

兔牙髓细胞的体外增殖及鉴定**

马蓉¹, 王艳梅², 庄友梅², 木合塔尔·霍加²

新疆维吾尔自治区人民医院,¹口腔科,²颌面外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001

马蓉★, 女, 1983年生, 新疆维吾尔自治区库尔勒市人, 回族, 新疆医科大学在读硕士, 医师, 主要从事口腔颌面外科的研究。
pikamei@163.com

通讯作者: 木合塔尔·霍加, 主任医师, 硕士生导师, 新疆维吾尔自治区人民医院颌面外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001
muhtarhoja@yahoo.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)49-09236-05

收稿日期: 2012-04-13
修回日期: 2012-05-16
(20120213022/W·C)

文章亮点: 实验证实兔牙髓细胞中可分离培养出牙髓干细胞, 并能在体外有效增殖。

关键词: 兔; 牙髓细胞; 体外增殖; 鉴定; 间充质干细胞

摘要

背景: 牙髓干细胞的多分化潜能、高扩增速率和容易获取使之成为引人注目的间充质干细胞来源。

目的: 观察兔牙髓细胞增殖特性并进行细胞表面标志物的鉴定。

方法: 体外分离培养兔牙髓细胞, 采用酶解组织块法培养细胞至第3代观察细胞形态变化、计数细胞活率、细胞克隆形成率、细胞生长曲线、细胞增殖周期以及细胞表面标志物的鉴定。

结果与结论: 酶解组织块法可以较快的收获各代兔牙髓细胞。第3代到第6代细胞活率分别比为 94.7% : 95.8% : 95.2% : 95.3%, 细胞的克隆形成率为 18 个/2 000; 细胞的生长曲线基本符合间充质细胞特征, 细胞周期 G₀/G₁ 期大于 80%; 免疫细胞化学 vimentin、CD44、osteonectin、Dsp 均为阳性表达。证实兔牙髓细胞中可分离培养出牙髓干细胞, 并能在体外有效增殖。

In vitro proliferation and identification of rabbit dental pulp cells

Ma Rong¹, Wang Yan-mei², Zhuang You-mei², Muhetaer · Huojia²

Abstract

BACKGROUND: The multi-lineage differentiation potential, high amplification rate and accessibility of the dental pulp cells make them to become an attractive source of mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: To observe the proliferation characteristics of rabbit dental pulp cells and to identify the cells surface marker.

METHODS: The dental pulp cells were isolated and cultured *in vitro*, then the cells were cultured to the third generation by enzymatic digestion method to observe the morphological changes, calculate the cell survival rate, test the cell clone forming rate, measure the cell growth curve and the cell proliferation cycle, and identify the cell surface markers.

RESULTS AND CONCLUSION: The enzymatic digestion method could rapidly harvest various generations of rabbit dental pulp cells. The proportion of the cell survival rate was 94.7%:95.8%:95.2%:95.3% from the third generation to the sixth generation. The cells clone forming rate was 18/2 000; the cell growth curve was in line with the characteristics of mesenchymal cells, and the cell cycle rate of G₀ and G₁ was more than 80%; cell multiplication cycle DNA purity more than 80%. Immunocytochemistry staining showed the positive expression of vimentin, CD44, osteonectin and dentin sialoprotein. It indicates that the dental pulp stem cells can be isolated from the rabbit dental pulp cells and effectively proliferated *in vitro*.

Ma R, Wang YM, Zhuang YM, Muhetaer · Huojia. *In vitro* proliferation and identification of rabbit dental pulp cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(49):9236-9240.

0 引言

自从2000年Gronthos等^[1]成功分离了具有生成牙髓牙本质样复合物能力的人类牙髓干细胞后, 2003年Miura等^[2]在脱落的人类乳牙中也

发现了多潜能干细胞, 这为牙髓干细胞作为组织工程种子细胞并为临床治疗牙齿疾患的研究开辟了一个新的领域。

目前国内已报道从小鼠牙髓干细胞^[3]、大鼠牙髓干细胞^[4]、小型猪乳牙牙髓干细胞等不同成体牙髓中提取牙髓干细胞^[5], 但少有从兔

牙髓组织中提取细胞的相关文献。新西兰兔作为中型动物,其具备和人类相似的生物行为特征,如性情温顺,易饲养,牙齿数目较多,存留时间较长,是研究牙髓干细胞以及用种子细胞移植于组织体内治疗牙齿疾患更为便捷的物种。因此,实验采用兔牙髓细胞进行体外培养,明确其体外扩增能力和增殖特性及免疫标记特征,为其作为组织工程种子细胞以及用于牙齿疾患(如牙再生的治疗)提供依据。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 2011年3至10月在新疆医科大学科技楼干细胞室,万级层流间完成。

材料:

实验动物: 选用普通级瞬目反射正常的健康雌性新西兰兔6只,购自新疆医科大学实验动物中心,体质量在0.8–1.0 kg之间。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
高糖 DMEM 培养基、胎牛血清	Hyclone, 美国
胰蛋白酶、青链霉素溶液	Solarbio, 北京
DispaseII、RNA 酶、PI	Sigma, 美国
I 型胶原酶	Worthington, 美国
小鼠抗兔 Vimentin 抗体	博士德
小鼠抗兔 CD44	Novus, 美国
小鼠抗兔 Osteonectin	QEDBio, 美国
小鼠抗兔 Dsp	Santa Cruz, 美国
CO ₂ 培养箱	Hereaus, 德国
培养皿和培养板、Leica DMI4000B	Corning, 美国
倒置荧光显微镜、Leica 5000B	
正置显微镜	

实验方法:

兔牙髓细胞的体外分离与培养: 局麻下拔除新西兰兔前牙及磨牙迅速放入预冷的高倍双抗液中浸泡10 min,超净台中用0.1 mmol/L的PBS反复冲洗后,用手术刀片分离牙齿,取出牙髓组织,剪去根尖1 mm左右组织,余下牙髓组织剪成约0.5 mm大小的组织块,置入15 mL离心管中,在离心管中加入3 g/L I 型胶原酶和4 g/L dispase酶各1 mL,混匀后置入37 °C水浴中消化50 min。期间不停摇晃离心管,充分让组织块与酶接触,直至看不清牙髓组织。将混合悬液通过孔径为200目的细胞筛网,将未通过筛网

的组织块拣出PBS反复冲洗3次,放入35 cm的培养皿中,加入2 mL完全培养液,置入37 °C,饱和湿度的体积分数5%CO₂培养箱中。观察细胞贴壁后每3 d换液1次,待细胞80%–90%汇合后,用2.5 g/L胰酶消化,以1:3分瓶进行传代直至第18代。

细胞形态变化: 原代培养后,倒置显微镜下观察细胞形态变化。

细胞活率的计数: 收获第3–6代细胞,用0.4%锥虫蓝染色后,按细胞拒染法在血细胞计数板计数细胞拒染率。

细胞克隆形成率: 取第2代兔牙髓细胞接种于35 mm的皿,每个培养皿浓度均为以 $2.5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,加完全培养液2 mL,标准条件下培养14 d,进行细胞克隆计数(≥ 50 个细胞为1个细胞克隆),一式二份。

细胞生长曲线的测定: 取第2代兔牙髓细胞以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种到24孔板,分别在24, 48 h, 3–10 d,用2.5 g/L胰蛋白酶消化细胞,每个时间点均做复孔,以血细胞计数板行细胞计数,将各时间点收获细胞数绘制细胞生长曲线。同时按下述公式计算细胞群体倍增时间(DT)[*]:

$$DT = t \times \frac{\lg 2}{\lg N_t - \lg N_0}$$

t为培养时间;No为首次计数获得的细胞数;Nt为培养t为时间后的细胞数。

细胞周期的测定: 取第2代兔牙髓细胞待细胞80%汇合后,经2.5 g/L胰蛋白酶消化,后用200目筛网过滤细胞,0.1 mol/L的PBS离心洗涤,体积分数70%乙醇固定2 h后,用0.1 mol/L的PBS再次离心洗涤,加入25 mg/L RNA酶,37 °C水浴30 min,加入PI 4 °C避光30 min,流式细胞仪进行细胞周期检测。

免疫细胞化学染色: 取第2代兔牙髓细胞以 $4 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种于35 mm培养皿中,常规培养,待细胞汇合80%后,即用型二步法行Vimentin、CD44、osteonectin、dsp免疫细胞化学染色。

主要观察指标: ①细胞形态变化。②细胞的活率。③细胞克隆形成率。④细胞生长曲线的测定结果。⑤细胞周期的测定结果。⑥兔牙

¹Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Maxillofacial Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Ma Rong★, Studying for master's degree, Physician, Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
pikamei@163.com

Corresponding author: Chief physician, Master's supervisor, Department of Maxillofacial Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
muhtarhoja@yahoo.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960423*

Received: 2012-04-13
Accepted: 2012-05-16

髓细胞免疫细胞化学染色结果。

2 结果

2.1 细胞形态变化 酶解组织块培养的兔牙髓细胞, 在常规培养2 d后可见细胞从组织块中“爬出”, 大多数细胞为成纤维细胞样细胞, 少数为多角形、纺锤状、不规则形或圆形, 体积小, 胞体丰满, 约5 d汇合达到80%~90%, 进行首次传代。见图1, 2。

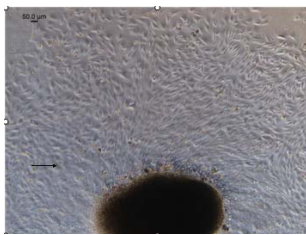


Figure 1 The rabbit dental pulp cells after primary cultured for 5 d (cells separated by enzymatic digestion method, $\times 5$)
图1 兔牙髓细胞原代培养第5天(酶解组织块法游出的细胞, $\times 5$)

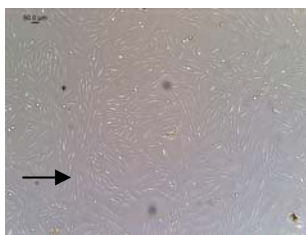


Figure 2 The third generation of rabbit dental pulp cells at 2 d (arrow shows the long spindle shaped dental pulp cells, $\times 5$)
图2 兔牙髓细胞第3代培养第2天(箭头指长梭形牙髓细胞, $\times 5$)

2.2 细胞的活率 为第3~6代细胞活率细胞数比为94.7% : 95.8% : 95.2% : 95.3%。

2.3 细胞克隆形成率 细胞培养5~7 d即可见细胞株形成, 培养14 d细胞的克隆形成率为18个/2 000个细胞。见图3~5。

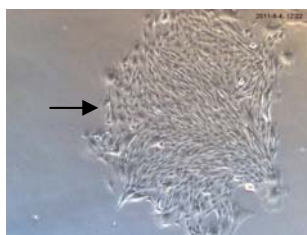


Figure 3 Single clone formation (arrow) after dental pulp cells cultured for 14 d ($\times 5$)
图3 兔牙髓细胞培养14 d后形成的单个克隆团(箭头示, $\times 5$)

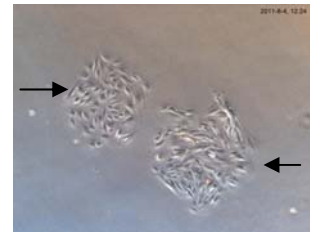


Figure 4 Two clones formed (arrows) after dental pulp cells cultured for 14 d ($\times 5$)
图4 兔牙髓细胞培养14 d后形成的两个克隆团(箭头示, $\times 5$)

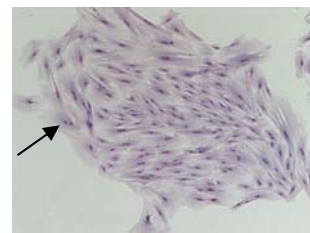


Figure 5 Wright staining of rabbit dental pulp cells after cultured for 14 d, the clone could be seen with clear nucleolus (arrow shows the clear nucleolus of monoclonal group after Wright staining, $\times 5$)
图5 兔牙髓细胞培养14 d 瑞氏染色后(箭头指瑞氏染色后的单个克隆团, 核仁清晰, $\times 5$)

2.4 细胞生长曲线的测定结果 牙髓细胞潜伏期约为4 d, 随后进入对数增长期, 约在第8天细胞达到平台期, 见图6。

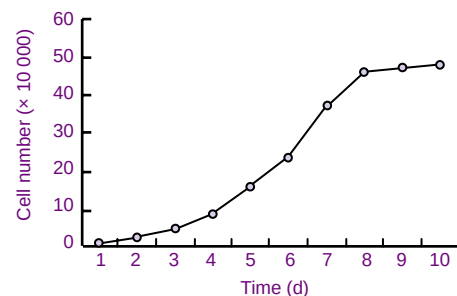


Figure 6 *In vitro* growth curve of rabbit dental pulp cells
图6 兔牙髓细胞体外生长曲线

2.5 细胞周期的测定结果 G_1 期DNA含量占80.4%; G_2 期DNA含量占15.3%; S期DNA含量占4.3%, 见图7。

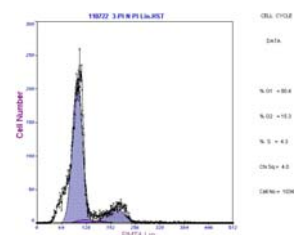


Figure 7 Cell cycle of rabbit dental pulp cells
图7 兔牙髓细胞细胞周期图谱

2.6 兔牙髓细胞免疫细胞化学染色结果 细胞抗 vimentin、cd44、osteonectin、dsp检测均为阳性胞浆中呈棕黄着色。见图8-11。

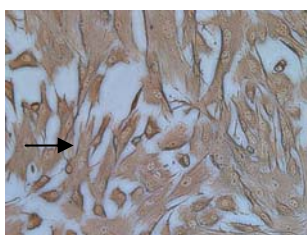


Figure 8 Positive expression (arrow) of vimentin filaments on passage 3 dental pulp cells ($\times 20$)
图 8 第 3 代细胞波形蛋白表达阳性(箭头示, $\times 20$)

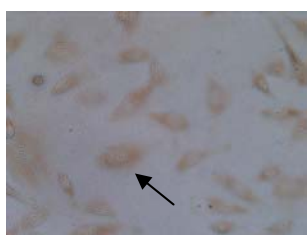


Figure 9 Positive expression (arrow) of CD44 filament on passage 3 dental pulp cells ($\times 20$)
图 9 第 3 代细胞 CD44 表达阳性(箭头示, $\times 20$)

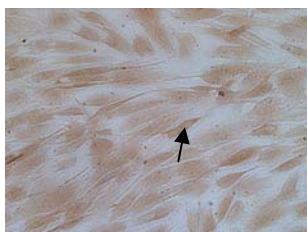


Figure 10 Positive expression (arrow) of osteonectin filament on passage 3 dental pulp cells ($\times 20$)
图 10 第 3 代细胞骨黏素表达阳性(箭头示, $\times 20$)

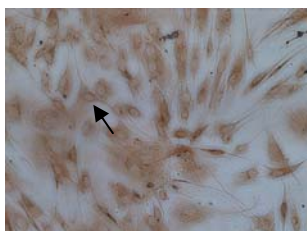


Figure 11 Positive expression (arrow) of dentin sialoprotein on passage 3 dental pulp cells ($\times 20$)
图 11 第 3 代细胞牙本质涎蛋白表达阳性(箭头示, $\times 20$)

3 讨论

牙髓被认为是富含间充质干细胞, 牙髓干细胞具有高度增殖性, 尤其牙髓是可论证的在出生后最容易获得

的干细胞来源。对于组织工程, 牙髓的多分化潜能、高扩增速率和容易获取使牙髓成为引人注目的间充质干细胞来源^[6]。尽管牙髓干细胞已成功的从牙髓组织中用不同方法分离这包括脱落的乳切牙、恒牙、牙胚、多生牙。但是干细胞发源的精确生态龛位仍然不清楚^[7-8]。以往的研究已发现牙髓间充质细胞有分化成为几种谱系细胞的潜能^[9], 包括成牙本质细胞^[10]、神经前体细胞^[11]、成骨细胞^[12]、软骨细胞和脂肪细胞^[13-14], 表明牙髓间充质细胞具有一定的间充质干细胞的分化特征。实验证实兔牙髓间充质细胞具有黏附在塑料培养器皿上的功能, 并且检测其间充质干细胞免疫标记物的表达均为阳性, 证明牙髓源的间充质细胞不仅达到了间充质干细胞的最低标准^[15], 并且扩增后表达部分成牙本质样细胞。

许多研究证明成体干细胞最重要的特征之一是小体积的代表^[16]。文章采用酶解组织块法用于兔牙髓细胞的原代培养。传统的单纯酶消化法培养时尚需接种细胞必须达到一定密度才有利于细胞的自分泌和旁分泌作用充分发挥功效^[1, 17], 但消化的时间通常难以确定, 时间太长对细胞损伤大, 细胞难以成活, 反之, 组织消化不彻底获取的细胞量少, 细胞不易扩增。故实验首先采用消化法将组织块消化达到一定的程度, 再将处理后的组织块培养, 以期提高牙髓间充质细胞的获取数量, 细胞体积小于传统组织块法, 并便于扩增达到实验研究用和将来临床治疗用的细胞数量。实验结果证实: 此方法具有细胞游出时间短、缩短了原代细胞培养时间、原代细胞培养数量扩增比率大的特点。为了明确该方法获取细胞的质量, 实验检测了原代收获的细胞和传代培养细胞的存活率, 分别为94.7%: 95.8%, 95.2%, 95.3%, 表明这种方法获取的细胞存活率高, 可作为推荐的组织中获取细胞的方法。

细胞周期是反映细胞增殖动力学的重要参考指标^[18]。通常认为干细胞的增殖周期慢于短暂增殖细胞, 保持较长时间的静止状态, 但增殖潜能更大, 常在组织再生或损伤时增殖速度提高, 在细胞周期图谱上表现为G₀/G₁期细胞比例较高; 国内学者贺慧霞等报道^[19], 95.7%的人牙髓干细胞处于G₀/G₁期, G₂期占4.3%, S期细胞几乎为零, 表明细胞增殖缓慢, 绝大多数处于静止期。何飞等^[20]报道人DISCs中, 64.1%的细胞处于G₀/G₁期, G₂/M期为15.2%, S期细胞占20.6%。实验结果显示, 细胞的G₀/G₁期占80.4%; G₂期与15.3%; S期占4.3%, 说明兔牙髓间充质细胞具有慢增殖期细胞特性。

实验采用的兔牙髓细胞体外生长至18代, 连续培养时间80 d, 细胞状态良好, 细胞克隆形成率为18个/2 000, 接近国外研究结果。为了明确兔牙髓间充质细

细胞的增殖特性, 实验检测了细胞的生长曲线, 兔牙髓细胞约在第4天进入对数增长期, 第8天进入平台期, 增殖速度减慢, 逐渐维持在相同水平, 计算出群体倍增时间45 h, 基本符合国内外研究水平。

虽然很多信号因子可以诱导牙髓干细胞的分化, 但是牙髓干细胞的原始微环境是非常复杂, 其中包含了許多组成基质、矿物离子和生长因子。一些物理因子(重力, 压力, 创伤)也会影响牙髓干细胞的分化。实验中将兔牙髓细胞进一步进行细胞来源与分化状况的免疫细胞化学检测了结果显示: 间充质来源标记物vimentin、CD44染色强阳性, vimentin显示其间充质来源; CD44通常作为间充质未分化细胞表面相对特异性标志, 提示其具有间充质源性未分化细胞的表型特点。osteonectin是表达于骨基质和牙齿形成阶段中的一种非胶原蛋白, 也是反映成骨细胞活性的敏感指标, 在终末分化之前的成牙本质或成骨细胞中有表达, 当细胞分化形成组织时, 再次表达于形成的尚未矿化的组织中。

实验检测发现兔牙髓细胞具有矿化基质形成细胞的某些表型特点, 但可能尚处于未终末分化阶段。DSP是牙本质特异性蛋白, 是一种与成牙本质细胞相关的糖蛋白。实验检测兔牙髓细胞DSP阳性表达, 提示体外培养的兔牙髓细胞有合成牙本质蛋白的能力。可能已进一步分化为成牙本质样细胞。实验相关结果提示: 兔牙髓细胞可分离培养出干细胞, 并能有效的在体外增殖, 但是与大多数体干细胞一样, 牙髓干细胞尚缺乏特异性标志, 故对其鉴定需要从多方面、用多种方法综合确定。实验仅做了初步鉴定, 而有关其在转化生长因子的诱导下分化潜能的研究及回植入体内的深入研究, 将在后续做进一步的探讨。

4 参考文献

- [1] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(25):13625-13630.
- [2] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):5807-5812.
- [3] Lu Q. Xi'an: disi Junyi Daxue Boshi Xuwei Lunwen. 2002. 陆群. 牙髓干细胞分离培养鉴定和体外诱导分化的研究[D]. 西安: 第四军医大学博士学位论文, 2002.
- [4] Guo HY. Xi'an: disi Junyi Daxue Boshi Xuwei Lunwen. 2002. 郭红延. 大鼠牙髓干细胞的培养鉴定及生物学特性研究[D]. 第四军医大学博士学位论文, 西安: 2004.
- [5] Zheng Y, Wang XY, Zhang CM. *Beijing Kouqiang Yixue*. 2010; 18(3):125-128. 郑颖, 王晓颖, 张春梅. 小型猪乳牙牙髓干细胞体外分离培养及鉴定[J]. *北京口腔医学*, 2010, 18(3):125-128.
- [6] Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. 2011;99(1):1-7.
- [7] Karaoz E, Dogan BN, Aksoy A, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*. 2010;133:95-112.
- [8] Huang AH, Chen YK, Lin LM, et al. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2008;37:571-574.
- [9] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003;18(4):696-704.
- [10] Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*. 2005;321(3):391-400.
- [11] Woodbury D, Schwarz EJ, Prochop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61(4):364-370.
- [12] Gronthos S, Brahimi J, Fisher LW, et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Dent Res*. 2002;81(8):531-535.
- [13] Cui Q, Wang GJ, Balian C. Steroid-induced adipogenesis in a pluripotent cell line from bone marrow. *J Bone Joint Surg*. 1997;79:1054-1063.
- [14] Uchida N. The expected G₀/G₁ cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood*. 1997; 89:465-451.
- [15] Situ Zhenqiang. Xi'an: Sijie Tushu Chubanshe. 2007:68-77. 司徒镇强. 细胞培养[M]. 2版, 西安: 世界图书出版公司, 2007: 68-77.
- [16] Fujimori Y, Izumi K, Feinberg SE, et al. Isolation of small-sized human epidermal progenitor/stem cells by Gravity Assisted Cell Sorting (GACS). *J Dermatol Sci*. 2009;56(3):181-187.
- [17] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4): 315-317.
- [18] Engelhardt M. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*. 1997;90:182.
- [19] He HX. Xi'an: disi Junyi Daxue Boshi Xuwei Lunwen. 2005. 贺慧霞. 牙髓干细胞分离鉴定及其制备组织工程化牙本质牙髓复合体的实验研究[D]. 第四军医大学博士学位论文, 西安: 2005.
- [20] He F, Tan YH, Zhang G, Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi. 2005; 23(1): 75-78. 何飞, 谭颖徽, 张纲. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 国家自然科学基金(30960423)。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。