

儿童乳牙牙髓干细胞顺硬度基质表面延展和向牙本质分化的潜能

李章一¹, 刘凤婷², 黄建永³, 苏小蕾⁴, 王志兴¹, 郑全⁵, 李艳霞⁵, 刘晓智⁵ (天津市第五中心医院, ¹口腔科, ⁵中心实验室, 天津市 300450; ²天津医科大学, 天津市 300070; ³北京大学力学与工程科学系, 北京市 100871; ⁴天津市口腔医院儿童口腔科, 天津市 300041)
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2058 ORCID: 0000-0002-5640-4472(刘晓智)

文章快速阅读:

文章特点一

- (1)来源于儿童自然脱落的乳牙牙髓干细胞较其他源性间充质干细胞具有更易向牙本质分化的天然特性, 是牙组织工程的研究热点;
- (2)体外培养原代人源性乳牙牙髓干细胞, 在 7.68%、30.72%低熔点琼脂糖凝胶制成的中、高等弹性模量介质表面培养, 进行一系列生长与分化指标研究;
- (3)乳牙牙髓干细胞在中、高等弹性模量介质表面培养时具有良好的组织贴附性和组织相容性, 并且可以向成牙本质细胞分化, 克服了以往化学诱导分化的弊端, 这些特质使得基于材料学的牙组织工程研究有了新的发展方向 and 突破, 有望在未来口腔组织工程中发挥重要作用。

李章一, 男, 1979 年生, 安徽省颍上县人, 汉族, 2012 年天津医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔颌面外科诊疗及临床、基础研究。

通讯作者: 刘晓智, 博士, 副主任医师, 天津市第五中心医院中心实验室, 天津市 300450

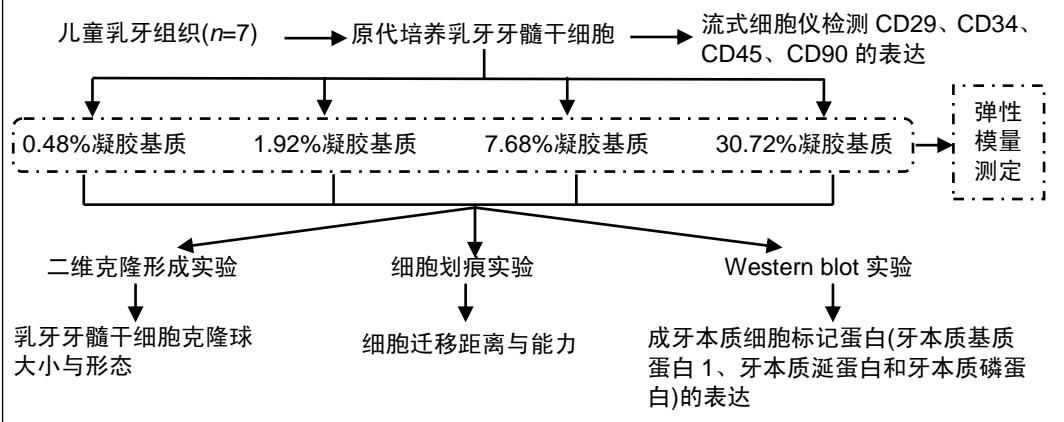
文献标识码:A

来稿日期: 2019-06-06

送审日期: 2019-06-18

采用日期: 2019-10-19

在线日期: 2020-01-17



文题释义:

组织相容性: 是一组被称为人类白细胞抗原(HLA)的基因具有相同或足够相似的等位基因的特性。与整个器官、组织或干细胞移植有关的主题最相关。人类 6 号染色体 6p21.3 处每个 HLA 位点存在大量等位基因, 这些基因是共显性表达的, 意味着每个个体都表达每个遗传的等位基因, 包括父系和母系, 导致每个个体都有不同类型的 MHC 蛋白的混合物。一个人的 HLA 等位基因的相似或差异, 以及 MHC 蛋白与另一个人的相似或不同, 是使组织相容或不相容的原因。

牙髓干细胞: 2000 年 GRONTHOS 等发现一种与骨髓间充质干细胞有着相似的免疫表型及形成矿化结节能力的梭形纤维状细胞。这类细胞可自我更新和多向分化, 并有着较强的克隆能力, 经过不同细胞因子的诱导, 能够分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、血管内皮、肝、神经等细胞系类型, 在牙组织工程中具有重要研究价值。

摘要

背景: 牙髓干细胞在适宜诱导条件下能够向牙本质分化, 是牙齿组织工程的重要种子细胞。然而, 以往所使用的诱导剂多为化学制剂, 不利于体内应用。近来有报道称间充质干细胞能够顺材质硬度分化, 这种由物理特性诱导的细胞分化研究报道较少。

目的: 观察人源性乳牙牙髓干细胞在硬介质表面的延展特点及向牙本质分化潜能, 为牙组织工程提供参考。

方法: 原代分离培养和鉴定儿童自然脱落的乳牙牙髓干细胞; 使用低熔点琼脂糖配制弹性模量为(9.12±0.94), (27.18±3.55), (59.37±4.05)和(86.45±5.33) kPa 4 个梯度的固体凝胶基质, 二维克隆形成实验和划痕实验检测第 4 代乳牙牙髓干细胞在上述硬基质表面的延展能力, Western blot 方法检测牙本质基质蛋白 1、牙本质磷蛋白、牙本质涎蛋白的表达。

结果与结论: 当人乳牙牙髓干细胞接种于极低和低等硬度凝胶介质表面时, 乳牙牙髓干细胞几乎均以边缘整齐的细胞克隆存在, 很少见细胞平铺和延展现象; 但是当将其接种于中等和高等硬度凝胶介质表面时, 乳牙牙髓干细胞克隆边缘则表现出明显的平铺和延展, 表现为细胞胞体变大, 细胞边缘外伸明显。相似的现象也经细胞划痕实验所验证。人源性乳牙牙髓干细胞在中等和高等弹性模量介质表面培养时, 表达较高水平的牙本质基质蛋白 1、牙本质磷蛋白、牙本质涎蛋白。结果表明, 人源性乳牙牙髓干细胞随着培养基质硬度的增加其延展性及成牙本质分化能力逐渐增强, 为未来牙组织工程提供方法借鉴。

关键词:

牙髓干细胞; 牙本质; 细胞迁移; 细胞分化; 牙本质基质蛋白 1; 牙本质磷蛋白; 牙本质涎蛋白

中图分类号: R459.9; R394.2; R788

Li Zhangyi, Master, Associate chief physician, Department of Stomatology, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China

Corresponding author: Liu Xiaozhi, MD, Associate chief physician, Central Laboratory, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China

基金资助:

天津市卫生和计划生育委员会科技基金项目(2014KY23), 项目负责人: 苏小蕾; 天津滨海新区卫生和计划生育委员会科技基金项目(2015BWKY003), 项目负责人: 李章一

Extension and dentin differentiation potential of dental pulp stem cells from human deciduous teeth on the stiff matrix surface

Li Zhangyi¹, Liu Fengting², Huang Jianyong³, Su Xiaoying⁴, Wang Zhixing¹, Zheng Quan⁵, Li Yanxia⁵, Liu Xiaozhi⁵ (¹Department of Stomatology, ⁵Central Laboratory, the Fifth Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China; ²Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; ³Department of Mechanics and Engineering Science, Peking University, Beijing 100871, China; ⁴Department of Pediatric Stomatology, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China)

Abstract

BACKGROUND: Dental pulp stem cells can differentiate into dentin under appropriate induction conditions, which are important seed cells in dental tissue engineering. However, the commonly used inducers are chemical agents, which are not available for *in vivo* application.

Mesenchymal stem cells can differentiate with the material hardness, and the physical property-induced cell differentiation is little reported.

OBJECTIVE: To observe the extension characteristics and dentin differentiation potential of dental pulp stem cells from human deciduous teeth on the stiff matrix surface.

METHODS: Dental pulp stem cells from naturally shed deciduous teeth were isolated, cultured and identified. Four solid gel matrixes with elasticity modulus of (9.12±0.94), (27.18±3.55), (59.37±4.05) and (86.45±5.33) kPa were made using low melting point agarose. The extension ability of passage 4 dental pulp stem cells on the surface of the above solid matrixes was detected by two-dimensional clone formation and cell scratch tests. The protein expression levels of dentin matrix protein-1, dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein were detected by western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: Dental pulp stem cells from human deciduous teeth seeded on the gel matrix with extremely low and low hardness almost existed as cell clones with neat edges, and cell spreading and extension were rare. When seeded on the gel matrix with moderate and high hardness, the cloned edge of deciduous dental pulp stem cells spread and extended obviously. The cell body became large and the cell edge extended significantly. The cell scratch test revealed the similar phenomenon. When seeded on the gel matrix with moderate and high hardness, dental pulp stem cells from human deciduous teeth exhibited high expression levels of dentin matrix protein-1, dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein. In summary, with the increase of matrix hardness, the abilities of extension and differentiation into dentin of dental pulp stem cells from human deciduous teeth are increased gradually, which provides a method for dental tissue engineering.

Key words: dental pulp stem cells; dentin; cell metastasis; cell differentiation; dentin matrix protein-1; dentin phosphoprotein; dentin sialoprotein

Funding: the Science and Technology Foundation of Tianjin Health and Family Planning Commission, No. 2014KY23 (to SXY); the Science and Technology Foundation of Health and Family Planning Commission of Tianjin Binhai New Area, No. 2015BWKY003 (to LZ)

0 引言 Introduction

来源于骨髓、脂肪和脐带的间充质干细胞在适宜诱导条件下能够分化为神经样细胞、平滑肌细胞、软骨细胞和骨细胞, 被称为机体组织器官修复的“多能种子”^[1-3]。近年来有研究报道, 来源于儿童自然脱落的乳牙牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)较前述组织源性间充质干细胞具有更易向牙本质分化的天然特性^[4-5], 是牙组织工程的研究热点。以往各实验室将乳牙牙髓干细胞向牙本质细胞诱导分化的方法多采用化学诱导方式^[6-8], 该方式势必会改变乳牙牙髓干细胞的诸多天然特性, 甚至使其具有致癌潜能^[9-10]。研究表明, 基质硬度以及细胞所受的外力等力学因素能调控干细胞的生长、迁移及分化^[11-12]; 基质硬度能控制间充质干细胞的命运^[13], TSE等^[14]通过模拟不同硬度的培养基体外培养间充质干细胞, 观察各种条件下细胞的分化情况, 结果发现培养基弹性越接近大脑组织(0.1-1 kPa), 大多数细胞向神经样细胞分化, 随着基质硬度的增加, 则更多细胞向脂肪细胞或骨细胞分化。作者前期工作中发现, 脐带间充质干细胞具有顺培养基硬度向多种组织细胞分化的能力^[15], 但是乳牙牙髓干细胞是否具有相似的特性至今罕见报道。该研究将尝试观察乳牙牙髓干细

胞在不同硬度介质表面的延展特性和向牙本质的分化潜能, 以期为未来牙组织工程提供方法借鉴和参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年10月至2018年12月在天津市第五中心医院中心实验室完成。

1.3 材料 2017年6月至2017年9月天津市第五中心医院口腔科收治的5-7岁儿童自然脱落的乳牙7例(经家属知情同意开展相关研究); DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibco公司); 低熔点琼脂糖(北京中山公司); 异硫氰酸荧光素(Fluorescein fluorescein, FITC)标记的抗人CD29、CD34、CD45和CD90抗体, 兔抗人牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1, DMP1)、牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)和牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)抗体(美国Abcam公司); 流式细胞检测由国家纳米技术与工程研究院完成。

1.4 实验方法

1.4.1 乳牙牙髓干细胞提取、培养与鉴定 所有乳牙在脱落前无牙髓、牙冠及牙龈炎症, 用4 °C预冷的含有1%青/

链霉素双抗的PBS浸洗3次,每次5 min;置于无菌超净台上,使用无菌手术器械将牙髓组织充分暴露、剥离取出,无菌眼科剪剪成约1 mm×1 mm×1 mm的立方组织块,用I型胶原酶于37 °C充分消化约10 min,轻柔吹打、离散组织团块,1 000 r/min离心5 min, PBS重悬后再次离心终止消化,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液重悬,调整细胞密度为 5×10^5 /孔。将上述细胞悬液接种于6孔板,37 °C、体积分数为5%CO₂条件下培养,每3 d半量换液,弃去未贴壁细胞,当细胞融合至85%–90%,按1:2比例进行传代。流式细胞仪检测第3代乳牙牙髓干细胞CD29、CD34、CD45和CD90表面标记蛋白的表达,具体方法参见文献[16],上述CD29、CD34、CD45和CD90抗体稀释度分别为1:200、1:250、1:100和1:200。

乳牙牙髓干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	儿童乳牙牙髓组织
原代培养方法:	酶消化法
基础培养基:	DMEM 高糖培养液
添加材料:	体积分数为10%胎牛血清、青霉素、链霉素
原代培养时间:	第3天半量换液,以后每3 d半量换液,第14天首次传代
细胞传代:	细胞融合至85%–90%用0.25%胰酶消化按1:2比例传至下1代,随后每四五天传1代,培养至第3–5代用于实验
细胞鉴定:	流式细胞术鉴定
伦理学批准:	该研究的实施符合天津市第五中心医院的相关伦理要求(医院伦理批件号TJWZXLL2015012)

1.4.2 凝胶基质的配制及弹性模量的测定 取10 mL含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基分别加入3.072, 0.768, 0.192, 0.048 g低熔点琼脂糖,充分混匀,配制成30.72%、7.68%、1.92%和0.48% 4种硬度梯度凝胶基质,储存备用。使用前酒精灯加温融化至液态再冷却至37–39 °C后凝固,测定凝胶弹性模量。由北京大学力学与工程科学系完成弹性模量的测定。

1.4.3 二维克隆形成实验 在6孔板中预先铺置上述4种硬度梯度的凝胶基质,将培养至第4代的乳牙牙髓干细胞经胰酶充分消化及机械吹打至单细胞悬液,以每孔50–100个细胞密度分别接种于上述4种凝胶基质表面,于第7天在倒置显微镜下观察细胞团块向边缘延展情况。

1.4.4 细胞划痕实验 同样方式在6孔板中制备4种硬度梯度的凝胶基质,将第4代乳牙牙髓干细胞接种于凝胶基质表面,待细胞融合度达90%时,使用10 μ L枪头尖端进行细胞划痕实验,于倒置显微镜下测量并记录,划痕两侧细胞初始距离为S₀,72 h后再测量两侧细胞间距离为S₁,实际细胞迁移距离即为S₀–S₁。

1.4.5 Western blot实验 将第4代乳牙牙髓干细胞接种于4种硬度梯度的凝胶基质表面,培养72 h后以0.25%胰酶

消化,加入RIPA裂解液进行细胞总蛋白的提取,Bradford法对蛋白定量并调整统一浓度后进行电泳(选用8%分离胶),冰浴湿转法电压120 V条件下转膜60 min,5%脱脂奶粉(TBST配制)封闭60 min,兔抗人牙本质基质蛋白1(1:2 000)、牙本质涎蛋白(1:500)和牙本质磷蛋白抗体(1:400)4 °C水平摇床孵育过夜,次日TBST清洗10 min,共3次,二抗(1:500)孵育1 h, TBST清洗10 min,共3次,超信号蛋白检测试剂盒按1:1比例配制,避光条件下孵育3–5 min,凝胶成像系统扫描灰度值,以 β -actin为内参,采用Quantity One软件根据灰度值进行定量分析。

1.5 主要观察指标 ①原代培养的乳牙牙髓干细胞形态;②乳牙牙髓干细胞表面标记蛋白CD29、CD34、CD45、CD90的表达;③乳牙牙髓干细胞在梯度硬度凝胶表面的克隆成球能力;④乳牙牙髓干细胞在梯度硬度凝胶表面的迁移距离;⑤梯度硬度凝胶表面成牙本质细胞标记蛋白的表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用t检验,多组间数据比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 乳牙牙髓干细胞的形态 混合细胞接种后4 h可见少量细胞出现贴壁现象,见图1A;24 h可见细胞呈纺锤形或长梭形生长,72 h后可见细胞呈小集落生长现象,见图1B;随时间延长,细胞集落具有逐渐扩大生长趋势,8–12 d可见成片细胞呈铺路石样或巢样生长,见图1C;第14天可进行首次细胞传代,每四五天进行1次传代。

2.2 流式细胞术鉴定表面标记蛋白表达 通过流式细胞术对第3代乳牙牙髓干细胞进行细胞标记物鉴定,结果显示CD29、CD90阳性表达率分别为96.17%, 97.14%,而CD34、CD45的阳性表达率分别为4.01%, 4.38%,见图2,符合间充质干细胞鉴定标准,且纯度高于95%,符合实验需求。

2.3 凝胶弹性模量测定结果 0.48%, 1.92%, 7.68%和30.72% 4个梯度浓度琼脂糖凝胶对应的弹性模量分别为(9.12 \pm 0.94), (27.18 \pm 3.55), (59.37 \pm 4.05)和(86.45 \pm 5.33) kPa,琼脂糖凝胶的弹性模量与其浓度间呈指数曲线关系,见图3。

2.4 二维细胞延展实验结果 当乳牙牙髓干细胞培养在极低弹性模量[(9.12 \pm 0.94) kPa]和低弹性模量[(27.18 \pm 3.55) kPa]凝胶表面时,其克隆球边缘几乎很少见到细胞延展现象;随着凝胶弹性模量增加,克隆球边缘细胞延展现象逐渐增加;当乳牙牙髓干细胞培养在高弹性模量[(86.45 \pm 5.33) kPa]凝胶表面时,其克隆球边缘可见到大量细胞延展现象,表现为细胞二维面积变大,细胞长轴变长,见图4。

2.5 细胞划痕实验结果 乳牙牙髓干细胞在极低弹性模

量凝胶表面时, 其迁移距离较短, 仅为 $(17.41 \pm 5.11) \mu\text{m}$; 在低弹性模量凝胶表面时, 其迁移距离为 $(21.37 \pm 3.35) \mu\text{m}$; 在中等弹性模量凝胶表面时, 其迁移距离为 $(27.57 \pm 5.47) \mu\text{m}$; 在高弹性模量凝胶表面时, 其迁移距离为 $(36.06 \pm 5.39) \mu\text{m}$, 见图5。4组间比较差异有显著性意义($P=0.012 < 0.05$)。

2.6 Western blot检测成牙本质细胞标记蛋白的表达 乳牙牙髓干细胞在低弹性模量凝胶表面时, 没有成牙本质细胞标记蛋白(牙本质基质蛋白1、牙本质涎蛋白和牙本质磷蛋白)的表达; 当将其培养于中等弹性模量凝胶基质表面时, 开始有一定水平的成牙本质细胞标记蛋白(牙本质基质蛋白1、牙本质涎蛋白和牙本质磷蛋白)的表达; 当将其培养于高弹性模量凝胶基质表面时, 则表达较高水平的成牙本质细胞标记蛋白(牙本质基质蛋白1、牙本质涎蛋白和牙本质磷蛋白), 见图6。

3 讨论 Discussion

应用于牙组织工程的理想种子细胞应具备易于向牙本质分化^[17]、无或低免疫原性^[18]、无致瘤性^[19], 具有天然的组织贴附和延展性以及良好的组织相容性等特点^[20-21]。传统的骨髓、脂肪和脐带源性间充质干细胞虽然具有一定的成牙本质分化潜能, 但其诱导方法复杂, 诱导剂多采用毒副作用较大的化学性制剂^[22-24], 且最终分化为牙本质的细胞仅停留在特定标志蛋白的表达, 而无真正意义上的功能执行能力^[25-26]。乳牙牙髓干细胞是一种可取材于临床拔除的废弃牙髓组织, 特别是儿童时期自然脱落的乳牙牙髓组织存在天然牙本质前体细胞^[27-28]。理论上来自于儿童期自然脱落的乳牙牙髓干细胞可于超低温情况下保存数十年之久, 从根本上避免了伦理学限制, 自体移植后几乎无免疫原性, 成为储存者终身受益的潜在保障^[29-30]。因此, 能否寻找到一种全新的诱导方式, 使其降低甚至避免化学诱导剂高毒副作用的同时兼具良好的牙体组织延展性和组织相容性意义非常。

作者在前期工作中利用低熔点琼脂糖与DMEM培养基按不同比例混合, 配制成具有不同弹性模量的培养基, 弹性模量介于 $0.1-1 \text{ kPa}$ 之间可模拟脑组织弹性模量, 介于 $8-17 \text{ kPa}$ 之间可模拟平滑肌组织, 弹性模量介于 $25-40 \text{ kPa}$ 之间可模拟筋膜组织, 弹性模量介于 $50-75 \text{ kPa}$ 之间可模拟软骨组织, 弹性模量介于 $75-100 \text{ kPa}$ 之间可模拟骨组织, 研究在上述密度基质中脐带间充质干细胞的细胞分化特征。结果发现, 脐带间充质干细胞具有明显的顺培养基硬度分化的特点, 即在相似硬度的介质表面脐带间充质干细胞能够分别表达脑、平滑肌、筋膜、软骨和骨组织特征性标志蛋白^[12]。因此作者推测人源性乳牙牙髓干细胞可能具有相类似的顺培养基硬度分化的特性。如果该推论成立, 将能够极大地拓展牙组织工程领域的相关研究; 该研究针对人源性乳牙牙髓干细胞在不同弹性模具中展开研

究, 得出了相似的结论。

该研究首先成功从儿童自然脱落的乳牙牙髓中提取得到乳牙牙髓干细胞, 经流式细胞术鉴定第4代细胞为高纯度($>95\%$)的乳牙牙髓干细胞, 然后构建了4个弹性模量梯度的凝胶基质, 分别代表极低硬度、低等硬度、中等硬度和高等硬度4种介质。当将人乳牙牙髓干细胞接种于极低和低等硬度凝胶介质表面时, 乳牙牙髓干细胞几乎均以边缘整齐的细胞克隆存在, 很少见细胞平铺和延展现象; 但是当将其接种于中等和高等硬度凝胶介质表面时, 乳牙牙髓干细胞克隆边缘则表现出明显的平铺和延展, 表现为细胞胞体变大, 细胞边缘外伸明显。相似的现象也经细胞划痕实验所验证。上述结果提示, 人源性乳牙牙髓干细胞在上述中等、高等弹性介质中具有良好的组织贴附性和组织相容性。

该研究检测了在不同硬度介质表面贴附后人源性乳牙牙髓干细胞向成牙本质细胞分化的潜能。结果发现, 乳牙牙髓干细胞在极低和低等硬度凝胶介质表面时几乎不表达牙本质细胞标记蛋白(牙本质基质蛋白1、牙本质涎蛋白和牙本质磷蛋白); 但当其被接种于中等硬度, 特别是高等硬度的凝胶介质表面时, 人乳牙牙髓干细胞开始表达较高水平的牙本质细胞标记蛋白。该结果提示, 人源性乳牙牙髓干细胞具有天然的顺贴附介质硬度分化的特性, 而这一特性可以有效避免传统化学诱导剂的致毒性和致畸性。

总之, 该研究发现了人源性乳牙牙髓干细胞在 7.68% 、 30.72% 浓度的低熔点琼脂糖胶制成的中等和高等弹性模量介质[弹性模量分别为 $(59.37 \pm 4.05) \text{ kPa}$ 和 $(86.45 \pm 5.33) \text{ kPa}$]表面培养时, 具有良好的组织贴附性和组织相容性, 并且具有向成牙本质细胞分化的潜能, 这些特质使得基于材料学的牙组织工程研究有了新的发展方向 and 突破, 有望在未来口腔组织工程中发挥重要作用。

作者贡献: 实验设计为刘晓智和王志兴, 实验实施为李章一、刘凤婷和黄建永, 实验评估为苏小莹, 资料收集为郑全和李艳霞。

经费支持: 该文章接受了“天津市卫生和计划生育委员会科技基金项目(2014KY23)”“天津滨海新区卫生和计划生育委员会科技基金项目(2015BWKY003)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合天津市第五中心医院的相关伦理要求(医院伦理批件号 TJWZXLL2015012)。

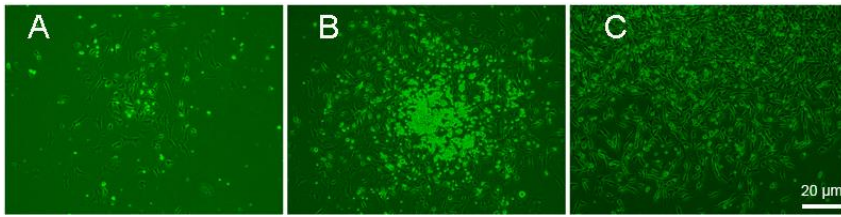
知情同意问题: 实验所用乳牙组织来源于 2017 年 6 月至 2017 年 9 月天津市第五中心医院口腔科收治的 5-7 岁儿童自然脱落的乳牙, 经家属知情同意开展相关研究。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过天津市第五中心医院生物统计学专家审核。



图注: 图中 A-C 分别为培养 4 h, 72 h 和 10 d
图 1 原代培养的乳牙牙髓干细胞形态
Figure 1 Morphology of primary cultured dental pulp stem cells from human deciduous teeth

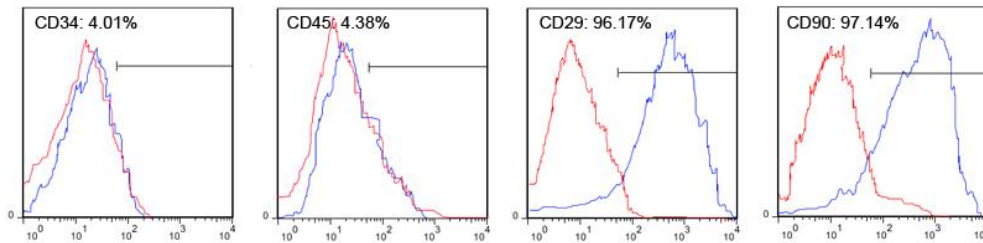


图 2 流式细胞术鉴定乳牙牙髓干细胞表面标记蛋白的表达
Figure 2 Expression of surface marker proteins in dental pulp stem cells from human deciduous teeth identified by flow cytometry

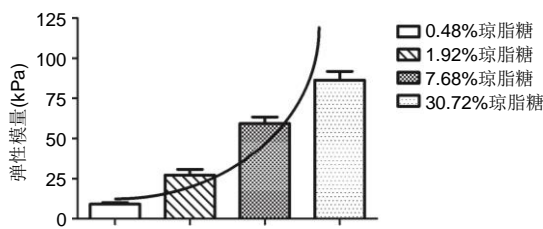
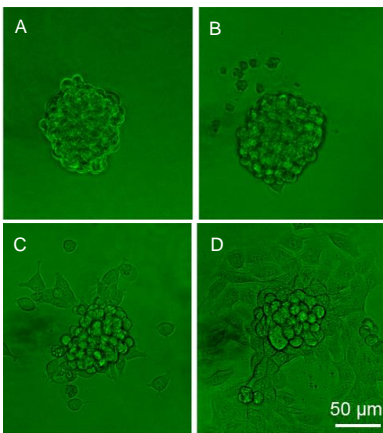


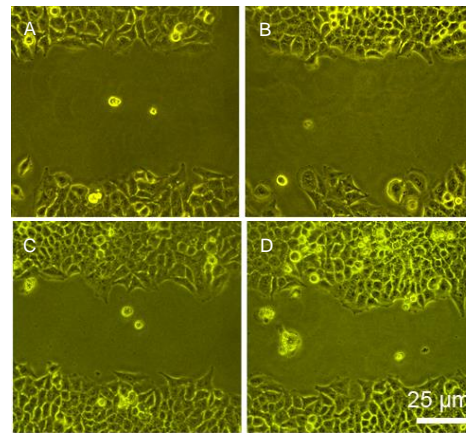
图 3 不同浓度琼脂糖凝胶的弹性模量
Figure 3 Elastic modulus of different concentrations of agarose gel



图注: 图中 A-D 分别为 0.48%、1.92%、7.68%和 30.72%4 个梯度浓度琼脂糖凝胶表面细胞生长情况

图 4 二维细胞延展实验检测乳牙牙髓干细胞在梯度硬度凝胶表面的生长能力(标尺为 50 μm)

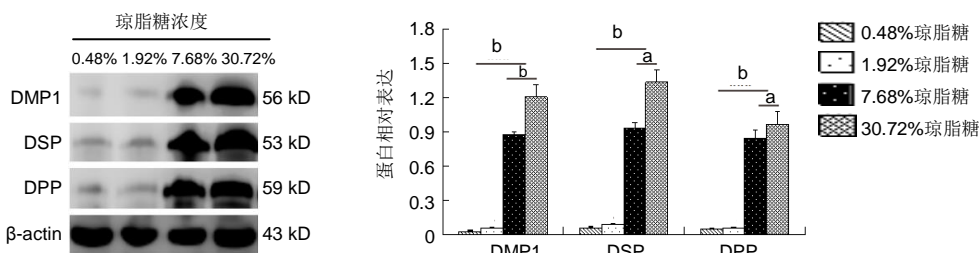
Figure 4 Growth ability of dental pulp stem cells from human deciduous teeth on the surface of gradient hardness gel detected by two-dimensional cell extension assay (scale bar: 50 μm)



图注: 图中 A-D 分别为 0.48%、1.92%、7.68%和 30.72%4 个梯度浓度琼脂糖凝胶表面细胞迁移能力

图 5 细胞划痕实验检测乳牙牙髓干细胞在梯度硬度凝胶表面的迁移能力(标尺为 25 μm)

Figure 5 Migration ability of dental pulp stem cells from human deciduous teeth on the surface of gradient hardness gel detected by cell scratch assay (scale bar: 25 μm)



图注: 图中 A 为成牙本质细胞标记蛋白电泳图; B 为成牙本质细胞标记蛋白柱形图, ^aP < 0.01, ^bP < 0.001. DMP1: 人牙本质基质蛋白 1; DSP: 牙本质涎蛋白; DPP: 牙本质磷蛋白

图 6 Western blot 检测各组乳牙牙髓干细胞的成牙本质细胞标记蛋白表达

Figure 6 Expression of protein markers of odontoblasts of dental pulp stem cells from human deciduous teeth on the surface of gradient hardness gel detected by western blot assay

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] WILLIAMS AR, HARE JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011;109(8): 923-940.
- [2] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9): 726-736.
- [3] KUO CK, TUAN RS. Tissue engineering with mesenchymal stem cells. *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2003;22(5):51-56.
- [4] ZHANG YD, CHEN Z, SONG YQ, et al. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005;15(5):301-316.
- [5] VICTOR AK, REITER LT. Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Hum Mol Genet.* 2017;26(R2): R166-R171.
- [6] WANG X, WU TT, JIANG L, et al. Deferoxamine-Induced Migration and Odontoblast Differentiation via ROS-Dependent Autophagy in Dental Pulp Stem Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(6):2535-2547.
- [7] HASTURK O, ERMIS M, DEMIRCI U, et al. Square prism micropillars on poly(methyl methacrylate) surfaces modulate the morphology and differentiation of human dental pulp mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019; 178:44-55.
- [8] OSATHANON T, SAWANGMAKE C, NOWWAROTE N, et al. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis.* 2014;20(4): 352-358.
- [9] KRIFKA S, SPAGNUOLO G, SCHMALZ G, et al. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 2013; 34(19):4555-4563.
- [10] NUTI N, CORALLO C, CHAN BM, et al. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev Rep.* 2016;12(5):511-523.
- [11] MAO AS, SHIN JW, MOONEY DJ. Effects of substrate stiffness and cell-cell contact on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials.* 2016;98:184-191.
- [12] LIN X, SHI Y, CAO Y, et al. Recent progress in stem cell differentiation directed by material and mechanical cues. *Biomed Mater.* 2016;11(1):014109.
- [13] JIANG L, SUN Z, CHEN X, et al. Cells Sensing Mechanical Cues: Stiffness Influences the Lifetime of Cell-Extracellular Matrix Interactions by Affecting the Loading Rate. *ACS Nano.* 2016;10(1):207-217.
- [14] TSE JR, ENGLER AJ. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One.* 2011;6(1):e15978.
- [15] 刘晓智,刘振林,姜忠敏,等.不同物理密度介质诱导干细胞表达多种组织细胞标记蛋白[J].中华实验外科杂志,2012,29(2):341.
- [16] 刘晓智.蛋白质SUMO化修饰在低温与高热应激条件下的细胞保护功能研究[D].天津:天津医科大学,2017.
- [17] GRAZIANO A, D'AQUINO R, LAINO G, et al. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4(1):21-26.
- [18] GU L, SHAN T, MA YX, et al. Novel Biomedical Applications of Crosslinked Collagen. *Trends Biotechnol.* 2019;37(5): 464-491.
- [19] SULIMAN S, MUSTAFA K, KRUEGER A, et al. Nanodiamond modified copolymer scaffolds affects tumour progression of early neoplastic oral keratinocytes. *Biomaterials.* 2016;95: 11-21.
- [20] LI G, ZHOU T, LIN S, et al. Nanomaterials for Craniofacial and Dental Tissue Engineering. *J Dent Res.* 2017;96(7):725-732.
- [21] TAN J, XU X, LIN J, et al. Dental Stem Cell in Tooth Development and Advances of Adult Dental Stem Cell in Regenerative Therapies. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2015; 10(5): 375-383.
- [22] BIANCO P."Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:677-704.
- [23] ANKRUM JA, ONG JF, KARP JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol.* 2014;32(3):252-260.
- [24] UCCELLI A, MORETTA L, PISTOIA V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9): 726-736.
- [25] FIORE EJ, DOMÍNGUEZ LM, BAYO J, et al. Taking advantage of the potential of mesenchymal stromal cells in liver regeneration: Cells and extracellular vesicles as therapeutic strategies. *World J Gastroenterol.* 2018;24(23): 2427-2440.
- [26] MURAKAMI M, HAYASHI Y, IOHARA K, et al. Trophic Effects and Regenerative Potential of Mobilized Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow and Adipose Tissue as Alternative Cell Sources for Pulp/Dentin Regeneration. *Cell Transplant.* 2015;24(9):1753-1765.
- [27] ZHANG W, YANG G, WANG X, et al. Magnetically Controlled Growth-Factor-Immobilized Multilayer Cell Sheets for Complex Tissue Regeneration. *Adv Mater.* 2017;29(43): 1703795.
- [28] VINING KH, SCHERBA JC, BEVER AM, et al. Synthetic Light-Curable Polymeric Materials Provide a Supportive Niche for Dental Pulp Stem Cells. *Adv Mater.* 2018;30(4).
- [29] BOTELHO J, CAVACAS MA, MACHADO V, et al. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Med.* 2017;49(8):644-651.
- [30] XUAN K, LI B, GUO H, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med.* 2018;10(455):eaaf3227.