

体外组织培养模式的构建及转化生长因子促进 牙髓细胞向成牙本质细胞诱导分化的研究*

聂鑫^{1,2}, 金岩³, 龙洁^{1,4}, 吴凌^{1,4}, 敬伟^{1,4}, 林云锋^{1,4}, 田卫东^{1,4△}

1. 四川大学华西口腔医院 口腔疾病研究国家重点实验室(成都 610041); 2. 第三军医大学大坪医院 颌面外科;

3. 第四军医大学秦都口腔医学院 组织工程研发中心; 4. 四川大学华西口腔医院 颌面整形外科

【摘要】 目的 通过构建体外组织培养模式,观察牙髓细胞向成牙本质细胞诱导分化的潜力及转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的促进作用。方法 获取人第三磨牙牙髓组织,剪碎后与牙本质陶瓷粉(CDP)及 $2 \mu\text{g/mL}$ TGF- $\beta 1$ 混合,将混合物以骨基质明胶(BMG)为载体构建牙髓组织培养模型,在培养 3、7、14 和 21 d 后,通过 HE 和组织特异性染色鉴定有无骨-牙本质基质成分形成,免疫组化检测细胞有无牙本质特异性蛋白——牙本质涎蛋白(DSP)的表达。结果 牙髓组织经 TGF- $\beta 1$ 诱导培养后可进一步矿化,甲苯胺蓝和 Mallory 染色表明在牙髓组织的中心出现骨-牙本质样基质的沉积,免疫组化检测牙髓细胞开始出现 DSP 的表达。结论 成功构建体外牙髓组织培养模型,该模型能维持牙髓细胞的生长和存活,可用于体外对牙髓细胞的诱导分化观察;该模型模式下 TGF- $\beta 1$ 可明显促进牙髓细胞向成牙本质细胞的分化诱导潜能。

【关键词】 器官培养 牙髓细胞 生长因子 骨-牙本质基质**【中图分类号】** R394.2

Construction of Tissue Culture Model *in vitro* and Investigation of Transforming Growth Factor Promoting Pulp Fibroblast to Differentiate into the Odontoblast NIE Xin, JIN Yan, LONG Jie, WU Ling, JING Wei, LIN Yun-feng, TIAN Wei-dong[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Stomatological Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 **Objective** To construct the tissue culture model *in vitro*, and investigate the potential of dental pulp fibroblast differentiating into the odontoblast and the promoting role of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) on it. **Methods** Human pulps were cultured for 3, 7, 14 and 21 days on bone matrix gelatin (BMG) in DMEM cultural medium supplemented with TGF- $\beta 1$. The characteristics of matrix were studied through toluidine blue and Mallory stain. Meanwhile, the expression of dentin salivary protein (DSP) on the pulp cells was investigated with immunohistochemical staining. **Results** This experiment found that the pulp tissue *in vitro* were able to develop into more progressive stage, and some pulp fibroblast cells to differentiate into odontoblast-like cells. Toluidine blue and Mallory staining analysis revealed the localized deposition of mineralized bone-dentin matrix that was detected at the site of dental pulp cells. Immunohistochemical analysis proved that the DSP synthesized in these cells with the presence of TGF- $\beta 1$. **Conclusion** The results demonstrate that this culture condition can maintain the phenotype of human pulp tissue. The model of organ culture is suitable to study the development of pulp tissue *in vitro*. TGF- $\beta 1$ can promote the potential of pulp cell into odontoblast, which provides an academic basis for tooth repair and regeneration.

【Key words】 Organ culture Pulp fibroblast Transforming growth factors Bone-dentin matrix

研究表明,转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 在牙齿发育和牙髓损伤修复过程中发挥重要功能,能促进体外培养的人牙髓细胞的增殖、游走和基质的分泌^[1,2],同时可影响牙髓细胞碱性磷酸酶的表达,在牙本质形成期以旁分泌和自分泌的形式调控成牙本质细胞的分化^[3]。但这些研究主要是通过体外常规细胞培养技术来模拟体内环境,且牙髓细胞是沿一个平面生长。这种模式不利于细胞形态和功能的展现,也影响了组织结构的完整性及细胞间的相互调控。因此,本研究通过

组织培养的方法模拟体内环境,检测了 TGF- $\beta 1$ 对牙髓成纤维细胞的分化诱导潜能。

1 材料与方法

1.1 材料

I 型胶原酶(GIBCO,美国);DMEM 培养基(GIBCO,美国);小牛血清(郑州佰安);TGF- $\beta 1$ (Sigma,美国);牙本质涎蛋白(dentin salivary proteins, DSP)抗体(第四军医大学组织工程中心惠赠);ABC 免疫组化试剂盒(DAKO,美国);牙本质陶瓷粉(ceramic dentine powder, CDP)由新西兰兔牙本质经去脂、去蛋白,800 °C 煅烧而成;骨基质明胶(bone matrix gelatin, BMG)由 SD 大鼠的股骨干经氯仿/甲醇脱脂,0.4 mol/L HCL 脱钙,用盐

* 国家自然科学基金(批准号 30471904)、中国博士后科学基金(20060391019)和教育部重点研究项目(106134)资助

△ Corresponding author, E-mail: dtrwd@sina.com

酸胍充分浸泡以去除活性因子后制作为半圆形。

1.2 牙髓组织的组织培养模式

取拔除的人第三磨牙,剪去残余组织,取出牙髓组织并在超净台内用PBS冲洗4~5次,0.25%胰蛋白酶消化10 min,用PBS冲洗4~5次,剪成约1 mm³大小。将10 mg CDP、2 μg/mL TGF-β1与牙髓组织混合(TGF-β1组),然后将混合物置于BMG的凹面,并一起放在6孔培养皿内的不锈钢网支架上。用含10%胎牛血清的完全DMEM培养液在孵箱内培养,隔日换液。对照组采用DMEM培养液代替TGF-β1进行混合。

1.3 观察指标

将组织培养的次日定为第1 d,分别于第3 d、7 d、14 d及21 d取标本固定于40 g/L多聚甲醛,常规脱钙、石蜡包埋、切片,片厚5 μm,分别进行HE染色、甲苯胺蓝染色、Mallory三色法染色进行组织学观察和ABC免疫组织化学分析。

1.3.1 组织学观察 甲苯胺蓝染色及Mallory三色法染色参照文献^[3]。甲苯胺蓝染色:BMG主要为胶原基质组成,与苯胺蓝结合后为深蓝色,骨和牙本质基质具有一定的异质性,可出现紫兰色改变。Mallory三色法染色:BMG为深蓝色,细胞核与酸性复红结合为鲜红色,骨-牙本质样物质含有大量的骨胶原和糖蛋白,两者与苯胺蓝-橘黄结合为淡蓝色,牙髓基质为粉红或橘红色。显色满意后梯度乙醇系列脱水,二甲苯透明,树胶封片。

1.3.2 免疫组化分析 实验步骤按试剂盒说明书进行。一抗滴度为1:100。用0.01 mol/L PBS缓冲液替代一抗为阴性对照。细胞内出现棕黄色颗粒表示有DSP阳性表达。

2 结果

2.1 HE染色结果

培养后第3 d,可见BMG为嗜伊红的均质状组织,无细胞结构。CDP为蜂窝状,细胞间胞外基质分泌增多。培养后第7 d,部分牙髓细胞数量增多并聚集在一起,细胞体积增加,胞核变大;牙本质样均质状物质增多,其间可见稀疏分布的圆形、梭形细胞。培养第14、21 d,牙髓组织可分为两部分:细胞成分较多、胞核小、细胞间质少的细胞聚集区和胞核大、有较长的突起、细胞被基质包埋的基质形成区,该区主要表现为骨-牙本质样组织的沉积。对照组基质形成不明显,而TGF-β1组可见细胞在牙本质样组织周围呈平行排列,胞浆突入基质内。

2.2 甲苯胺蓝和Mallory三色法染色结果

甲苯胺蓝染色显示深蓝色BMG呈弧形包绕牙髓细胞及CDP,随培养时间的延长,细胞逐渐聚合形成牙髓并将CDP推移到外周,加入TGF-β1后第7 d可见牙本质样均质状物质增多,但染色不明显,第14 d后牙髓组织中央出现紫兰色均质样组织,从而证实有新生骨-牙本质样基质形成(图1);而对照组在整个培养过程无明显改变。Mallory三色法显示模式基本与甲苯胺蓝相似,加入TGF-β1第14 d后牙髓组织中央出现淡蓝色骨-牙本质样均质组织,外周可见粉红色牙髓基质(图2);而对照组在整个培养过程无明显改变。

2.3 免疫组化结果

加入TGF-β1后,培养第7 d组织培养模式下部分牙髓成纤维细胞开始出现DSP的表达。随着时间的延长,DSP表达阳性细胞逐渐增多,表达强度



图1 甲苯胺蓝染色可见紫兰色的新生骨-牙本质样基质形成。甲苯胺蓝染色 ×40 图2 Mallory三色法可见淡蓝色骨-牙本质样均质组织和粉红色牙髓基质。Mallory三色法 ×40 图3 免疫组化染色可见骨-牙本质样组织内细胞出现DSP的表达。ABC ×40

Fig 1 Toluidine blue staining proved that the weak violet staining persist in the bone-dentin matrix. Toluidine blue staining ×40 Fig 2 Modified Mallory's staining further proved that the bone-dentin matrix element stained blue-green adjacent to pulp tissue stained pink. Modified Mallory's staining ×40 Fig 3 Immunohistochemical analysis demonstrated the expression of DSP in these cells within bone-dentin like tissue. ABC ×40

也明显增加,其中骨-牙本质样组织内细胞 DSP 表达较为明显(图 3);而对照组仅有少量淡棕色阳性细胞散在于牙髓组织中。

3 讨论

牙髓组织主要由牙髓细胞组成,其外侧为成牙本质细胞并被牙本质包绕。单一的细胞培养并不能完全模拟牙髓的三维环境,本实验采用 BMG 作为载体,并去除活性因子以减少对牙髓组织的影响,该组织培养方法经 Trowel 型培养支架改良而成,即将 BMG 置于不锈钢金属网架上,牙髓细胞在 BMG 上培养。但以不浸没组织为宜,以使组织获得较高的氧分压^[4]。此外,采用的 CDP 具有很多孔隙,成蜂窝状,可为生长因子提供缓释作用。HE 染色结果显示牙髓细胞生长良好,在外源因素的刺激下可出现细胞游走加快,形态发生改变,胞浆和胞核明显变大。与常规培养相比更符合牙髓细胞在体内的生长状况,这对于观察牙髓细胞的游走、性状及生长因子的诱导具有重要意义。牙髓组织培养的成功建立,为研究牙髓细胞的诱导分化提供了一个理想的模型。

TGF- β 1 是一类具有多种生物学功能的细胞因子之一,对许多器官和组织的生长和分化起着重要作用,能刺激或抑制多种细胞的增殖^[5]。牙髓损伤后,内源性 TGF- β 1 可活化损伤毗邻细胞向成牙本质细胞诱导,促进修复性牙本质的形成^[6]。但对于成牙本质细胞的来源仍存在较大争议。为证实诱导后的牙髓成纤维细胞是否分化为成牙本质样细胞,本研究采用胰蛋白酶消化,避免了成牙本质细胞的污染,检测了在该培养模式下是否有骨-成牙本质样细胞基质成分的沉积,并采用甲苯胺蓝染色和 Mallory 三色法加以证实。结果显示在 TGF- β 1 的诱导下,牙髓细胞向成牙本质样细胞分化,并形成骨-成牙本质样组织。既往研究也显示成纤维细胞具有一定的干细胞分化特性,在特定条件下可分化为其它类型的细胞,牙髓成纤维细胞本身也具有矿化能力,甘油磷酸钠及地塞米松可促进人牙髓细胞复层生长,形成钙化结节^[3,7]。此外,牙髓细胞中还含有部分牙髓干细胞及其前体细胞,它们在正常情况下处于“静止状态”,当牙髓受到损伤时,它们在因子的刺激下可分化为成牙本质细胞,这些细胞是否参与了骨-成牙本质样组织的形成,都有待于进一步研究。

DSP 分布在成牙本质细胞、牙髓细胞、前期牙本质和牙本质中。研究表明,DSP 是一种低磷酸化的牙本质非胶原蛋白,对羟基磷灰石的形成和生长

具有一定的作用。在牙本质形成过程中,DSP 可在极化的成牙本质细胞表达,并通过胞浆将蛋白转运到矿化区^[8]。目前研究认为 DSP 从牙本质形成初期,即由成牙本质细胞和一些牙乳头细胞表达并分泌,随之在前期牙本质和牙本质中逐渐增多,它出现在 I 型胶原之后,并在分泌前的牙釉质细胞中具有一过性表达。DSP 参与生物矿化的启动或作为调节因子抑制磷酸钙的形成和生长,可作为牙本质形成的标记物^[9]。本研究显示组织培养细胞可有 DSP 的表达,并可形成骨-成牙本质样组织,表明诱导分化的成牙本质细胞在开始分泌骨-牙本质时表达 DSP,并通过成牙本质细胞突分泌至基质,参与胞外基质的矿化。

综上所述,本研究成功建立牙髓组织培养模式,为进一步在体外研究牙髓组织的重建与修复提供了理想的模型;体外用 TGF- β 1 可诱导牙髓细胞的分化及骨-牙本质基质的形成,牙本质特异性蛋白 DSP 的表达证实诱导后的牙髓成纤维细胞可分化为成牙本质样细胞。

参 考 文 献

- 1 聂鑫,张纯妍,金岩. 转化生长因子在牙本质发育及修复中的研究进展. 牙体牙髓牙周病学杂志,2002;12(10):571-573.
- 2 Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, *et al.* Transforming growth-beta-1 reduces alkaline phosphates mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. J Dent Res,1994;73(9):1509-1513.
- 3 聂鑫,金岩,张勇杰等. dNCPs、TGF- β 1 及联合应用对牙髓成纤维细胞增殖、ALP 及矿化的影响. 实用口腔医学杂志,2004;20(2):178-180.
- 4 金岩,杨连甲,汪阿冬等. 牛骨形成蛋白骨诱导的体外研究. 实用口腔医学杂志,1993;9(3):147-149.
- 5 Nie X, Tian WD, Zhang YJ, *et al.* Induction of transforming growth factor-beta 1 on dentine pulp cells in different culture pattern. Cell Biol Int,2006;30(4):295-300.
- 6 张纯妍,金岩,聂鑫等. 牙本质陶瓷粉、非胶原蛋白及其复合材料对修复性牙本质形成作用的研究. 牙体牙髓牙周病学杂志,2002;12(12):649-652.
- 7 Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. Microsc Rcs Tech,2003;60(5):469-479.
- 8 谢家敏,田卫东,汤炜等. 人类牙乳头间充质细胞向成牙本质细胞定向的诱导分化. 中国组织工程研究与临床康复,2007;11(27):5261-5265.
- 9 朱峰,聂蓉蓉,刘磊等. 小鼠牙本质涎磷蛋白基因重组腺病毒载体的构建. 北京口腔医学,2007;15(1):1-4.

(2007-09-05 收稿,2007-12-24 修回)

编辑 余琳