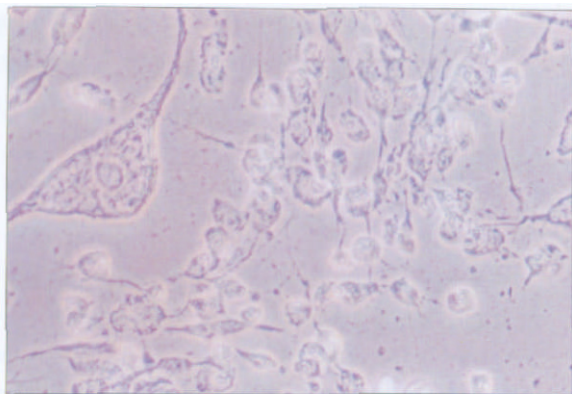


图1 神经诱导24 h后, 牙髓干细胞的形态 倒置相差显微镜 ×200

Fig 1 Morphology of dental pulp stem cells treated with neural-inductive medium for 24 hours inverted phase-contrast microscopy ×200

2.2 免疫细胞化学染色

诱导细胞抗GFAP、抗NSE染色均呈阳性(图2、3), 对照组这两种抗体染色均呈阴性。

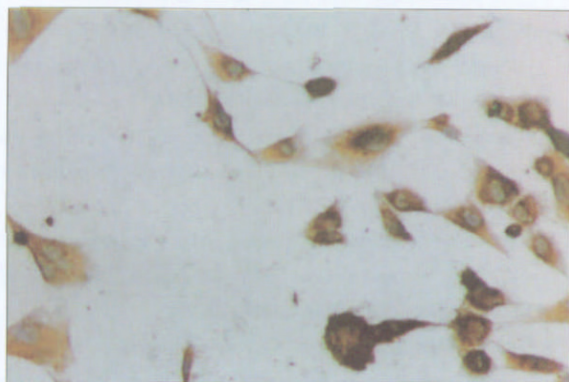


图2 神经诱导4 d后, 牙髓干细胞抗GFAP的阳性表达 ABC ×200

Fig 2 Positive expression with antibody to GFAP of dental pulp stem cells treated with neural-inductive medium for 4 days ABC ×200

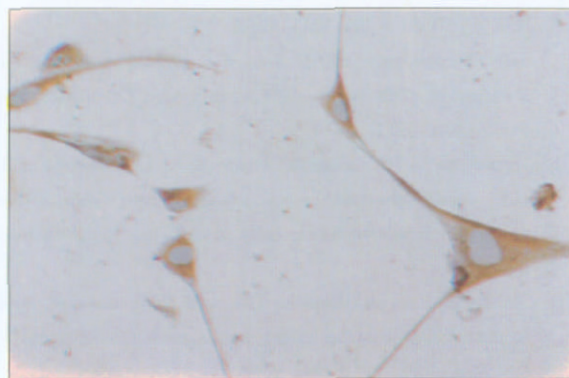


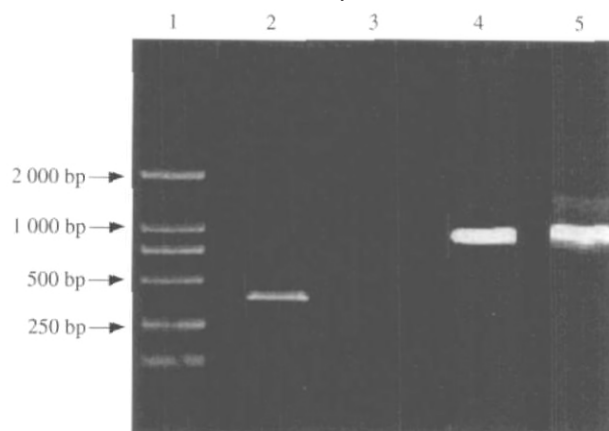
图3 神经诱导4 d后, 牙髓干细胞抗NSE的阳性表达 ABC ×200

Fig 3 Positive expression with antibody to NSE of dental pulp stem cells treated with neural-inductive medium for 4 days ABC ×200

2.3 RT-PCR检测

以未诱导细胞为对照, 诱导细胞的RT-PCR产

物经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见一条约380 bp大小的扩增产物条带, 与GFAP预期片段大小基本一致。内参对照GAPDH也可见900 bp的清晰条带(图4)。



1: Marker; 2: GFAP和诱导细胞; 3: GFAP和未诱导细胞; 4: GAPDH和诱导细胞; 5: GAPDH和未诱导细胞

图4 神经诱导4 d后, RT-PCR检测牙髓干细胞GFAP mRNA呈阳性表达

Fig 4 GFAP mRNA expression of dental pulp stem cells treated with neural-inductive medium for 4 days by RT-PCR

3 讨论

成体干细胞的横向分化潜能或称为可塑性是指其不仅能分化为来源组织的各种细胞类型, 而且具有分化为其他胚层来源的成熟细胞的潜能^[3]。自从1997年有关成体干细胞可塑性的一系列研究报道后, 可塑性研究引起生命科学领域的极大关注, 对干细胞的研究产生重要影响。而这其中研究最多、可塑性最强的是骨髓基质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs), 可以诱导分化为骨骼肌细胞、心肌细胞、内皮细胞、肝细胞、胆管上皮细胞、肺上皮细胞、肠上皮细胞、皮肤上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等, 其中最引人注目的是其神经方向的分化潜能。

Eglitis等^[4]研究表明小胶质细胞、星形胶质细胞是来源于骨髓的一种前体细胞。而Brazelton等^[5]通过绿色荧光蛋白基因转染示踪研究发现, 在脑内微环境下, BMSCs能分化为神经元样细胞、星形胶质样细胞, 除表达相应神经细胞表型特点外, 尚有神经元样功能。而在体外, 用DMSO、BHA、-ME等作为主要诱导剂, 可诱导成年大鼠和人的BMSCs分化为神经元和神经胶质细胞, 诱导后细胞在形态上出现类似于神经元样突起, 表达NSE、nestin等神经细胞特异性标志^[6]。此外, 表皮生长因子或脑源性神经生长因子与维甲酸或胎鼠的中脑、纹状体的悬液也可体外诱导BMSCs分化为幼稚的神经元和神经胶质细胞^[7]。可见体外不同培养条件下都可诱导BMSCs

向神经样细胞分化。

牙髓干细胞与BMSCs都是间充质来源的、机体硬组织形成细胞的前体细胞,因而两者在许多方面都有相似之处^[9]。因此,本实验参照BMSCs体外向神经方向分化的诱导条件,在预实验中,采用 -ME、DMSO对人牙髓干细胞进行不同组合联合诱导,但并未出现其形态、表达向神经方向细胞分化的改变。当用DMSO、BHA、-ME、forskolin及氢化可的松联合诱导时,成功的诱导了牙髓干细胞向神经样细胞分化。这表明实验所分离的细胞具有横向分化能力。这与Gronthos等^[9]诱导人牙髓干细胞向神经样细胞分化的诱导条件不全相同,其是诱导细胞向神经胶质样细胞分化,而本实验已经出现了神经样细胞分化的形态特征和其特异性蛋白的表达,这进一步证实适宜的诱导条件是实现干细胞定向诱导分化的必要条件。

目前关于成体干细胞可塑性的机制尚不十分明确。学者们通过多方面研究提出了不同的观点,如发育保留学说、细胞融合学说、转分化学说及干细胞循环学说等,虽然各自有一定的科学证据,但尚未达成普遍共识。随着更多组织干细胞的不断被发现,发育保留学说^[9]逐渐受到重视,该观点认为机体中应含有发育过程中出现的完整的干细胞谱,且发育潜能越原始的干细胞数量越少,说明机体各种组织中均应有发育过程中存留下来的未分化的干细胞,参与组织的修复和重建,保持组织形态和功能的完整。从这个意义上说,可以认为牙髓干细胞也可能是牙齿发育过程中存留下来的干细胞。因为从牙齿发育角度看,颅面部发育中的颅神经嵴细胞群迁移至第一鳃弓形成牙源性间充质,进一步迁移到牙齿发育部位,与牙板上皮相互作用形成牙乳头,最后形成牙髓。因而,牙髓干细胞可能是牙齿发育过程中残留在组织中的神经嵴来源的干细胞群^[10]。神经前体细胞特异性标志nestin表达在啮齿类动物发育中的牙齿中即是证据之一^[11]。最近还检测到在人发育中或成年恒牙的成牙本质细胞中有nestin的表达,并且在牙本质细胞分化成熟后表达下降,而龋病或损伤等病理条件下表达增加^[12]。本实验对牙髓干细胞体外诱导也出现神经特异性蛋白NSE、GFAP和GFAP mRNA的表达,表明牙髓干细胞向神经方向的横向分化潜能可能与组织发生有关。

综上所述,实验中体外联合诱导牙髓干细胞,出现了神经样细胞分化的形态学改变,并有相应神

经细胞标志蛋白和基因的表达,但这种神经元样分化的细胞是否具有神经元细胞电生理、超微结构、生物化学等功能和结构特点,尚有待于进一步的研究来确定。

[参考文献]

- [1] 贺慧霞,金 岩,史俊南,等. 人牙髓干细胞的体外分离、培养及鉴定[J]. 临床口腔医学杂志, 2004, 20(9):515-518.
HE Hui-xia, JIN Yan, SHI Jun-nan, et al. Isolation, culture and identification of dental pulp stem cell[J]. J Clin Stomatol, 2004, 20(9):515-518.
- [2] 贺慧霞,金 岩,史俊南,等. bFGF、TGF- 对人牙髓干细胞增殖和分化能力的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(7):359-363.
HE Hui-xia, JIN Yan, SHI Jun-nan, et al. The effect of bFGF and TGF- on the proliferation and differentiation of human dental pulp stem cell[J]. Chin J Conserv Dent, 2004, 14(7):359-363.
- [3] Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(4):487-500.
- [4] Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macrophages in the brains of adult mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(8):4080-4085.
- [5] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000, 289(5497):1775-1779.
- [6] Woodbury D, Schwarz EJ, Prochop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4):364-370.
- [7] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2):247-256.
- [8] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81(8):531-535.
- [9] 史春梦,程天民. 成体干细胞可塑性研究的理论思考[J]. 中国临床康复, 2003, 7(23):3249-3251.
SHI Chun-meng, CHENG Tian-min. Theoretic thoughts on the plasticity of adult stem cell[J]. Chin J Clin Rehabilitation, 2003, 7(23):3249-3251.
- [10] Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, et al. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(6):591-597.
- [11] Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, et al. Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development[J]. Int J Dev Biol, 1995, 39(6):947-956.
- [12] About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, et al. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological condition[J]. Am J Pathol, 2000, 157(1):287-295.

(本文编辑 汤亚玲)