

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2018.08.003

· 基础研究 ·

不同浓度MTA对根尖乳头干细胞增殖及分化的影响

牛巧丽¹, 李一鸣², 宋艳艳³, 李晨曦⁴, 赵今¹

1. 新疆医科大学第一附属医院牙体牙髓科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830054); 2. 新疆医科大学第一附属医院牙周粘膜科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830054); 3. 新疆医科大学第一附属医院口腔修复科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐(830054); 4. 汉堡大学附属医院头部及神经中心, 口腔颌面外科, 头颈部肿瘤遗传学实验室, 头颈部再生医学实验室, 德国 汉堡(20246)

【摘要】 目的 探讨不同浓度无机三氧化矿物凝聚体(mineral trioxide aggregate, MTA)对根尖乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP)增殖及分化能力的影响及促进其向成牙本质细胞分化的潜力。方法 向SCAP分别加入不同浓度MTA培养液,配制成浓度为0.01、0.02、0.1、0.2、1、2、10、20 mg/mL的MTA实验组;设不含MTA而含有15%胎牛血清的 α -MEM培养液为对照组,CCK-8法测定1、3、5、7 d的细胞数,观察不同浓度MTA对SCAP增殖的影响,使用Real-time PCR检测分化相关基因牙本质涎蛋白(dentinsialoprotein, DSPP)、Runt相关转录因子(runt-related transcription factor 2, Runx2)表达的变化。结果 培养1 d时,各实验组的MTA实验组对SCAP的体外增殖的促进作用与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$);而在培养3、5及7 d时,0.01 mg/mL组的体外增殖作用比对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),0.02、0.1、0.2、1 mg/mL组与对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$),2、10、20 mg/mL组的体外增殖作用均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Real-time PCR检测显示,经0.01 mg/mL MTA处理7 d的实验组细胞DSPP($t = -11.12, P < 0.05$)及Runx2($t = -10.62, P < 0.05$)表达水平高于对照组。结论 0.01 mg/mL浓度组对SCAP的增殖、成牙本质分化及成骨分化有显著促进作用,而高浓度MTA则抑制SCAP的增殖。

【关键词】 MTA; 根尖乳头干细胞; 增殖; 分化; 基因表达

【中图分类号】 R781.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)08-0491-05

【引用著录格式】 牛巧丽,李一鸣,宋艳艳,等.不同浓度MTA对根尖乳头干细胞增殖及分化的影响[J].口腔疾病防治,2018,26(8):491-495.

Effects of different concentrations of MTA on the proliferation and differentiation of stem cells from the apical papilla NIU Qiaoli¹, LI Yiming², SONG Yanyan³, LI Chenxi⁴, ZHAO Jin¹. 1. Department of Endodontics, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Department of Periodontics & Oral Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. Department of Prosthodontics, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 4. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Head and Neurocenter Tumor Genetics Laboratory, Regenerative Medicine Laboratory University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburg 20246, Germany

Corresponding author: ZHAO Jin, Email: merryjin@sina.com, Tel: 0086-13565801865

【Abstract】 Objective To investigate the effect of different concentrations of MTA on the proliferation and differentiation of stem cells from the apical papilla (SCAP) and the potential of the SCAP to differentiate into odontoblasts.

Methods SCAP were cultured in different concentrations of mineral trioxide aggregate (MTA). MTA experimental group with concentration of 0.01 mg/mL, 0.02 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 10 mg/mL and 20 mg/

【收稿日期】 2017-12-16; **【修回日期】** 2018-03-09

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016D01C315)

【作者简介】 牛巧丽,主治医师,硕士, Email: 122689583@qq.com

【通信作者】 赵今,教授,博士, Email: merryjin@sina.com

mL were prepared. The number of cells at 1 day, 3 days, 5 days and 7 days were measured via a CCK-8 assay to observe the effect of MTA on SCAP proliferation. Real-time PCR was used to detect the gene expression changes. Cells cultured in alpha MEM culture containing 15% FBS without MTA were set as the control group. **Results** When cultured for 1 d, statistically significant differences in the promotion of in vitro proliferation of SCAP were not observed between each MTA experimental group and the control group ($P > 0.05$). When cultured for 3 d, 5 d and 7 d, the 0.01 mg/mL MTA group presented obvious promotion of SCAP proliferation compared with the control group ($P < 0.05$), whereas the 0.02 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 1 mg/mL groups did not presented differences with the control group ($P > 0.05$). The in vitro proliferation of the 2 mg/mL, 10 mg/mL and 20 mg/mL groups was lower than that of the control group ($P < 0.05$). Real-time PCR detection showed that the expression levels of DSPP ($t = -11.12, P < 0.05$) and Runx2 ($t = -10.62, P < 0.05$) in the experimental group treated with 0.01 mg/mL MTA for 7 days were higher than those in the control group. **Conclusion** The 0.01 mg/mL concentration of MTA significantly promotes the proliferation of SCAP and shows the best ability to induce osteogenic and odontoblast differentiation in the SCAP, whereas high concentrations of MTA inhibited the proliferation of SCAP.

【Key words】 Mineral trioxide aggregate; Stem cells from apical papilla; Proliferation; Differentiation; Gene expression

Sonoyama 等^[1-2]从人和猪的未完全发育完成的年轻恒牙的根尖乳头组织中发现并分离出一种新的间充质干细胞——根尖乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP),并证明这类细胞是与牙髓干细胞是不同类型的细胞。SCAP因其高度的增殖能力、较强的自我更新能力和多向分化的潜能,迅速成为促使牙本质再生及牙根发育的研究焦点,在诱导根尖孔的闭合及牙根的形成方面发挥着重要作用。

目前使用的氢氧化钙材料盖髓,可能会导致一些牙髓组织失去正常功能,严重时被吸收,导致根管钙化等现象^[3]。无机三氧化矿物凝聚体(mineral trioxide aggregate, MTA)作为新型的盖髓材料,具有封闭性好、持久性好、刺激性及生物毒性低等特点。研究发现高浓度的MTA对牙髓干细胞起到抑制作用^[4]。为明确高浓度MTA是否对SCAP也有抑制增殖的作用,并摸索和筛选能促进SCAP增殖的最适MTA浓度,本实验将制取不同浓度的MTA,观察其对SCAP增殖能力的影响,并探索适宜浓度的MTA是否具有促进SCAP向成牙骨质或者成骨分化的潜能,为临床上应用MTA做年轻恒牙的根尖诱导提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

α -MEM培养基(Hyclone,美国),胎牛血清FBS(四季青,中国),STRO-1, CD90和CD24单克隆抗体和FITC标记的二抗(millipore,美国),CCK-8

(Dojindo,日本),流式细胞仪(BD FACSAria,美国),倒置相差显微镜及照相系统(莱卡,德国),酶联免疫仪(Thermo Fisher Scientific,美国),MTA(Dentsply公司,美国)。PrimeScript™ RT reagent Kit 逆转录试剂盒(Takara,日本);引物合成(奥科生物技术公司,中国);SYBR Premix Ex Taq™ Real-time PCR 试剂盒(Takara,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 根尖乳头干细胞分离培养 实验牙来源于新疆医科大学第一附属医院口腔颌面外科门诊患者,年龄15~18岁,因阻生而拔除的牙根未发育完成的第三恒磨牙,无牙体牙周组织疾病,经患者知情同意,牙拔除后用含双抗(青霉素和链霉素)的Hanks液洗去血迹,在无菌操作台中,用组织剪将牙根与牙根根尖部质地柔软的根尖乳头组织剪开,使两者分离,将牙乳头组织用PBS缓冲液清洗3次后,转移至含有10 mL培养液(含有15%的血清)的培养皿中,用组织剪在培养皿中反复剪碎先前得到的牙乳头组织,直至牙乳头组织变成一个类似针尖大小的细小组织块,用巴氏管将小组织块与培养液完全混匀,置于37℃、体积分数为5%的CO₂恒温细胞培养箱中。细胞贴壁后隔日半换液。倒置显微镜下观察细胞生长情况,细胞融合率达80%后按1:3传代。

1.2.2 根尖乳头干细胞的鉴定 取第2代SCAP,消化、重悬并计数,以 1×10^5 个细胞每500 μ L分装至4个EP管中,避光条件下分别加入经FITC标记的相关抗体STRO-1, CD90和CD24,最后1管不加

抗体,作阴性对照。室温孵育30 min后于流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达情况。

1.2.3 实验分组 依照说明书,将MTA粉末与无菌蒸馏水混合调匀,凝固后,捣碎成粉末,取一定量的MTA粉末分别加入含有15%胎牛血清的 α -MEM的培养液,配制成浓度为0.01、0.02、0.1、0.2、1、2、10、20 mg/mL的MTA实验组培养液来培养细胞。对照组不含MTA而含有15%胎牛血清的 α -MEM的培养液培养细胞。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖能力 取第四代生长良好的SCAP以 2×10^4 个/mL的密度接种于96孔板中,依照分组每孔加入相应的培养液,在培养1、3、5、7 d用CCK-8方法检测细胞的增殖情况。具体为到达预定时间点后,用PBS轻柔漂洗各组细胞后,吸弃PBS,并在避光条件下按说明书每孔加入配制好的CCK-8检测液100 μ L,每组设6个复孔,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,450 nm测其吸光度。

1.2.5 基因表达检测 将密度为 3×10^5 个/mL的SCAP细胞悬液接种于6孔板,处理方法同1.2.3中浓度为0.01 mg/mL组,在培养的第7天,用PBS漂洗细胞后,加入Trizol(1 mL/孔),提取细胞总RNA,按照2 μ g反转20 μ L体系进行反转录,反应条件为:42 $^{\circ}$ C,15 min(循环3次),85 $^{\circ}$ C,5 s。采用RT-PCR检测牙本质涎蛋白(dentinsialoprotein, DSPP)、Runx2相关转录因子(runt-related transcription factor 2, Runx2)的表达水平,引物序列见表1。PCR扩增反应条件:预变性:95 $^{\circ}$ C,5 s;PCR反应:95 $^{\circ}$ C,5 s;55 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;共40个循环;溶解曲线分析:95 $^{\circ}$ C,5 s。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组的目的基因经GAPDH(内参)校正后相对于对照组的相对表达量。

表1 RT-PCR引物序列

Table 1 Primer sequence for the RT-PCR

基因	上游引物	下游引物
DSPP	GCATTTGGCAGTAGCATGG	CTGACACATTTGATCTTGCTAGGAG
Runx2	CCATAACGGTCTTCACAAATCCT	GGCCGGGACCTGACTGACTA
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对结果进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均重复3次,不同浓度实验组间的比较采用单因素方差分析,方差分析有统计学差异时采用Dunnett-*t*检验进行组内两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 牙根尖乳头组织形态观察

牙根未发育完成的第三恒磨牙,牙冠和牙根部呈球状的柔软的根尖乳头组织已分离(图1);显微镜下SCAP细胞呈长梭形、漩涡状排列(图2)。



图1 牙根未发育完成的第三恒磨牙根尖乳头组织
Figure 1 Apical papillary tissue of the third molar with an undeveloped root



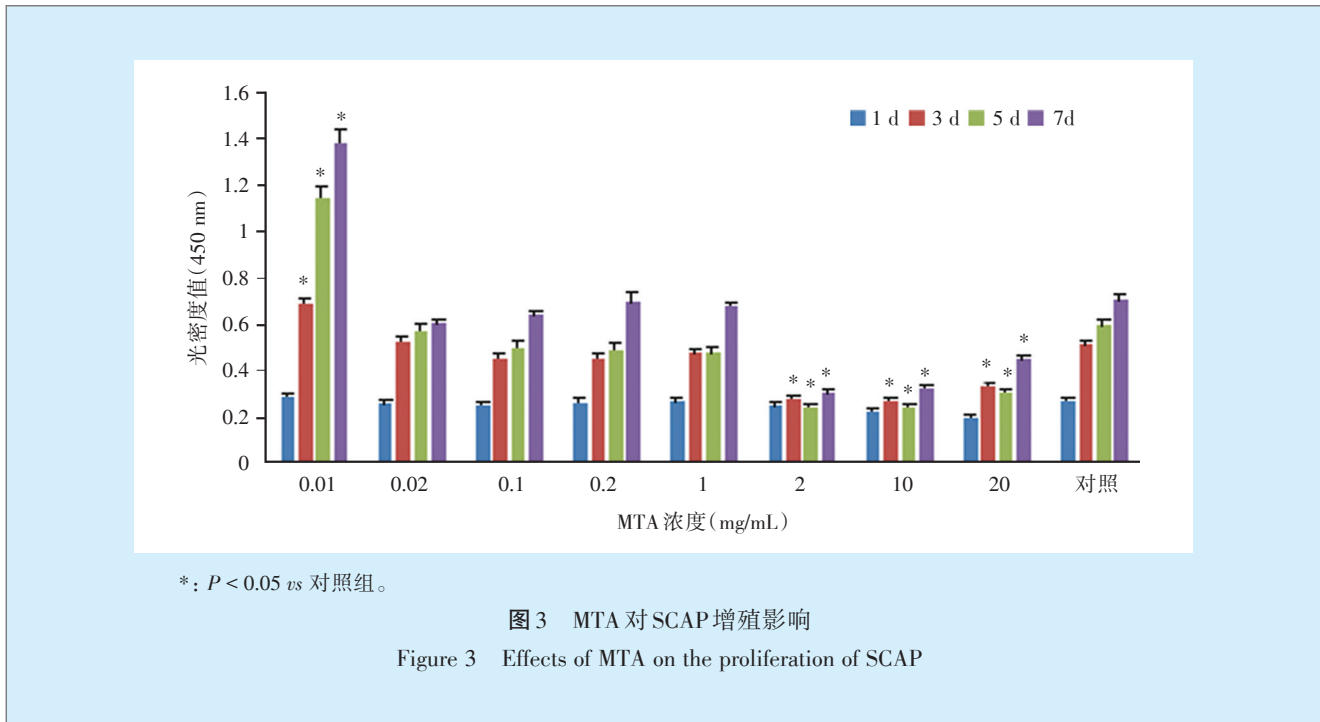
图2 SCAP体外培养第四代细胞 $\times 40$
Figure 2 SCAP in vitro culture of the fourth generation of cells $\times 40$

2.2 SCAP组织来源鉴定

流式细胞仪检测结果显示:SCAP阳性表达间充质干细胞表面标记CD90(96.2%)和STRO-1(41.1%),弱表达早期神经干细胞表面标记物CD24(5.4%)。因为牙髓干细胞不表达CD24^[5],表明本实验得到的细胞为根尖乳头干细胞SCAP而非牙髓干细胞。

2.3 不同浓度MTA对SCAP增殖影响

如图3所示,在培养1 d时,MTA实验组对SCAP的体外增殖的促进作用与对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而在培养3 d、5 d及7 d时,0.01 mg/mL组的体外增殖作用比对照组高,差异均具有统计学意义($F = 3.55, P = 0.011, t_{D(3d)} = 4.12, P_{(3d)} = 0.005; t_{D(5d)} = 3.94, P_{(5d)} = 0.007; t_{D(7d)} =$



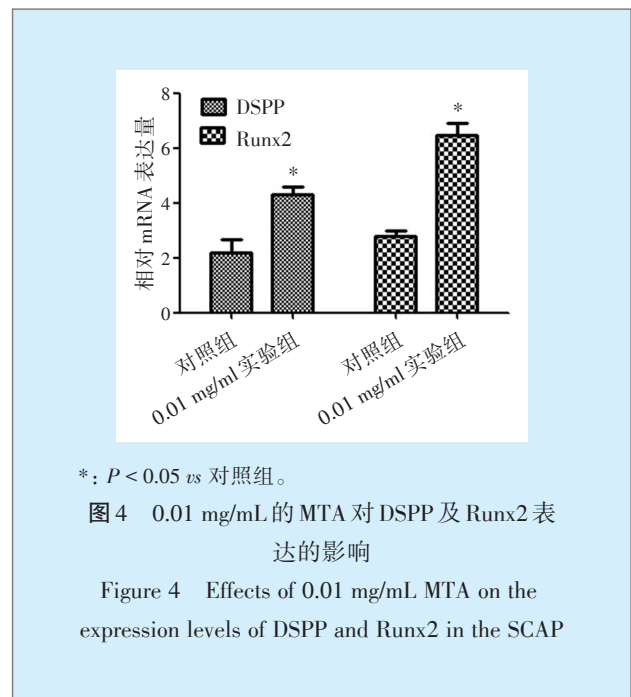
3.23, $P_{(7d)} = 0.026$); 在培养3 d、5 d及7 d时0.02 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 1 mg/mL组与对照组差异均无统计学意义 ($F = 1.338, P = 0.353$), 而2 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL组的体外增殖作用均低于对照组, 差异有统计学意义 ($F = 6.14, P < 0.005$), 表明这3种浓度对SCAP增殖有抑制作用。

2.4 0.01 mg/mL MTA对SCAP成牙本质/成骨基因表达的影响

RT-PCR检测结果显示, 经0.01 mg/mL的MTA处理7 d的实验组细胞DSPP ($t = -11.12, P < 0.05$)及Runx2 ($t = -10.62, P < 0.05$)表达水平高于对照组(图4)。提示0.01 mg/mL的MTA有影响SCAP分化方向的潜能。

3 讨论

牙髓受到感染的年轻恒牙, 由于其牙根还在发育过程中, 根尖呈漏斗状、髓腔大、管壁薄, 一旦根管内牙髓存在炎症, 就要行药物治疗让根尖组织恢复活力, 进一步发育成熟, 促进根尖部各类细胞分化, 从而产生根尖部牙本质及能够将根尖包裹起来的牙骨质^[6]。与其他口腔生物材料相比, MTA作为盖髓材料在根尖诱导成形术、直接盖髓术、活髓切断术、穿孔修补术和根尖倒充填术等治疗中表现出更高的成功率^[7]。虽然MTA在根尖诱导领域已取得了一定的成绩, 但仍有许多问题尚未解决, 有学者发现高浓度的MTA对牙髓干细胞



起到抑制作用。本实验发现0.01 mg/mL的MTA对SCAP的增殖有明显促进作用, 而高于1 mg/mL浓度的MTA则均对SCAP的增殖产生抑制作用。在临床上, MTA在用于根尖诱导时, 多是将纯MTA粉剂和配套液体直接调合, 其浓度远远高于0.01 mg/mL, 如此高浓度的MTA会抑制SCAP的增殖, 将会减少牙根周围帮助牙根继续发育的各种干细胞的数量, 延缓根尖诱导完成的时间, 所以继续深入研

究不同浓度MTA对干细胞的影响,从而尽量避免这类问题的发生是很有必要的。

Abe等^[8]在人未完全发育的磨牙根尖部分离出牙乳头,以酶消化法体外培养获得集落状生长的牙乳头细胞,该细胞在体外经诱导可分化为成牙本质样细胞、脂肪样细胞和神经元样细胞,并且表达目前公认的成牙本质细胞表面标志物DSPP^[9]。因此SCAP是牙根继续发育的重要细胞,研究对其的促进增殖和定向分化作用具有重要的意义。本实验中观察到,如果将MTA稀释到0.01 mg/mL的浓度,与对照组相比,可以显著促进根尖乳头干细胞向成牙本质方向分化,表现为显著促进成牙本质细胞表面标志物DSPP的表达。Araújo等^[10]将浓度为1 mg/mL的MTA作用于乳头干细胞,发现牙本质基质蛋白1的表达得到了显著促进,提示低浓度的MTA溶液有望被研制开发为成品药剂,应用到临床中,去诱导牙乳头干细胞向成牙本质方向分化,加速根尖孔的闭合及牙根的形成,从而加速冠折露髓或牙髓感染的年轻恒牙牙根的发育。本实验观察到,将MTA稀释到0.01 mg/mL的浓度,与对照组相比,可以显著上调成骨基因Runx2的表达,诱导根尖乳头干细胞向成骨方向分化。与此类似,Miller等^[11]发现MTA可以显著促进乳头干细胞向成骨方向分化。Proksch等^[12]研究结果也表明MTA在促进人牙槽骨母细胞的增殖和硬组织形成方面有着卓越的表现。严重的根尖周炎往往伴随根尖周牙槽骨的吸收,既然MTA能促进成骨基因的表达,临床工作者可以考虑在完成根管充填前,先向根尖局部注射适量的MTA,从而促进根尖已吸收牙槽骨的骨重建和骨再生,具体注入的MTA最适浓度还有待基础研究的支持。

本实验在对人根尖牙乳头干细胞进行体外分离、培养和鉴定的基础上,应用CCK-8、Real-time PCR等技术,研究MTA作用于人根尖牙乳头细胞后,对其增殖及分化的影响,结果显示:0.01 mg/mL的MTA对乳头干细胞的增殖和分化有显著促进作用,而高于1 mg/mL浓度的MTA则均对乳头干细胞的增殖产生抑制作用,这为后续深入研究MTA在临床使用时的浓度提供了参考,通过DSPP及

Runx2的基因表达改变,证实了MTA作为盖髓材料,根管侧穿修补材料的巨大潜力,但其促进作用的机理仍需进一步的研究。

参考文献

- [1] Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study[J]. J Endod, 2008, 34(2): 166-171.
- [2] Mao L, Tamura Y, Kawao N, et al. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice[J]. Bone, 2014, 61(1): 102-108.
- [3] 孔令姣,王金华. BMP9通过ERK5信号通路调控根尖牙乳头干细胞成骨/成牙本质分化[J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(6): 527-531.
- [4] Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, et al. Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts[J]. J Endod, 2009, 35(4): 513-519.
- [5] Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, et al. Somatic stem cells for regenerative dentistry[J]. Clin Oral Investig, 2008, 12(2): 113-118.
- [6] 王燕萍,吴锦涛,王子露,等. 磷酸二氢钾对根尖牙乳头干细胞成牙及成骨向分化能力的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2013, 48(1): 27-31.
- [7] 杜希希,李波,袁小平. 机械牵张应力对人根尖牙乳头干细胞增殖分化的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(10): 1041-1047.
- [8] Abe S, Yamaguchi S, Watanabe A, et al. Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(1): 90-93.
- [9] 何梅,吴家媛. Wnt/ β -catenin信号通路对牙根发育的影响[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(28): 4556-4562.
- [10] Araújo LB, Cosme-Silva L, Fernandes AP, et al. Effects of mineral trioxide aggregate, biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth[J]. J Appl Oral Sci, 2018, 26(3): e20160629.
- [11] Miller AA, Takimoto K, Wealleans J, et al. Effect of 3 bioceramic materials on stem cells of the apical papilla proliferation and differentiation using a dentin disk model[J]. J Endod, 2018, 44(4): 599-603.
- [12] Proksch S, Brossart J, Vach K, et al. Evaluation of the bioactivity of fluoride-enriched mineral trioxide aggregate on osteoblasts[J]. Int Endod J, 2018 (2): 423-425.

(编辑 罗燕鸿,曾雄群)