

纳米羟基磷灰石和氢氧化钙对成牙本质细胞活性影响的比较*

王健平, 王本材, 贾鑫

Comparison of the effects of nano-hydroxyapatite and calcium hydroxide on the cell activity of odontoblasts

Wang Jian-ping, Wang Ben-cai, Jia Xin

Abstract

BACKGROUND: Culturing odontoblasts with nano-hydroxyapatite can more intuitively reflect the biocompatibility of hydroxyapatite as dental pulp capping materials. However, odontoblasts are difficult to culture *in vitro*.

OBJECTIVE: To observe the effect of nano-hydroxyapatite and calcium hydroxide on the cell activity of mouse odontoblasts.

METHODS: Tooth germ of the first mandibular molar was took in fetal mice; mouse dental papilla cells were primary cultured using tissue block culture method. Cells with the cellular morphology of odontoblast-like shape were selected for the observation under inverted microscope. RT-PCR was used to detect the dentin sialophosphoprotein expression in order to identify the odontoblasts. Passage 4 odontoblasts in log-phase were cultured in the media containing 100 mg/L nano-hydroxyapatite and 100 mg/L calcium hydroxide respectively for 1, 3, 5 and 7 days. Blank control group was set up.

RESULTS AND CONCLUSION: CCK-8 results showed that cells in the nano-hydroxyapatite group grew well on 1, 3, 5 and 7 days after culture. Cell activity in the calcium hydroxide group was lower than that in the blank control group on 3, 5 and 7 days after culture ($P < 0.01$). Alkaline phosphatase test results showed that nano-hydroxyapatite and calcium hydroxide had no obvious effect on the activity of alkaline phosphatase. These findings indicate that nano-hydroxyapatite has no effect on the activity of the odontoblasts, while calcium hydroxide has an inhibition effect on the activity of the odontoblasts.

Wang JP, Wang BC, Jia X. Comparison of the effects of nano-hydroxyapatite and calcium hydroxide on the cell activity of odontoblasts. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(3): 417-420.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 将纳米羟基磷灰石与成牙本质细胞共同培养能更直观反映羟基磷灰石作为齿科盖髓材料的细胞相容性, 但体外培养成牙本质细胞较困难。

目的: 观察纳米羟基磷灰石和氢氧化钙对小鼠成牙本质细胞的活性的影响。

方法: 取胎鼠下颌第一磨牙牙胚, 采用组织块培养法对小鼠牙乳头细胞进行原代培养, 倒置显微镜下挑选具有成牙本质样细胞形态的细胞观察细胞形态及生长情况。采用 RT-PCR 法对细胞牙本质涎磷蛋白的表达进行鉴定, 确定为成牙本质样细胞。取对数生长期的第 4 代成牙本质样细胞, 分别用含有 100 mg/L 纳米羟基磷灰石和 100 mg/L 氢氧化钙的培养基培养 1, 3, 5, 7 天, 并设置空白对照组。

结果与结论: CCK-8 法检测结果显示, 培养 1, 3, 5, 7 d, 纳米羟基磷灰石组的细胞生长良好。培养 3, 5, 7 d, 氢氧化钙组细胞活性低于空白对照组 ($P < 0.01$)。碱性磷酸酶测定法检测结果显示, 羟基磷灰石和氢氧化钙均对碱性磷酸酶活性无明显影响。结果证实, 纳米羟基磷灰石对成牙本质细胞活性无影响, 氢氧化钙对其细胞活性有抑制作用。

关键词: 纳米羟基磷灰石; 成牙本质细胞; 四唑盐比色法; 碱性磷酸酶; RT-PCR; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.03.008

王健平, 王本材, 贾鑫. 纳米羟基磷灰石和氢氧化钙对成牙本质细胞活性影响的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(3):417-420. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近年研究表明, 纳米羟基磷灰石作为新型的齿科盖髓材料, 以牙髓刺激性小, 能够诱导修复性牙本质形成, 且生物相容性明显优于传统氢氧化钙盖髓剂等特点而受到广泛关注^[1]。

成牙本质细胞作为牙髓-牙本质复合体的特征性细胞, 是牙体组织中唯一合成和分泌牙本质有机基质的细胞, 直接参与牙齿发育和损伤后修复的全过程, 是龋病和牙髓病治疗的关键。成牙本质细胞是处于终末分化期的细胞, 原位取材的成牙本质细胞在体外环境难以保持其极性特征^[2], 因此关于成牙本质细胞的体外研

究受到了极大地限制。江中明等^[3]成功将小鼠牙乳头间充质诱导为成牙本质样细胞, 为其体外研究奠定了基础。实验分别采用含有羟基磷灰石和氢氧化钙的培养基与成牙本质样细胞复合培养, 对照组只采用培养基进行细胞培养, 通过CCK-8比色法和碱性磷酸酶活性测定法观察成牙本质细胞的活性和碱性磷酸酶活性, 更加直观的了解羟基磷灰石作为齿科盖髓剂对成牙本质样细胞的影响。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外实验。

时间及地点: 于 2010-10/2011-05 在佳木

Second Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

Wang Jian-ping★, Master, Chief physician, Second Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China Wjp.1959@163.com

Correspondence to: Wang Jian-ping, Second Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China Wjp.1959@163.com

Received: 2011-11-01 Accepted: 2011-12-06

佳木斯大学附属第二医院, 黑龙江省佳木斯市 154002

第一作者兼通讯作者★: 王健平, 男, 1959年生, 黑龙江省佳木斯市人, 汉族, 1989年湖北医科大学毕业, 硕士, 主任医师。佳木斯大学附属第二医院, 黑龙江省佳木斯市 154002 Wjp.1959@163.com

中图分类号:R318 文献标识码:B 文章编号:1673-8225 (2012)03-00417-04

收稿日期: 2011-11-01 修回日期: 2011-12-06 (20110901019WJ-LX)

斯大学生命科学实验中心细胞培养实验室完成。

材料:

实验动物: 孕期 20 d 的小白鼠 1 只, 取其胎鼠 5 只, 购自佳木斯大学动物实验中心。将其置于无菌平皿中备用。

纳米羟基磷灰石: 纳米羟基磷灰石分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 白色粉末状, 球形, 直径 70~100 nm, pH 8.0, 由佳木斯大学材料学院提供。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 高糖培养基, 胰酶	美国 GIBCO 公司
CCK-8 试剂盒, 碱性磷酸酶检测试剂盒, Trizol 试剂盒	碧云天生物技术研究所
RT-PCR 试剂盒	宝生物工程(大连)有限公司
酶联免疫检测仪, PCR 仪	佳木斯大学生命科学实验中心

方法:

小鼠成牙本质细胞原代培养: 体式显微镜下取胎鼠牙胚, 无菌条件下将牙乳头组织与成釉器分离, 将牙乳头组织接种于培养瓶中, 组织块周围加适量 DMEM 培养基。于 37 °C, 体积分数 5%CO₂, 饱和湿度条件下培养细胞, 48 h 后见组织块周围有细胞爬出, 加入 4 mL 含有双抗的 DMEM(含体积分数 10%胎牛血清)培养基, 倒置显微镜下观察细胞的形态及生长情况。

小鼠成牙本质细胞形态学观察: 小鼠成牙本质细胞在体内为高柱状栅栏状排列, 细胞彼此拥挤, 细胞顶端有一细长突起深入牙本质小管内。实验培养的细胞在显微镜下观察为胞质丰富, 形态呈梭形和具有单侧较长的细胞突起的细胞。挑选具有高柱状, 较长单侧细胞突起的成牙本质样细胞形态的细胞, 转至 6 孔板, 继续培养。

RT-PCR 法鉴定小鼠成牙本质样细胞涎磷蛋白 mRNA 的表达: 提取成牙本质细胞总 RNA, 参考江中明^[3]等对 PCR 扩增引物的设计方法, 预期片段长度为 506 bp。引物序列: 上游: 5'-GGG AAG AGC CAA GGA ATA G-3'; 下游: 5'-TCC TCA CTC TCG CTG TCA C-3'。

cDNA 合成后, 进行 PCR 扩增。 反应体系: 5×PCR Buffer 10 μL, 灭菌蒸馏水 28.75 μL, TaKaRa Ex Taq HS 0.25 μL, 上游特异性引物 0.5 μL, dH₂O 0.5 μL, 共 40 μL。反应条件: 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环, 选小鼠成纤维细胞为阴性对照组。采用琼脂糖凝胶电泳分析结果。

小鼠成牙本质样细胞活性检测: 取挑选出来的对数生长期的第 4 代成牙本质样细胞以 0.25%胰酶 37 °C 消化, 将分离出的细胞制备成细胞悬液, 接种于培养瓶中, 继续培养。分别加入含有质量浓度 100 mg/L 氢氧化钙和纳米羟基磷灰石的培养基培养 1, 3, 5, 7 d。

CCK-8 细胞活性检测: 分别将培养 1, 3, 5, 7 d 的

成牙本质样细胞制成细胞悬液, 以 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种于 96 孔培养板上, 每种材料按时间分组均设 10 个复孔。每孔加 CCK-8 试剂 10 mL, 37 °C, 体积分数 5%CO₂, 饱和湿度条件下培养 1 h。酶联免疫检测仪 450 nm 处测吸光度(A)值。

碱性磷酸酶活性检测: 将细胞悬液以浓度 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种 96 孔培养板, 每组 10 孔。每孔加 100 μL DMEM(含体积分数 2%胎牛血清)培养基。当细胞铺满后, 弃孔内液体和未贴壁细胞, 无血清培养基冲洗 3 遍, 每孔加入体积分数 0.1%的 Triton X-100 50 μL, 4 °C 过夜, 然后加入碱性磷酸酶底物, 100 μL/孔, 37 °C 孵箱内 30 min, 以 0.2 mol/L NaOH 终止反应。采用酶联免疫检测仪在 410 nm 波长检测吸光度(A)值。

主要观察指标: 各组成牙本质细胞培养 1, 3, 5, 7 d 的细胞活性和碱性磷酸酶的活性。

2 结果

2.1 小鼠成牙本质样细胞培养 48 h 后形态 培养 48 h 后, 见组织块周围有细胞爬出, 贴壁生长的细胞形态有梭形, 长三角形, 网状等, 部分细胞具有较长单侧突起, 部分细胞具有双侧突起, 三侧突起等。见图 1a。挑选其中具有较长单侧突起的细胞, 扩大培养。见图 1b。

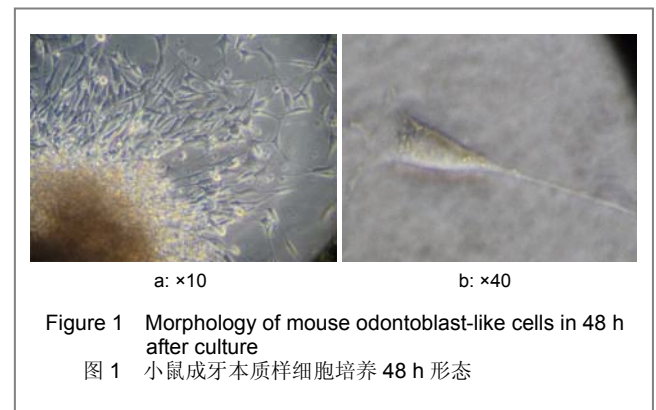


Figure 1 Morphology of mouse odontoblast-like cells in 48 h after culture
图 1 小鼠成牙本质样细胞培养 48 h 形态

2.2 小鼠牙本质涎磷蛋白 mRNA 的表达 见图 2。

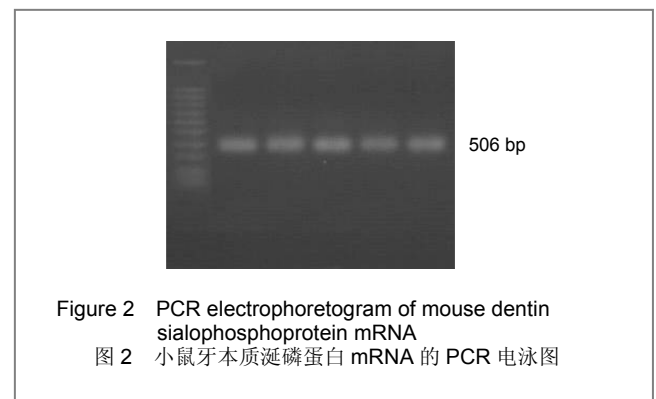
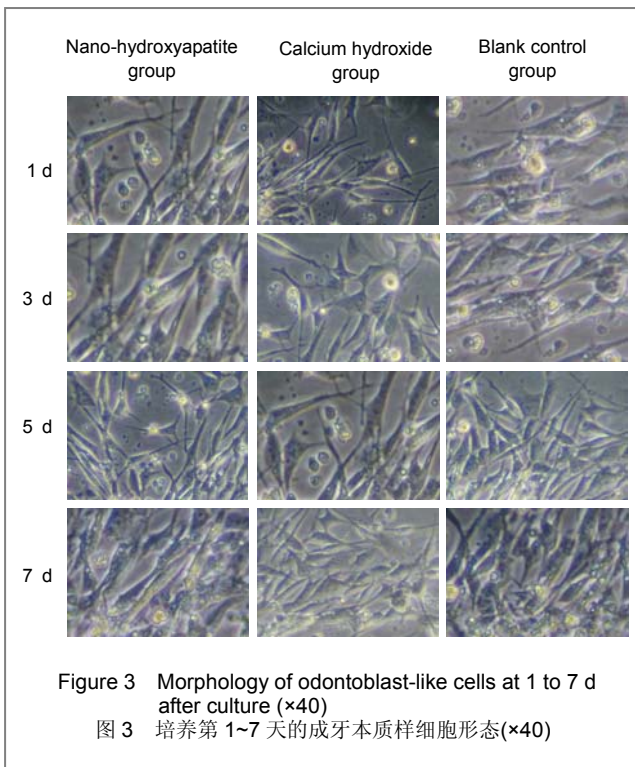


Figure 2 PCR electrophoretogram of mouse dentin sialophosphoprotein mRNA
图 2 小鼠牙本质涎磷蛋白 mRNA 的 PCR 电泳图

凝胶电泳分析结果显示, 在 506 bp 出现亮条带,

表达了牙本质涎磷蛋白 mRNA, 在基因水平上证明了所养细胞为成牙本质样细胞。

2.3 小鼠成牙本质样细胞培养 1~7 d 后形态及变化 在培养的 1, 3, 5, 7 d 中各组成牙本质样细胞成增殖趋势, 细胞浓度逐天增高, 图中纳米羟基磷灰石组和空白对照组细胞密度未见明显区别, 氢氧化钙组在 3, 5, 7 d 细胞密度低于纳米羟基和空白对照两组。40 倍镜下观察大部分细胞呈长三角形, 具有较长细胞突起, 少量网状细胞混杂其中。图中散在的卵圆形颗粒可能是未溶解的纳米羟基磷灰石和氢氧化钙以及细小的组织团块。见图 3。



2.4 CCK-8检测细胞活性结果 纳米羟基磷灰石组细胞吸光度值在培养 1, 3, 5, 7 d 与空白对照组差异无显著性意义。氢氧化钙组在培养 3, 5, 7 d 细胞活性明显低于空白对照组($P < 0.01$), 见表 1。

Group	Culture time (d)			
	1	3	5	7
Nano-hydroxyapatite	0.206±0.002	0.393±0.005	0.528±0.00	0.712±0.002
Calcium hydroxide	0.207±0.002	0.373±0.005 ^a	0.497±0.001 ^a	0.628±0.002 ^a
Blank control	0.209±0.001	0.402±0.004	0.534±0.002	0.707±0.001

^a $P < 0.01$, vs. control group

2.5 碱性磷酸酶检测结果 纳米羟基磷灰石和氢氧化钙组与细胞复合培养在 1, 3, 5, 7 d 与空白对照组相比差

异无显著性意义($P > 0.05$), 表明羟基磷灰石和氢氧化钙对成牙本质细胞碱性磷酸酶均无明显影响, 见表 2。

Group	Culture time (d)			
	1	3	5	7
Nano-hydroxyapatite	0.187±0.004	0.312±0.003	0.464±0.002	0.588±0.003
Calcium hydroxide	0.184±0.002	0.313±0.003	0.466±0.002	0.591±0.001
Blank control	0.186±0.002	0.314±0.002	0.466±0.003	0.590±0.003

2.6 生物相容性评价 实验结果显示, 纳米羟基磷灰石与氢氧化钙相比具有较好的细胞生物相容性。

3 讨论

成牙本质细胞作为牙髓牙本质复合体的纽带, 是高分化的有丝分裂期后细胞, 参与牙本质基质分泌和矿化两个过程。以成牙本质细胞为研究对象有助于对牙本质形成和损伤修复过程的了解。牙乳头细胞作为未分化的间充质细胞, 具有较强分化为成牙本质细胞的潜能, 近年来有学者采用牙乳头间充质诱导分化成功获得了成牙本质细胞^[3-4], 这就解决了由于成牙本质细胞数量少, 取材难, 终末分化且与牙本质紧密连接等特点造成的体外培养困难的现状。但这种诱导的细胞仅具有成牙本质细胞的部分特征, 如表达牙本质涎磷蛋白, 准确的来说应该称为成牙本质样细胞。传统盖髓剂多以氢氧化钙为主要成分, 虽能诱导牙本质桥的形成, 但形成的牙本质桥矿化程度不高, 且氢氧化钙为强碱性, 具有较强的细胞毒性, 会产生慢性炎症, 牙髓组织出现不良钙化, 甚至出现牙髓坏死以及根部牙髓内吸收等现象, 并且它的长期封闭性较差, 随着时间的推移, 氢氧化钙会发生溶解, 形成微渗漏, 细菌一旦入侵, 便导致牙髓发生病变。研究表明纳米羟基磷灰石与牙体硬组织生物组成相似, 生物相容性好, 能够释放的钙、磷等离子能够参与组织代谢, 为更好的形成牙本质提供生物基础。

实验结果显示, 纳米羟基磷灰石与成牙本质细胞复合培养 1, 3, 5, 7 d 呈稳定增殖状态, 对细胞活性无影响。氢氧化钙与细胞复合培养第一天无明显影响, 虽也成增殖状态但第三天开始与空白对照组相比对细胞活性有影响。

碱性磷酸酶结果显示纳米羟基磷灰石和氢氧化钙与空白对照组相比对成牙本质细胞的碱性磷酸酶均无明显影响, 一方面可能是因为选取的检测时间较早实验组细胞密度较低, 另一方面可能是由于碱性磷酸酶是细胞分化成熟的标志酶^[5], 本实验检测的细胞仍处于快速增

殖期, 未进入成熟分化期的原因。

实验证明纳米羟基磷灰石对成牙本质细胞活性的影响小于氢氧化钙, 是一种安全有效的齿科盖髓剂。但羟基磷灰石为松散的粉末状, 无抗压能力, 导致临床操作不便, 固位较差, 且羟基磷灰石本身并无抗菌性。这些特点使得羟基磷灰石盖髓剂并未大量应用于临床, 羟基磷灰石复合材料的出现在一定程度上解决了这些问题, 但添加何种药物能获得较佳抗菌效果, 以及在纳米羟基磷灰石中添加何种有机物, 使其更类似于牙本质的成分, 这样使形成的修复性牙本质胶原基质沉积更加规律, 矿化水平更高, 这些问题将成为未来纳米羟基磷灰石盖髓剂的研究方向。

致谢: 感谢王建平和王本材老师对本实验的指导和设计, 感谢实验室刘爽老师对实验过程的指导。

4 参考文献

[1] Qiu W, Shi Ym, Xu JY. Feasibility of early dentine bridge formation induced by direct pulp capping with nano-hydroxyapatite. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010; 21(14):3869-3872.
邱伟, 时咏梅, 徐进云. 纳米羟基磷灰石直接盖髓诱导牙本质桥早期形成的可行性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 21(14): 3869-3872.

[2] Zhao YX, Zhao SL, Tang RY, et al. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi*. 2008; 18(4):208-211.
赵颖焯, 赵守亮, 唐荣银, 等. 人成牙本质细胞L型钙离子通道特异性基因片段的克隆研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2008, 18(4):208-211.

[3] Jiang ZM, Luo XL, Ji PH, et al. *Shanghai Kouqiang Yixue*. 2006; 15(2):177-180.
江中明, 罗小龙, 季佩红, 等. 小鼠成牙本质样细胞的原代培养及鉴定[J]. *上海口腔医学*, 2006, 15(2):177-180.

[4] Wang HG, Xiao MZ, Zhao SL, et al. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi*. 2002; 12(2):55-58.
王捍国, 肖振国, 赵守亮, 等. 人成牙本质细胞的原代培养[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2002, 12(2):55-58.

[5] Couble MI, Farges JC, Bleicher F, et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int*. 2000; 66(2):129-138.

[6] Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1995; 39(1):51-68.

[7] Orly I, Gregoire M, Menauteau J. Effects of synthetic calcium phosphates activity of human fibroblasts in culture. *J Biomed Mat Res*. 1989; 23(12):1433-1430.

[8] Alliot-Licht B, Jean A, Gregoire M. Comparative effect of calcium hydroxide and hydroxyapatite on the cellular activity of human pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*. 1994; 39(6):481-489.

[9] Xun WX, Tang WJ, Hao JJ, et al. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi*. 1997; 7(2):108-110.
荀文兴, 唐文杰, 郝建军, 等. 羟基磷灰石、氢氧化钙对鼠牙髓细胞碱性磷酸酶活性的影响[J]. *牙体牙髓牙周病学*, 1997, 7(2):108-110.

[10] YU Q, Xiao MZ, Wu BL, et al. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi*. 2003; 13(2):109-111.
余擎, 肖明震, 吴补领, 等. 成牙本质细胞分化的分子机制[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2003, 13(2):109-111.

[11] Wang YH, Li XG. *Jinzhou Yixueyuan Xuebao*. 2004; 25(4):24-28.
王艳华, 李曦光. 胎鼠牙胚细胞体外培养现状[J]. *锦州医学院学报*, 2004, 25(4):24-28.

[12] Wen B, Chen ZQ. *Shengwu Yixue Gongcheng Zazhi*. 2005; 22(3):463-467.
温波, 陈治清. 纳米羟基磷灰石对成骨细胞功能代谢影响的研究[J]. *生物医学工程学杂志*. 2005, 22(3):463-467.

[13] Zhao YT, Zhang YM, Ning F, et al. *Xiandai Kouqiang Yixue zazhi*. 2007; 21(1):16-19.
赵彦涛, 张玉梅, 宁芳. 两种纳米晶羟基磷灰石的细胞相容性比较[J]. *现代口腔医学杂志*, 2007, 21(1):16-19.

[14] Fang CY, Cao Y. *Zhongnan Daxue Xuebao*. 2007; 32(1):114-118.
方广云, 曹莹. 大鼠牙乳头细胞与纳米羟基磷灰石的体外复合培养[J]. *中南大学学报*, 2007, 32(1):114-118.

[15] Ma XD, Wang JP, Xinan Junyi. 2009; 11(3):485-487.
马旭东, 王健平. 纳米复合羟基磷灰石(nHA)根管充填材料的应用基础研究[J]. *西南军医*, 2009, 11(3):485-487.

[16] Liu F, Ma Y, Xu X. *Zhongguo Kou qiang Zhongzhixue Zazhi*. 2009; 14(2):72-73.
刘峰, 马跃, 徐欣. 珊瑚转化型羟基磷灰石与纯相 β -磷酸三钙对成骨细胞增殖活性实验研究[J]. *中国口腔种植学杂志*, 2009, 14(2):72-73.

[17] Miao B, Wu ZF, Zhao QY, et al. *Zhongguo Tishixue yu Tuxiang Fenxi*. 2010; 15(2):159-164.
苗波, 邹志锋, 赵秋颖, 微束等离子喷涂羟基磷灰石涂层的细胞生物相容性研究[J]. *中国体视学与图像分析*, 2010, 15(2):159-164.

[18] Ni GX, Yao ZP, Huang GT, et al. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi*. 2010; 18(24):2072-2076.
倪国新, 姚志鹏, 黄国涛. 羟基磷灰石掺钎对成骨细胞增殖分化及矿化影响的实验研究[J]. *中国矫形外科杂志*, 2010, 18(24):2072-2076.

[19] Dong JS, Duan QY, Wen J, et al. In vitro study on the odontogenic differentiation potentiality of bonemarrow mesenchymal stem cells. *Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi*. 2010; 20(4):192-195.
董金山, 段晴月, 文军. 骨髓间充质干细胞向成牙本质样细胞分化的体外实验研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2010, 20(4):192-195.

[20] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.

来自本文课题的更多信息—

作者贡献: 王健平进行实验设计, 实验实施为贾鑫, 实验评估为王本材, 资料收集为王本材, 贾鑫成文, 王健平审核, 王健平对文章负责。

利益冲突: 本课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[20]。

本文创新性: 作者于中国知网数据库和 PUBMED 数据库检索成牙本质细胞和纳米羟基磷灰石等关键词均未发现类似研究, 说明本实验具有先进性。迄今为止, 国内外学者对成牙本质细胞的生物学研究, 由于缺乏理想的体外研究模型而受到极大限制, 采用牙乳头间充质诱导分化法成功获得成牙本质细胞为研究前提。实验采用纳米羟基磷灰石与成牙本质细胞复合培养能够更直观的反映出羟基磷灰石作为齿科盖髓剂的细胞相容性, 为其广泛应用于临床盖髓奠定了理论基础。实验采用 CCK-8 这种新型的细胞活性检测手段, 较以往传统 MTT 法能减少误差, 以获得更准确的实验结果。