

[文章编号] 1000-1182(2007)02-0198-04

# 维甲酸诱导牙周韧带细胞分化的研究

王 燕<sup>1</sup>, 杨丕山<sup>1</sup>, 樊明文<sup>2</sup>

(1. 山东大学口腔医院 牙体牙髓科, 山东 济南 250012;

2. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 武汉大学, 湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的 研究并比较维甲酸对牙周韧带细胞和牙龈成纤维细胞向成骨样细胞分化潜能的影响。方法 体外培养牙周韧带细胞与牙龈成纤维细胞, 通过生化法、原位杂交及RT-PCR分别检测维甲酸作用前后碱性磷酸酶(ALP)活性的变化及其mRNA的表达情况。结果 正常牙周韧带细胞与牙龈成纤维细胞的ALP活性有明显差别, 前者高于后者; 原位杂交及RT-PCR均检测到牙周韧带细胞有mRNA表达而牙龈成纤维细胞无表达。维甲酸作用后牙周韧带细胞ALP活性明显升高, mRNA表达信号相应增强, 且在 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组效果最明显; 牙龈成纤维细胞ALP活性亦有升高, 在mRNA水平仅RT-PCR检测到 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组有较弱的表达, 其他组及原位杂交均未见表达。结论 牙周韧带细胞和牙龈成纤维细胞在向成骨方向的分化潜能上存在差异。

[关键词] 牙周韧带细胞; 牙龈成纤维细胞; 碱性磷酸酶; 维甲酸

[中图分类号] R781.4+2 [文献标识码] A

Effects of Retinoic Acid on Differentiation of Periodontal Ligament Cells WANG Yan<sup>1</sup>, YANG Pi-shan<sup>1</sup>, FAN Ming-wen<sup>2</sup>. (1. Dept. of Endodontics, College of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Wuhan University, Wuhan 430079, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of retinoic acid on differentiation of periodontal ligament cells (PDLs) and gingival fibroblasts (GFs). Methods The periodontal ligament cells and gingival fibroblasts were cultured, challenged with different concentrations of retinoic acid in medium and detected for the alkaline phosphatase (ALP) activity and its mRNA by biochemical technique, in situ hybridization and RT-PCR. Results ALP activity in normal PDLs was higher than that in GFs. The mRNA signals were positive in PDLs, and negative in GFs. After treated with different concentrations of retinoic acid, ALP activity of PDLs was increased than that of the control, and its mRNA signals were enhanced, especially in  $5 \times 10^{-6}$  mol/L. The treated GFs showed a slight increase of ALP activity and a weak band of mRNA signals only in  $5 \times 10^{-6}$  mol/L concentration. Conclusion There were differences between PDLs and GFs in differentiating into osteoblast-like cells.

[Key words] periodontal ligament cell; gingival fibroblast; alkaline phosphatase; retinoic acid

以往研究表明牙周韧带细胞(periodontal ligament cells, PDLs)具有多向分化潜能, 在适当的环境条件和刺激因子作用下可以向成骨细胞和成牙骨质细胞方向分化, 形成牙槽骨和牙骨质。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)作为成骨细胞的特征性标记物可反应成纤维细胞向成骨细胞方向分化的趋势<sup>[1-3]</sup>。全反式维甲酸(all trans-retinoic acid, RA)是一种细胞核内转录因子, 研究<sup>[3]</sup>表明RA能促进多种细胞的增殖和分化。本实验通过RA作用于牙

周韧带细胞与牙龈成纤维细胞(gingival fibroblasts, GFs), 研究RA作用前后ALP活性及其mRNA的表达情况, 比较2种细胞向成骨细胞方向分化的趋势, 为进一步研究2种细胞的功能提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及仪器

波形蛋白抗体、细胞角蛋白抗体、免疫组化ABC检测试剂盒、DAB显色试剂盒、碱性磷酸酶原位杂交检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); 全反式维甲酸(Sigma公司, 美国); 碱性磷酸酶检测试剂盒(北京中生物生物工程高技术公司); Trizol试剂盒(Gibco公司, 美国); 一步法RT-PCR试剂盒、DNA Marker KL2000(Takara公司, 日本); 引物

[收稿日期] 2006-02-06; [修回日期] 2006-06-28

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展资助项目(21350024060610);

山东省中青年科学家科研奖励基金资助项目(02BS096)

[作者简介] 王 燕(1965-), 女, 山东人, 副教授, 博士

[通讯作者] 王 燕, Tel: 0531-88382623

由上海生工生物公司合成;紫外分光光度计(UY-265型,日本岛津公司);PCR扩增仪(PTC-51型,北京若比邻电子信息技术有限责任公司);电泳仪(DYY-31A型,北京市六一仪器厂)。

## 1.2 PDLCs和GFs的培养及鉴定

取因正畸治疗而拔除的健康年轻的前磨牙,刮取根中1/3的牙周膜组织,采用组织块法、按标准条件进行PDLCs原代培养<sup>[4]</sup>,取该部位龈乳头行GFs的培养,第4~8代细胞用于实验。利用波形蛋白和细胞角蛋白抗体进行细胞起源的鉴定。

## 1.3 维甲酸的配制及实验分组

将维甲酸溶于无水乙醇,浓度为 $5 \times 10^{-3}$  mol/L作为母液,用含5%新生牛血清的DMEM培养液将其稀释为 $5 \times 10^{-5}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-7}$  mol/L作为工作液。3个实验组分别加入以上3种工作液,对照组为含5%新生牛血清的DMEM培养基。

## 1.4 ALP活性的测定

将细胞调整细胞浓度至 $1 \times 10^5$  个/mL,每孔接种细胞悬液100  $\mu$ L,标准条件培养48 h,弃去培养液和未贴壁的细胞,分别加入3种工作液200  $\mu$ L/孔,继续培养,分别于0、1、2、3、4、5、6、7 d随机取1个培养板用于实验。每组取3孔用于细胞计数,其余各孔弃去液体,PBS冲洗3次,每孔加入0.2%的Triton X-100 100  $\mu$ L,于4  $^{\circ}$ C过夜,吸管吹打以使细胞充分破碎。每孔加标准底物液100  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C放置30 min,用1 mol/L NaOH 终止反应。酶联免疫检测仪上测OD<sub>410nm</sub>值,取5孔的平均值计为每组的OD值。结果采用SPSS 10.0统计软件行方差分析。

## 1.5 原位杂交检测

ALP原位杂交检测试剂盒采用地高辛标记的多聚寡核苷酸探针,原位杂交的操作步骤按试剂盒说明进行。

探针序列为:5'-TTAGCCACGTTGGTGTGAGCTTCTGAAGCTCCAG-3';5'-ATGTTATGCATGAGCTGGTAGGCGATGTCCTTACA-3';5'-GCAGTGAA-GGGCTTCTTGCTGTGTCACTCAGCAT-3'。

## 1.6 RT-PCR检测

1.6.1 总RNA的提取及质量控制 细胞总RNA的提取按Trizol试剂盒说明进行。取4  $\mu$ L RNA样品加0.1% DEPC处理水到1 mL,用1 mL DEPC水作空白对照,在分光光度计上测定280 nm及260 nm处的OD值,计算OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>值以测其纯度。

1.6.2 引物设计 ALP和内参GAPDH引物序列如下。ALP sense primer:5'-GGACGGACCCCTCGC-CAGTGCT-3', antisense primer:5'-AGAGGGC-CACGAAGGGGAAGT-3', GAPDH sense primer:5'-

ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', antisense primer 5'-TCCACCACCCCTGTTGCTGTA-3'。

1.6.3 反应过程 反应体系为50  $\mu$ L,反应条件为42  $^{\circ}$ C 60 min逆转录 cDNA链;94  $^{\circ}$ C 5 min预变性;95  $^{\circ}$ C 30 s;55  $^{\circ}$ C 45 s;72  $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环;最后72  $^{\circ}$ C 延伸10 min。

1.6.4 PCR产物分析 制取1%琼脂糖凝胶,在各加样孔中加入各实验组样品及DNA Marker,紫外透射仪下观察并照相记录电泳结果。图像分析仪上做积分光密度分析(平均光密度值 $\times$ 面积),半定量以确定mRNA的表达情况。

## 2 结果

### 2.1 细胞起源鉴定及形态学分析

原代及传代的PDLCs与GFs均呈梭形,细胞生长密集后排列呈束状;经免疫组化鉴定波形蛋白阳性,细胞角蛋白阴性,符合中胚层来源的细胞特征。RA作用后细胞形态及排列保持稳定。

### 2.2 ALP活性

正常PDLCs和GFs的ALP活性有明显差别,前者高于后者。3种浓度的RA液对PDLCs的ALP活性均有促进作用。 $5 \times 10^{-6}$  mol/L RA液作用后PDLCs和GFs的ALP活性趋势见图1。PDLCs各实验组于处理后的0、1、2、3、4、5、6、7 d分别测其活性,显示第2天ALP开始升高,4 d达高峰;以后几天基本保持稳定水平。每组的ALP值都高于对照组( $P < 0.05$ ), $5 \times 10^{-6}$  mol/L组效果最显著( $P < 0.01$ );对照组的酶水平7 d皆保持稳定。GFs各实验组中ALP水平亦有增高,其中 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组效果明显。

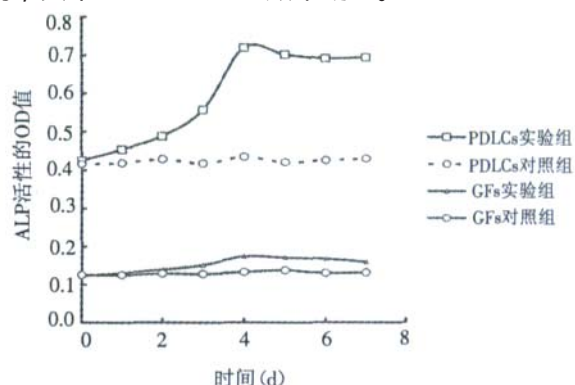


图1  $5 \times 10^{-6}$  mol/L RA作用后PDLCs和GFs的ALP活性变化趋势

Fig 1 Effect of  $5 \times 10^{-6}$  mol/L RA on ALP activity of PDLCs and GFs

### 2.3 原位杂交检测

正常PDLCs的ALP表达为阳性(图2左),胞浆内有淡黄色的颗粒状物;RA作用后4 d PDLCs ALP的mRNA表达信号明显增强,以 $5 \times 10^{-6}$  mol/L RA组效果最显著(图2右)。而GFs为阴性(图3左),RA作用后

亦未发现任何表达信号(图3右)。

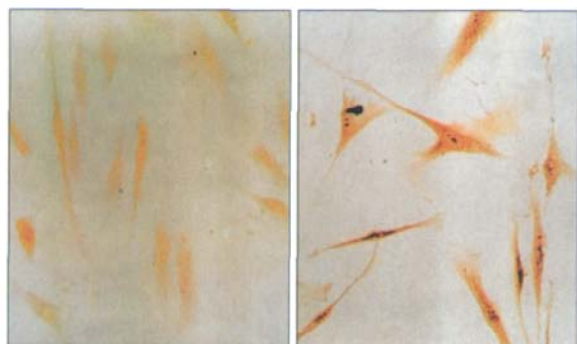


图2 ALP在正常PDLs(左)和 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组PDLs(右)中的表达 原位杂交  $\times 20$

Fig 2 Expression of ALP in PDLs (left) and PDLs in  $5 \times 10^{-6}$  mol/L group (right) in situ hybridization  $\times 20$

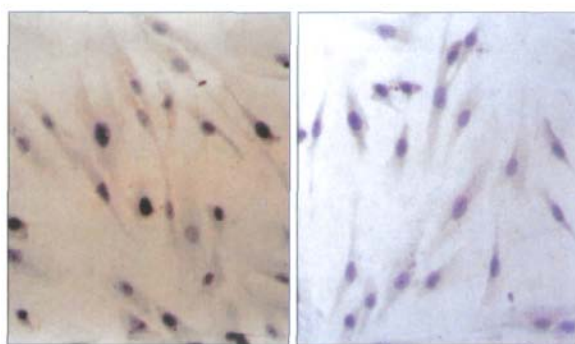
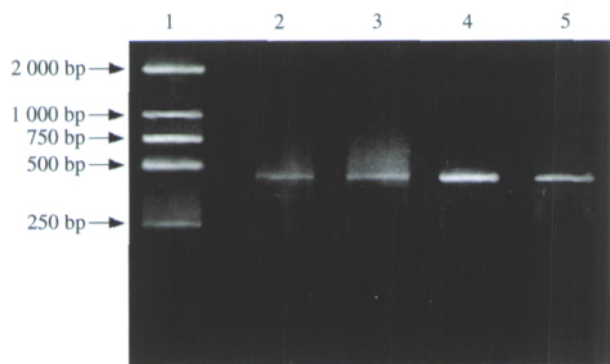


图3 ALP在正常GFs(左)和 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组GFs(右)中的表达 原位杂交  $\times 20$

Fig 3 Expression of ALP in GFs (left) and GFs in  $5 \times 10^{-6}$  mol/L group (right) in situ hybridization  $\times 20$

## 2.4 RT-PCR检测

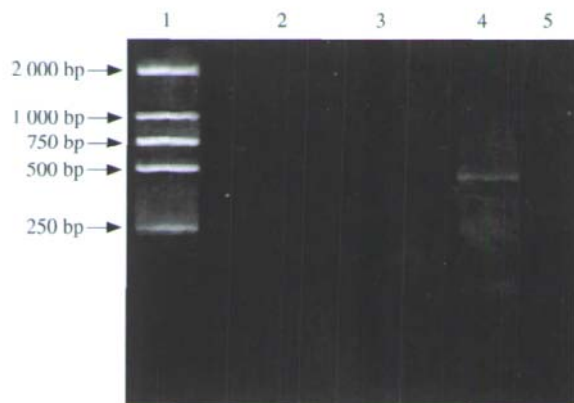
分别将内参与ALP引物加入两个反应体系中, 内参有较亮的电泳带, 证明实验体系可靠有效。PDLs中对照组有较弱的电泳带, 而各实验组表达信号均见增强(图4),  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组最显著( $P < 0.01$ ), PCR产物的带型位于DNA Marker的近500 bp处, 与425 kb的产物片段相一致; 在GFs仅 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组有一较弱的电泳带, 其他各组无明显的带型(图5)。



1: DNA Marker KL2000; 2: 对照组; 3:  $5 \times 10^{-7}$  mol/L组; 4:  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组; 5:  $5 \times 10^{-5}$  mol/L组

图4 RT-PCR法检测ALP在PDLs中的表达

Fig 4 Detection of ALP expression in PDLs by RT-PCR



1: DNA Marker KL2000; 2: 对照组; 3:  $5 \times 10^{-7}$  mol/L组; 4:  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组; 5:  $5 \times 10^{-5}$  mol/L组

图5 RT-PCR法检测ALP在GFs中的表达

Fig 5 Detection of ALP expression in GFs by RT-PCR

## 3 讨论

ALP是一种膜结合糖蛋白<sup>[15]</sup>, 在碱性环境下能水解一系列的单磷酸酯, 将有机磷转变为无机磷离子并释放到体液环境中, 形成过饱和状态, 导致钙盐的沉积, 在矿化组织的形成中具有重要作用。ALP在矿化组织细胞如成骨细胞及成牙本质细胞中高表达, 它可作为矿化组织形成细胞分化及矿化组织形成的标记物。

本研究显示, PDLs和GFs 2种细胞在正常状况下的ALP活性及其基因表达均有不同, PDLs的ALP活性高于GFs, 在mRNA水平上原位杂交及RT-PCR均显示PDLs有阳性表达信号而GFs则无表达, 这与Yorimasa等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。Gao等<sup>[7]</sup>研究了一系列细胞, 结果发现ALP的mRNA表达水平由高到低依次为: 成骨细胞、PDLs、GFs、成牙骨质细胞。Goseki等<sup>[1]</sup>从培养的人PDLs中分离出全长ALP的cDNA并测序, 证明这种克隆的cDNA的大小及5、3端的序列与人成骨细胞的组织非特异型ALP相同。Lin等<sup>[8]</sup>研究发现牙周韧带中存在纤维源型及骨源型细胞, 前者表达I型及II型胶原, 后者表达ALP及骨桥素, 从而表明PDLs既具有形成结缔组织又具有形成矿化组织的能力。还有研究发现, 不同部位的PDLs中ALP有不同的表达, 近牙槽骨的部位ALP表达强度最高, 近牙骨质部位次之, 再次是中间部分的牙周膜, 无细胞性牙骨质的牙周膜中ALP活性最低, 这种分布与磷酸盐的代谢和牙骨质沉积有关<sup>[9-10]</sup>。

本研究中PDLs对RA反应敏感, 细胞对3种不同浓度的RA均有反应( $P < 0.05$ ),  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组的ALP活性增强最明显。在mRNA水平上, 原位杂交各组染色均有增强,  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组最深; RT-PCR



显示3组电泳带均增强,  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组效果最显著。而GFs对RA的反应较弱, ALP活性略有增强,  $5 \times 10^{-6}$  mol/L组效果较明显; 在mRNA水平上原位杂交未检测到杂交信号, RT-PCR则只检测到 $5 \times 10^{-6}$  mol/L组有较弱的电泳带, 说明GFs的ALP基因表达较弱, 以致于检测不到, 其中mRNA在转录前或实验过程中分解也可能是原因之一。由本研究结果可以推测, 体外培养的2种细胞具有异质性, 2种细胞各自包含独特的细胞亚型, 各亚型具有不同的生物学行为。因此, 碱性磷酸酶的基因表达不同, 对RA的反应亦不同。

本研究还发现, ALP活性及其mRNA的表达不仅与RA的浓度有关, 还与作用时间有关。RA作用后4 d达高峰期, 这与其他相关的研究结果不完全一致, 笔者认为, 可能是由于细胞的种类不同所致<sup>[11-12]</sup>。细胞对RA的反应分两步进行<sup>[3,13]</sup>: 维甲酸结合到核内受体上诱导特异性基因的转录, 这一过程发生在二者接触的30 min以内, 也叫早期或初期反应; 第1步翻译得到的蛋白质激活其他基因而产生第2步反应, 也叫延迟反应。RA对不同种类细胞的ALP活性的诱导时间不等, 可能是由于RA作用的时相不同所致。

本实验中, 经过RA处理的PDLCS的ALP活性表达在达到高峰后的几天都能保持较高而稳定的水平, 而San Miguel等<sup>[3]</sup>研究同一种细胞却显示高峰期以后ALP活性下降。同一种细胞对RA反应敏感性不同, 笔者认为可能是由于培养体系中营养成分的不同所致。San Miguel等<sup>[3]</sup>所用的培养体系为无血清培养基, 而本实验所用的为细胞能耐受的含低浓度血清(5%)的培养基, 缺乏血清可能是细胞对RA反应敏感性下降的原因之一。

RA与细胞的生长、分化及器官的形态发生均有关系, 本研究结果为揭示PDLCS分化的调节提供了重要信息。然而多项研究表明, 体内PDLCS增殖与分化的调节是一个复杂的网络调控机制而不是单一因素<sup>[9-10]</sup>, 体外培养体系尚不能精确反应体内的实际情况, 因此体内RA对牙周组织的作用还需要进一步的深入研究。

#### [参考文献]

[1] Goseki M, Oida S, Takeda K, et al. Identification of bone-type alkaline phosphatase mRNA from human periodontal ligament cells[J]. J Dent Res, 1995, 74(1): 319-322.

- [2] Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: Its relation to cementum formation[J]. J Dent Res, 1995, 74(7): 1374-1381.
- [3] San Miguel SM, Goseki Sone M, Sugiyama E, et al. The effects of retinoic acid on alkaline phosphatase activity and tissue-non-specific alkaline phosphatase gene expression in human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts[J]. J Periodontal Res, 1998, 33(7): 428-433.
- [4] 王燕, 汪说之, 樊明文, 等. 牙周韧带细胞体外矿化的研究——骨唾蛋白与骨桥素在矿化过程中的表达[J]. 口腔医学纵横, 2002, 18(1): 11-13.  
(WANG Yan, WANG Shui-zhi, FAN Ming-wen, et al. A study of mineralization in periodontal ligament cell in vitro. Expression of bone sialoprotein and osteopontin during mineralization[J]. J Comprehensive Stomatol, 2002, 18(1): 11-13.)
- [5] 王燕, 汪说之. 碱性磷酸酶在牙周组织中表达的研究近况[J]. 国外医学口腔医学分册, 2001, 28(6): 348-350.  
(WANG Yan, WANG Shui-zhi. Advances of expression of alkaline phosphatase in periodontium[J]. Foreign Medical Sciences(Stomatology), 2001, 28(6): 348-350.)
- [6] Yorimasa O, Naomi N, Takeshi S, et al. Comparison of the characteristics of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells[J]. J Periodontol, 1995, 66(12): 1025-1031.
- [7] Gao J, Symons AL, Haase H, et al. Should cementoblasts express alkaline phosphatase activity? Preliminary study of rat cementoblasts in vitro[J]. J Periodontol, 1999, 70(8): 951-959.
- [8] 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.
- [9] Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, et al. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells[J]. J Dent Res, 1998, 77(4): 555-564.
- [10] Bartold PM, McCulloch CAG, Narayanan AS, et al. Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology[J]. Periodontol 2000, 2000, 24: 253-269.
- [11] Lafage-Proust MH, Weslowski G, Ernst M, et al. Retinoic acid effects on an SV-40 large T antigen immortalized adult rat bone cell line[J]. J Cell Physiol, 1999, 179(3): 267-275.
- [12] Murata T, Sugatani T, Shimizu K, et al. Effect of the phosphodiesterase 4 inhibitor, rolipram, on retinoic acid-increased alkaline phosphatase activity in the mouse fibroblastic C3H10T1/2 cell line[J]. Arch Oral Biol, 2003, 48(1): 63-67.
- [13] San Miguel SM, Goseki Sone M, Sugiyama E, et al. Tissue-non-specific alkaline phosphatase mRNA expression and alkaline phosphatase activity following application of retinoic acid in cultured human dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 1999, 44(10): 861-869.

(本文编辑 汤亚玲)