

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.03.005

· 基础研究 ·

改良组织块酶消化法原代培养人牙髓干细胞的研究

刘影¹, 高杰², 吴补领³

1. 南方医科大学口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州(510280); 2. 广州医科大学口腔医学院, 广东 广州(510182); 3. 南方医科大学南方医院, 南方医科大学口腔医学院, 广东 广州(510515)

【摘要】 目的 探索应用改良组织块酶消化法原代培养人牙髓干细胞并对细胞进行鉴定。**方法** 选取18~26岁健康人因正畸或阻生而拔除的健康、完整、无龋坏的牙齿30颗,采用改良组织块酶消化法原代培养人牙髓干细胞并通过对细胞的形态观察、细胞表面标记物检测、多向分化能力检测和生长曲线检测等方法鉴定人牙髓干细胞。**结果** 对人牙髓组织经改良组织块酶消化法原代培养得到的细胞形态类似于成纤维细胞和间充质细胞,生长曲线为S型,细胞表面标记物检测显示间充质干细胞标记物CD29、CD44、CD90表达阳性,造血干细胞表面标记物CD34、CD45、CD106表达阴性,同时细胞具有多向细胞分化的能力。**结论** 应用改良组织块酶消化法可以从人牙髓组织中成功原代培养人牙髓干细胞。

【关键词】 人牙髓干细胞; 组织块酶消化法; 原代培养; 细胞鉴定

【中图分类号】 R781.05 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)03-0166-05

【引用著录格式】 刘影, 高杰, 吴补领. 改良组织块酶消化法原代培养人牙髓干细胞的研究[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(3): 166-170.

Primary culture of hDPSCs with modified enzymatic digestion-explants method LIU Ying¹, GAO Jie², WU Buling³. 1. Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 2. Department of Stomatology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; 3. Nanfang Hospital, Southern Medical University & Stomatological College of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: WU Buling, Email: bulingwu0605@yahoo.com, Tel: 0086-20-37611105

【Abstract】 Objective To explore methods using modified tissue enzymatic separations for culturing primary hDPSCs *in vitro* and further identify the cells produced. **Methods** Primary hDPSCs were cultured using the modified tissue enzymatic separation method, and cells were identified by morphology, cell surface markers, and differentiation potential and evaluated using flow cytometry and growth curves. **Results** The hDPSCs were successfully isolated using the modified tissue enzymatic separation method. The morphology of these cells was similar to that of fibroblasts and mesenchymal stem cells, and the growth curve was "S" -type. The results of cell phenotype analysis indicated that the cells were positive for surface markers of mesenchymal stem cells, including CD29, CD44, and CD90, and negative for markers of hematopoietic stem cells, including CD34, CD45, and CD106. The cells were capable of differentiating into multiple cell types. **Conclusion** The modified tissue enzymatic separation method can successful be used to culture primary hDPSCs *in vitro*.

【Key words】 hDPSCs; Explants method and enzymatic separation method; Primary culture; Cells identification

【收稿日期】 2017-08-13; **【修回日期】** 2017-11-02

【基金项目】 广东省自然科学基金项目(2015A030310071); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2016212); 广东省自筹经费类科技计划项目(粤科规财字[2015]110号)

【作者简介】 刘影, 医师, 博士, Email: yingliu0504@yahoo.com

【通信作者】 吴补领, 教授, 博士, Email: bulingwu0605@yahoo.com

牙髓干细胞是一种间充质来源的细胞,也被称为未分化间充质细胞,常位于小血管及毛细血管周围,具有高度的自我更新和多向分化能力^[1]。2000年 Gronthos 等^[2]第一次分离培养了人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)。在牙髓受到损伤时人牙髓干细胞可以分化为各种细胞成分补充受损细胞,因此人牙髓干细胞为组织的修复和再生提供了新的思路,被认为是牙齿组织工程的种子细胞。随着对人牙髓干细胞的研究逐步深入,对人牙髓干细胞的需求不断增多,但人牙髓干细胞的原代培养一直是研究的难点,寻求一种可以获得大量细胞并且成功率高的人牙髓干细胞的培养方法迫在眉睫。本实验采用改良组织块酶消化法原代培养人牙髓干细胞,并采用多种检测手段对人牙髓干细胞进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 标本收集

标本取自南方医科大学南方医院口腔颌面外科,18~26岁健康人因正畸或阻生而拔除的健康、完整、无龋坏的牙齿30颗(经患者本人及家属知情同意)。拔除前彻底消毒,拔出后沿釉牙骨质界用高速手机环绕牙颈部磨出2 mm深度的沟槽,即刻放入预冷的含有1%双抗的不完全培养基中储存。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM(HyClone,美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(HyClone,美国),0.25%胰酶(Gibco,美国);DMSO、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、胰岛素、抗坏血酸、吡哆胺、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、转铁蛋白、丙酮酸钠、油红O、茜素红、阿新蓝、MTT粉剂(Sigma,美国);青链霉素(Gibco,美国);CO₂培养箱(Shellab,美国),生物安全柜(Biobase,中国),倒置相差显微镜(Olympus,日本),荧光显微镜及照相系统(Olympus,日本),离心机(Heraeus,德国),分光光度计(NanoDrop,美国),流式细胞仪(BD,美国)。

1.3 细胞原代培养

在无菌环境下,超净台内将牙齿从培养基中取出,用含双抗的PBS冲洗3遍,将牙齿沿沟槽劈开,取出牙髓,去除根尖2 mm的牙髓组织,置于PBS内反复漂洗至少3次。根据文献报道^[3],用改良组织块酶消化法进行人牙髓干细胞分离培养。用眼科剪将牙髓组织剪成约0.5 mm³大小的小块,用I型胶原酶(3 mg/mL)37℃消化组织块10 min,

加入完全培养基终止消化,1 000 r/min离心3 min,弃上清,加入少量完全培养基,混后将悬浊液接种至6孔板内。将盖玻片压于组织之上,补充适量液体。放入CO₂孵箱内37℃培养。24 h后换液,以后每72 h换液,倒置显微镜下观察细胞生长情况。待细胞游出并达到70%~80%汇合时以0.25%胰酶消化,按1:2传代。3~5代细胞用于后续实验。

1.4 人牙髓干细胞的鉴定

1.4.1 人牙髓干细胞的形态学观察 倒置相差显微镜下每天观察并记录细胞游出情况及细胞形态。

1.4.2 人牙髓干细胞表面标记物检测 取第3代处于对数生长期的人牙髓干细胞,调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL。用CD29、CD34、CD45、CD90、CD44、CD106抗体冰上避光孵育细胞1 h, PBS漂洗2遍,加入1 mL固定液。吹匀细胞后流式细胞仪检测细胞表面标记物。

1.4.3 多向分化能力检测 取处于对数生长期的第3代人牙髓干细胞,以 2×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,待细胞生长达到80%融合时,更换成骨、成软骨及成脂诱导培养液,将人牙髓干细胞向成骨、成软骨及脂肪方向诱导分化。

矿化诱导液内含有:50 mg/mL抗坏血酸、10 mM β -甘油磷酸钠、0.01 mM地塞米松和含10% FBS的DMEM。

成软骨诱导液内含有:含10 ng/mL TGF- β 、6.25 μ g/mL胰岛素、50 μ mol/L维生素C、6.25 μ g/mL转铁蛋白和含10% FBS的DMEM。

成脂诱导液内含有:含1 μ mol/L地塞米松、10 μ mol/L胰岛素、200 μ mol/L吡哆胺、0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤、10% FBS的DMEM。诱导液培养21 d后,分别用茜素红、阿新蓝、油红O染色,倒置显微镜下观察并拍照。

1.4.4 细胞计数法绘制细胞生长曲线 取处于对数生长期的第3代细胞,以 1×10^4 个/孔的密度接种于24孔板。分别于培养的1、3、5、7 d用细胞计数仪进行活细胞计数,每组3个复孔。实验重复3次,求均值。记录每次细胞数量,绘制人牙髓干细胞的生长曲线。

1.4.5 MTT法绘制细胞生长曲线 取处于对数生长期的第3代细胞,以 3×10^3 个/孔的密度接种于96孔板,分别于培养的1、3、5、7 d进行MTT检测。检测时每孔加入MTT液20 μ L,37℃继续孵育4 h,用细针头轻轻吸去培养液。每孔加入150 μ L DMSO,微振荡10 min,使结晶物充分溶解。选择

490 nm 波长,用酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值,求均值。实验重复3次。绘制人牙髓干细胞的生长曲线。

1.5 统计学分析

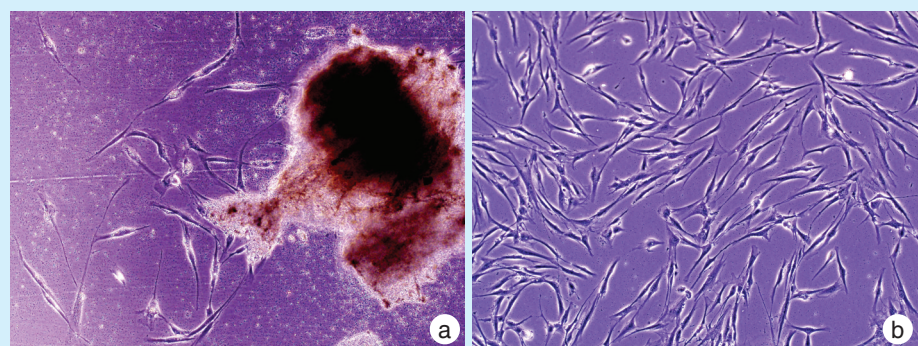
采用SPSS 13.0软件处理数据,绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 细胞生长情况及形态观察

采用组织块酶消化法原代培养人牙髓干细

胞,倒置显微镜下观察,组织块经消化后变的松散并可观察到大量单个游离的细胞。接种24 h后组织块贴壁良好,接种3~5 d有细胞从组织块周围游出,7 d可形成明显细胞晕。细胞成长梭状、成纤维细胞样细胞。接种10 d后细胞密度可达80%,按1:2进行传代培养。第2~5代细胞增殖加快,每次按1:2或1:3进行传代,平均5~7 d传代1次。随生长密度逐渐增加,细胞呈漩涡状或放射状排列。取3~5代细胞进行后续实验研究(图1)。



a:组织块酶消化法原代培养人牙髓干细胞10 d; b:第3代人牙髓干细胞5 d。

图1 人牙髓干细胞原代培养 倒置相差显微镜 ×100

Figure 1 Primary culturing of human dental pulp stem cells IPCM ×100

2.2 细胞表面标记物检测

流式细胞仪检测人牙髓干细胞表面标记物。结果显示,细胞表达间充质干细胞表面标记物CD29、CD44、CD90呈阳性,表达率分别为96.07%、95.17%和99.68%;表达造血干细胞表面标记物CD34、CD45、CD106呈阴性,表达率分别为0.10%、0.33%和0.32%。结果表明培养的细胞为间充质来源。

2.3 多向分化能力检测

细胞经矿化诱导液培养21 d后,细胞数量迅速增加,呈复层生长,部分区域细胞聚集成团。茜素红染色可见大小不等的红褐色矿化结节分散分布于培养皿中(图2a)。细胞经成脂诱导液培养7 d后,倒置显微镜下即可观察到细胞核周围出现小脂滴。成脂诱导21 d后,脂滴逐渐融合变大,油红O染色后可见橘红色脂滴分布于细胞质中(图2b)。细胞经成软骨诱导液培养21 d后,有半透明状细胞团形成,阿新蓝染色后可见蓝染区(图2c)。

2.4 细胞生长曲线

细胞计数法及MTT法绘制人牙髓干细胞生长曲线。两种方法绘制的生长曲线均成“S”形。细胞于接种后3 d进入对数生长期,5 d后进入平台期。细胞生长状态良好(图3)。

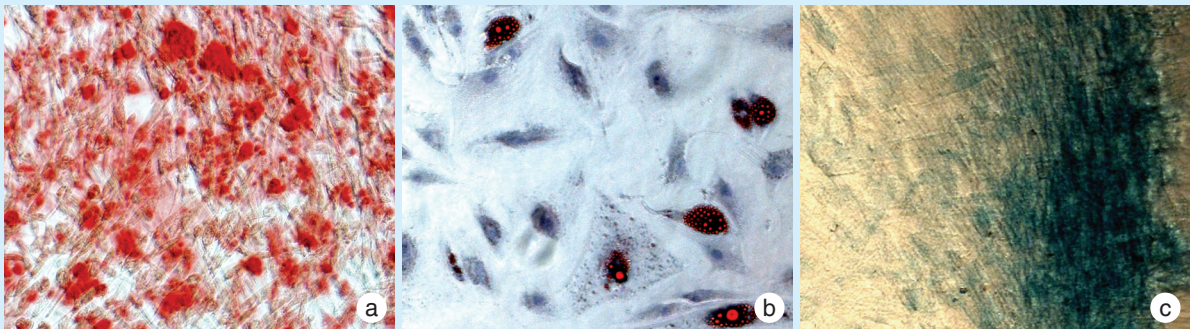
3 讨论

3.1 人牙髓干细胞的培养

牙髓干细胞具有高度的自我更新和多向分化能力,可以分化为神经元细胞、脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞等多种细胞^[4-10],作为牙髓组织再生的种子细胞而得到了广泛的关注^[11]。但由于人牙髓干细胞只能通过原代培养获得,其污染率高,培养周期长,成功率低并且无法大量获得,这成为所有人牙髓干细胞实验的难点。目前人牙髓干细胞的培养方法主要有酶消化法、组织块法以及组织块酶消化法等。比较几种培养方法,酶消化法的培养成功率高,可以一次性获得大量细胞,但细胞贴壁

率低,消化时间长,操作繁琐;组织块法操作简单,但培养成功率低,获得大量细胞所需时间长;组织块及酶消化法相结合的方法分离培养人牙髓干细胞,可以使牙髓组织变的疏松并可发现部分游离的单个细胞,其成功率高,操作简便。然而,组织块酶消化法已经被应用多年,但培养方法各有不

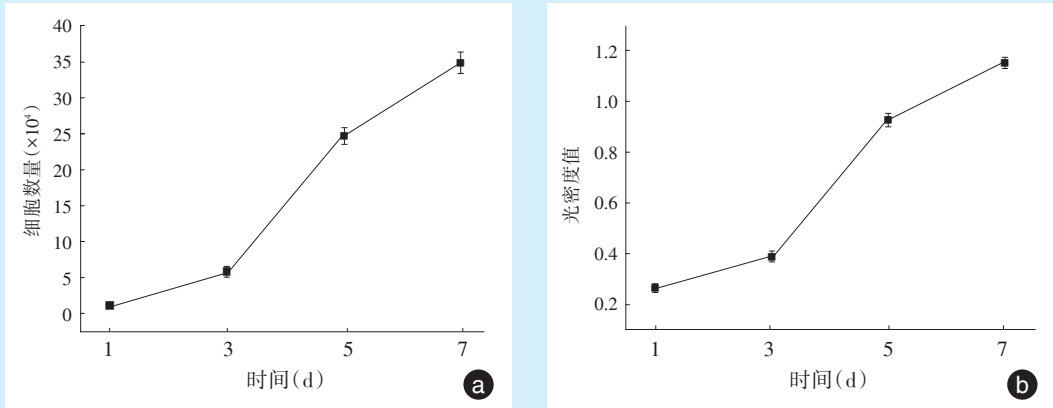
同,可使用 I 型胶原酶与 dispase 酶混合消化,或使用胰蛋白酶消化,酶的浓度各不相同,并且消化时间多数在 0.5~1.0 h。本实验使用的是改良组织块酶消化法, I 型胶原酶 (3 mg/mL) 37 ℃消化组织块 10 min,进一步简化了操作并且大大缩短了消化时间,可以得到良好的实验效果。



a: 人牙髓干细胞矿化诱导 21 d, 茜素红染色 (×100); b: 人牙髓干细胞成脂诱导 21 d, 油红 O 染色 (×400); c: 人牙髓干细胞成软骨诱导 21 d, 阿新蓝染色 (×200)。

图2 人牙髓干细胞具有多向分化能力

Figure 2 Human dental pulp stem cells showed multi-differentiation potential



a: 细胞计数法检测人牙髓干细胞生长曲线; b: MTT法检测人牙髓干细胞生长曲线。

图3 人牙髓干细胞生长曲线

Figure 3 Growth curve for human dental pulp stem cells

3.2 人牙髓干细胞的鉴定

目前对人牙髓干细胞的鉴定还没有明确的标记物,对人牙髓干细胞的鉴定主要从形态学鉴定、表面标记物检测、多向分化能力的检测以及生长曲线检测等几个方面进行综合检测。本实验培养的细胞为梭状的成纤维细胞样细胞,胞体较大,细胞质丰富,

细胞核居中。这与之前的报道相一致^[1, 3, 8]。

人牙髓干细胞是间充质来源的干细胞,所以其细胞表面表达间充质干细胞表面标记物而不表达造血干细胞的表面标记物。目前并没有明确的人牙髓干细胞表面标记物,所以对人牙髓干细胞主要采取多个表面标记物检测的方法。本实验采

用流式细胞仪对第3代细胞的细胞表型进行分析,结果表明该细胞间充质干细胞表面标记物表达为阳性,造血干细胞表面标记物表达为阴性。说明人牙髓干细胞为间充质干细胞来源而非造血干细胞来源。

多向分化能力是人牙髓干细胞的特性之一。人牙髓干细胞经诱导后可以向脂肪细胞、神经细胞、成牙本质细胞及软骨细胞分化^[4-8]。本实验将第3代细胞进行矿化诱导,21 d后茜素红染色可见大小不一的红褐色矿化结节分散分布;对细胞进行成脂诱导,21 d后油红O染色,细胞质中可见橘红色脂滴形成;对细胞进行成软骨诱导,21 d后阿新蓝染色,可见大片蓝染区。以上结果证明,本实验原代培养的细胞具有成骨、成脂、成软骨的多向分化能力。在牙齿的健康状态下,人牙髓干细胞处于静止状态;当牙髓受到损伤时如:龋齿、磨损、外伤等,人牙髓干细胞可以分化为各种细胞成分补充受损细胞,修复组织损伤^[12-14]。并且,在龋坏及一定浓度炎性刺激物的刺激下人牙髓干细胞的分化能力会出现变化,其迁移与矿化能力均比正常人牙髓干细胞减弱^[15-16]。

高度的增殖和自我更新能力是干细胞的另一大特征。本实验使用细胞计数法和MTT法对人牙髓干细胞绘制生长曲线。两种方法绘制的细胞增殖曲线均成典型的“S”型,接种后3 d进入对数生长期,5 d后进入平台期。细胞呈现良好的生长状态,具有快速增殖的特点。结果与已报道的实验结果相似^[3, 8, 11]。

通过以上检测可以证实本实验采用改良组织块酶消化法可以快速简便地原代培养细胞,并且经过检测,所培养的细胞具有间充质干细胞所表达的标记物、具有多向分化能力及高度的自我增殖和更新能力,符合人牙髓干细胞的特征,可以鉴定为人牙髓干细胞。改良组织块酶消化法可以有效地提高人牙髓干细胞实验研究细胞储备,提供一条快速有效的细胞来源。

参考文献

- [1] Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity[J]. J Dent Res, 2008, 87(3): 256-261.
- [2] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-13630.
- [3] 麻丹丹, 高杰, 吴补领. 改良组织块酶消化法培养人龋损人牙髓干细胞的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2011, 21(7): 371-374.
- [4] Arthur A, Rychkov G, Shi S, et al. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues[J]. Stem Cells, 2008, 26(7): 1787-1795.
- [5] Kim JK, Baker J, Nor JE, et al. mTor plays an important role in odontoblast differentiation[J]. J Endod, 2011, 37(8): 1081-1085.
- [6] Suh JS, Kim KS, Lee JY, et al. A cell-permeable fusion protein for the mineralization of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2012, 91(1): 90-96.
- [7] Nam S, Won JE, Kim CH, et al. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules[J]. J Tissue Eng, 2011: 812547.
- [8] Ma D, Gao J, Yue J, et al. Changes in proliferation and osteogenic differentiation of stem cells from deep caries *in vitro*[J]. J Endod, 2012, 38(6): 796-802.
- [9] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81(8): 531-535.
- [10] Wang CY, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat[J]. Oral Microbiol Immunol, 1997, 12(2): 65-71.
- [11] 史诗璇, 谢家敏. 人牙髓干细胞在组织工程领域的研究进展[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(6): 656-659.
- [12] Jiang HW, Zhang W, Ren BP, et al. Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue[J]. J Endod, 2006, 32(8): 747-751.
- [13] Mutoh N, Tani-Ishii N, Tsukinoki K, et al. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in dental pulp[J]. J Endod, 2007, 33(10): 1183-1186.
- [14] He W, Qu T, Yu Q, et al. Lipopolysaccharide enhances decorin expression through the Toll-like receptor 4, myeloid differentiating factor 88, nuclear factor-kappa B, and mitogen-activated protein kinase pathways in odontoblast cells[J]. J Endod, 2012, 38(4): 464-469.
- [15] Liu Y, Gao Y, Zhan X, et al. TLR4 activation by lipopolysaccharide and *Streptococcus mutans* induces differential regulation of proliferation and migration in human dental pulp stem cells[J]. J Endod, 2014, 40(9): 1375-1381.
- [16] 刘影, 高岩, 文军, 等. TLR4在人健康和深龋牙髓组织中的定位表达研究[J]. 口腔疾病防治, 2017, 25(3): 153-158.

(编辑 张琳, 张兆强)