

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.006

2 种不同成牙本质诱导液对大鼠脂肪干细胞增殖凋亡的影响*

吴娟娟,田芳,宋琦,李萍[△],赵彩霞,魏丹
(遵义医学院附属口腔医院病理科,贵州遵义 563003)

[摘要] 目的 探索 2 种不同的成牙本质诱导液——牙胚条件培养液(TGC-CM)和牙本质非胶原蛋白(DNCPM)对大鼠脂肪干细胞增殖和凋亡的影响。**方法** (1)取出生 4 d 的 SD 乳鼠 4 只,分别取腹股沟脂肪组织,用酶消化法进行脂肪干细胞分离和培养,免疫细胞化学法对细胞进行鉴定。(2)2 种诱导液作用细胞后,倒置相差显微镜下观察细胞形态变化,MTT 法检测细胞增殖情况,Annexin/PI 双染后流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。**结果** (1)细胞培养至第 2 代时表型分子 CD44 和 CD105 表达呈阳性。(2)经 TGC-CM 及 DNCPM 培养 3 d 后形态上发生极性改变。培养 6 d 后,TGC-CM 培养的细胞数量未见明显改变,而 DNCPM 培养的细胞密度明显降低。(3)MTT 结果显示 DNCPM 组 OD 值低于对照组及 TGC-CM 组($P<0.05$),流式细胞凋亡检测仪检测 DNCPM 组细胞凋亡率高于 TGC-CM 组和对照组($P<0.05$)。**结论** 作为大鼠脂肪干细胞向成牙本质样细胞方向分化的诱导液,TGC-CM 可能更具优势。

[关键词] 脂肪干细胞;牙胚条件培养液;牙本质非胶原蛋白液;增殖;凋亡
[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)07-0881-04

The effect of two different odontoblast inducer on the proliferation and apoptosis of rat adiposed-derived stem cells*
Wu Juanjuan, Tian Fang, Song Qi, Li Ping[△], Zhao Caixia, Wei Dan
(Department of Pathology, Affiliated Stomatological Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of two different odontoblast inducer on the proliferation and apoptosis of rat adiposed-derived stem cells. **Methods** Adiposed-derived stem cells were collected by enzyme digestion from inguinal fat pads of 4 days post natal mice. Immunocytochemistry was performed to identify the cells. MTT and flow cytometry were tested the proliferation and apoptosis of adiposed-derived stem cells by co-cultured with tooth germ cell conditioned medium(TGC-CM) or dentin non-collagenous protein medium (DNCPM). **Results** Cells displayed a fibroblast-like appearance and positively expressed CD44 and CD105 when cultured to the second generation. After 3 day the cells polarity changed by co-cultured. Count of cells were no obvious change by TGC-CM co-cultured, while that reduced significantly by DNCPM co-cultured. It confirmed that the proliferation rate of ADSCs in TGC-CM group and control group is higher than DNCPM group($P<0.05$), while the apoptosis of that in DNCPM group is higher TGC-CM group($P<0.05$). Compared with control group, the results had no significant difference($P>0.05$). **Conclusion** TGC-CM may have more advantage as inducer in rat adiposed-derived stem cells differentiate into dentin like cells than DNCPM. **[Key words]** adiposed-derived stem cells; tooth germ cell conditioned medium; dentin non-collagenous protein medium; proliferation; apoptosis

脂肪干细胞(adiposed-derived stem cells, ADSCs)是近年来从脂肪组织中分离得到的一种具有多向分化潜能的干细胞^[1]。研究发现脂肪基质细胞(ADSC)能够在体外直接增殖且衰亡率低,同时它具有取材容易、少量组织即可获得大量干细胞、对机体损伤小、来源广泛、体内储存量大等优点,逐渐成为近年来新的研究热点。口腔组织工程学领域也将 ADSCs 作为具有发展潜力的种子细胞。虽然,种子细胞很重要,但诱导液的选择也不容忽视,就目前来说,干细胞向成牙本质样细胞方向分化的诱导液使用得较多的有 2 种^[2-3]:一种为成牙本质诱导液—牙胚条件培养液(tooth germ cell conditioned medium, TGC-CM),另一种为牙本质非胶原蛋白(dentin non-collagenous protein medium, DNCPM)。牙胚是由上皮与间充质

细胞相互作用而形成。TGC-CM^[4]就是利用啮齿类动物切牙根尖区一种特殊的上皮结构会不断地生长,其周围间充质的功能与出生前牙乳头的功能相似,含有多种分子信号和生长因子,这一特性对干细胞向成牙本质样细胞进行诱导分化。而 DNCPM^[5]是由牙本质特异性蛋白、矿化组织特异性蛋白、生长因子及蛋白多糖组成。有研究^[6]证实牙本质非胶原蛋白单独作用或与一些细胞因子共同作用能够诱导牙髓干细胞、牙髓细胞,甚至是胚胎干细胞向成牙本质样细胞分化。随着口腔组织工程学的发展,多种干细胞向成牙本质样细胞分化的报道屡见不鲜,但诱导液在细胞培养过程中的作用却未见报道。本实验旨在利用 2 种不同诱导液作用脂肪来源干细胞,对细胞的增殖及凋亡进行检测,以筛选出更利于优秀种子细胞存活的诱导

* 基金项目:贵州省科技厅基金资助项目(黔科合 J 字 2009-2201);遵义市科技厅基金资助项目(遵市科合社 2009-09);遵义市红花岗区科技厅基金资助项目(遵红科合社字 2010-10)。 作者简介:吴娟娟(1987—),医师,硕士,主要从事口腔基础医学的研究。 △ 通讯作者, Tel: 15985068915; E-mail: 391613734@qq.com。

条件。

1 材料与方法

1.1 材料 出生后 4 d 的 SD 乳鼠(遵义医学院实验动物中心提供),DMEM/F12 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青公司),I 型胶原酶(Sigma 公司),透析袋(MW:8 000~14 400),兔抗鼠-CD44、兔抗鼠-CD105(北京中博奥森生物技术有限公司),羊抗兔 SP 法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),凋亡检测试剂盒(BD 公司),MTT(北京华美生物工程公司),0.4% 台盼蓝染色剂(碧云天生物科技有限公司),CKX-41 倒置相差显微镜(Olympus 公司),全波长酶标仪(Thermo Scientific 公司),FACS calibur 流式细胞仪(BD 公司),DMLB2HC 图像分析及采集系统(LEICA 公司)。

1.2 方法

1.2.1 脂肪干细胞的分离及培养 取出生后 4 d 的 SD 乳鼠 4 只,引颈处死,浸于 75% 乙醇消毒 10 min,解剖切取双侧腹股沟皮下脂肪组织,剪碎成 1 mm^3 的组织块,用含 1% 双抗的 PBS 液清洗 3 次,加入等体积 0.1% I 型胶原酶溶液,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中消化 30~45 min。往消化好的组织块中加入 2 倍体积的 PBS 液反复吹打混匀,200 目筛网过滤形成单细胞悬液,1 200 r/min 离心 5 min,倒去上清液,反复 2 次。以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于培养瓶中,置于培养箱中培养,24 h 后首次换液去除未贴壁的细胞,待细胞贴壁 80% 左右时,用胰蛋白酶消化以 1:2 或 1:3 进行传代。

1.2.2 脂肪干细胞的鉴定 第 2 代脂肪干细胞长满约 80% 时,用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液。以每孔 5×10^4 个细胞接种于 6 孔板内的盖玻片上,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞贴壁后,PBS 液冲洗 $5\text{ min} \times 3$ 次,用 4% 多聚甲醛在室温下固定 30 min,严格按照 SP 试剂盒说明书进行免疫细胞化学染色,一抗终浓度为 1:500 的 CD44 与 1:500 的 CD105。

1.2.3 TGC-CM 及 DNCPM 的制备 TGC-CM 的制备:牙胚细胞来源于原 ADSCs 来源动物的下颌切牙牙胚,剪碎后以 0.1% I 型胶原酶消化 1 h,200 目细胞筛过滤后,1 100 r/min 离心 6 min,用 PBS 液和不含血清培养基各洗 1 次后,接种至 100 mL 培养瓶中,取培养至第 3、5、7 天的原代牙胚细胞上清液,以 $22\text{ }\mu\text{m}$ 一次性过滤器过滤,高速离心机 2 000 r/min 离心 20 min,取上清与基础培养液以 1:1 混匀制成 TGC-CM。DNCPM 的制备:取 3 个月 SD 大鼠 10 只,钳取上下切牙后用生理盐水洗净,去髓。冰浴下磨去釉质和牙骨质,切成小段于铜质研钵中捣成粉末,浸入 10% EDTA-5 mM PMSF($\text{pH}=7.2$)液中 2 d,上清液移至透析袋中扎紧,加入双蒸水于烧杯中透析,透析后的液体分装于离心管中,置于冷冻真空干燥机中真空干燥,DNCPM 收集称质量备用。

1.2.4 2 种诱导液作用脂肪干细胞后的增殖情况 第 2 代于生长对数期的脂肪干细胞常规消化后制成细胞悬液,以 $4.5 \times 10^6/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,置于培养箱中贴壁后,将细胞分为 3 组:对照组、TGC-CM 组、DNCPM 组。加入相应的诱导培养液 $100\text{ }\mu\text{L}$,对照组加入等量的基础培养基,每组设 5 个复孔,培养 72 h,于培养结束前 4 h 每孔加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 0.5% MTT 液,培养 4 h 后,用针头小心吸去液体,各孔再分

别加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 溶解结晶,轻摇 10 min,酶联免疫检测仪 490 nm 处检测各孔的 OD 值。实验重复 3 次。

1.2.5 2 种诱导液作用脂肪干细胞后的凋亡情况 将于生长对数期的第 2 代脂肪干细胞常规消化后接种于 6 孔板中拍样,设 TGC-CM 组、DNCPM 组及对照组。各组设 3 个复孔,待细胞贴壁后加入对应的诱导液,对照组加入同等剂量的基础培养液。培养 72 h 后,分别消化收集细胞(包括贴壁细胞和悬浮细胞),PBS 洗 2 次,收集洗液,以 2 000 r/min 离心 8 min,重复洗 2 次后,每孔细胞加入 $100\text{ }\mu\text{L} \times \text{Binding Buffer}$ 重悬,移至流式试管,加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ FITC AnnexinV 及 $5\text{ }\mu\text{L}$ PI 荧光抗体,并设染色对照,涡旋混匀,避光条件下孵育 10 min,于 1 h 内流式细胞仪检测凋亡情况。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态 未经诱导的第 2 代 ADSCs 经 7~9 d 生长后,多数呈多角形或纤维状,细胞核清晰,一般有 2~3 个核仁,见较多核分裂相,呈鱼群状或旋涡状分布,细胞界限不清楚(图 1)。经 TGC-CM 诱导 3 d 后,细胞增殖能力较强,呈较长的纤维状,细胞质丰满,细胞核变大,部分细胞开始出现极性改变,细胞有平行排列的趋势(图 2)。经 DNCPM 培养 3 d 以后,细胞形态已发生明显改变,胞体变宽,呈较大的多角形,部分开始出现极性改变,细胞核大,位于细胞的一端,细胞以单极或 2 个突起为主,旋涡状或放射状分布开始改变,趋向于平行排列(图 3)。经 TGC-CM 培养 6 d 后,ADSCs 细胞极性更加明显,多数细胞呈平行排列,细胞形态与纤维形牙胚细胞相似;经 0.4% 台盼蓝染色,细胞计数后发现细胞数量没有明显变化(图 4)。经 DNCPM 培养 6 d 后,ADSCs 细胞极性趋势明显,突起变得多而长,细胞核大而明显,细胞质内富含蛋白分泌颗粒,细胞大致平行排列;细胞计数后发现细胞数量明显减低(图 5)。

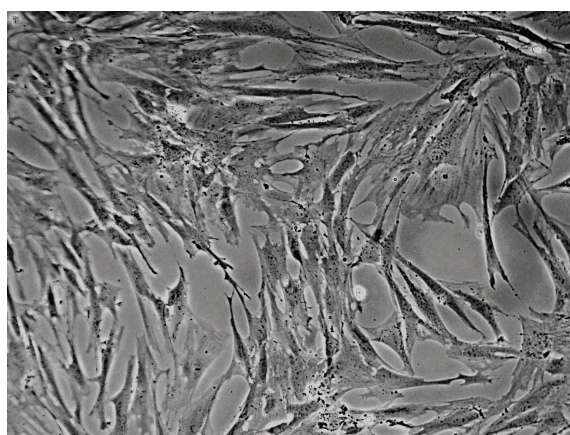


图 1 未经诱导的第 2 代 ADSCs($\times 100$)

2.2 免疫细胞化学染色 经免疫细胞化学法鉴定脂肪干细胞表面标记抗原 CD44、CD105 均为阳性表达(图 6~7)。

2.3 诱导后细胞的增殖情况 ADSCs 经 TGC-CM 和 DNCPM 培养 72 h,其增殖率间接由 OD 值来反映,DNCPM 组 OD 值低于对照组和 TGC-CM 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),TGC-CM 组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

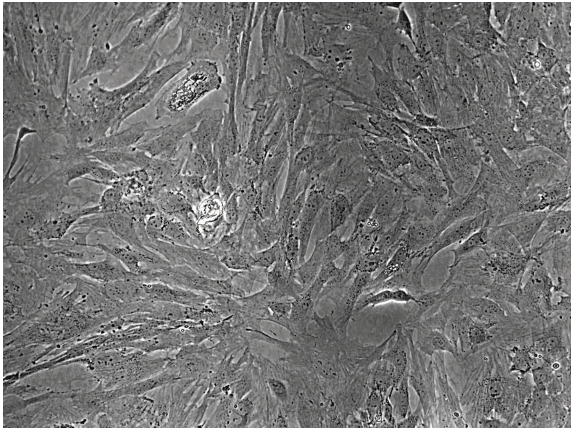


图 2 经 TGC-CM 诱导 3 d 的 ADSCs(×100)

表 1 2 种诱导液作用大鼠脂肪干细胞后的增殖与凋亡情况(̄x±s)

组别	A ₄₉₀ OD 值	凋亡率(%)
对照组	0.380±0.125	5.311±2.414
TGC-CM 组	0.377±0.035△	4.020±2.380△
DNCPM 组	0.028±0.017*▲	11.060±2.712*▲

*: $P<0.05$, 与对照组比较; ▲: $P<0.05$, 与 TGC-CM 组比较; △: $P>0.05$, 与对照组比较。

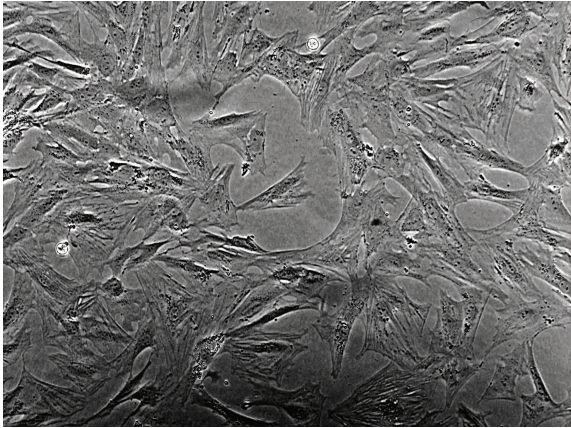


图 3 经 DNCPM 诱导 3 d 的 ADSCs(×100)

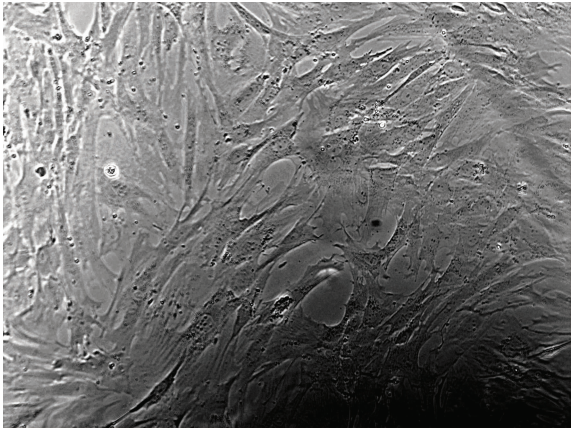


图 4 经 TGC-CM 诱导 6 d 的 ADSCs(×100)

2.4 诱导后细胞的凋亡情况 ADSCs 经 TGC-CM 和 DNCPM 培养 72 h 后, DNCPM 组的凋亡率高于对照组与 TGC-CM 组,

差异有统计学意义($P<0.05$), TGC-CM 组凋亡率与对照组间比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1、图 1。

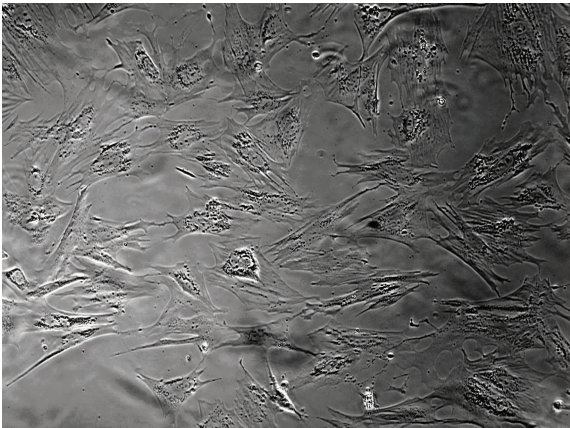


图 5 经 DNCPM 诱导 6 d 的 ADSCs(×100)

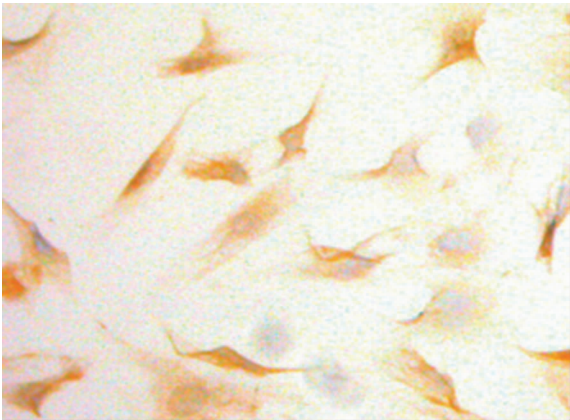


图 6 CD44 阳性表达(SP 法, ×200)

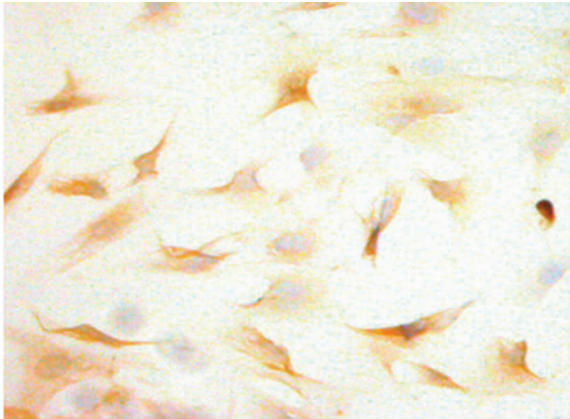
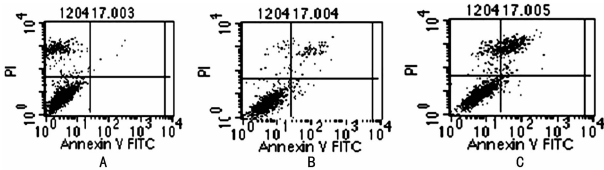


图 7 CD105 阳性表达(SP 法, ×200)



A: 对照组; B: TGC-CM 组; C: DNCPM 组。

图 8 ADSCs 诱导后流式凋亡散点图

3 讨 论

牙齿再生是治疗牙体缺失最具前景的方法。脂肪来源于细胞的分化潜能随年龄的增长保持不变^[7], 这是脂肪来源于细

胞相对于其他种子细胞的一大突出优势。Hung 等^[8]研究证实,脂肪干细胞与牙髓干细胞均能在家兔模型中分化发育为具有神经和血管的完整牙齿,但脂肪干细胞具有更高的生长率且不易衰老。因此,本实验选其作为主要的研究对象,并从 SD 乳鼠中成功分离提取细胞并在体外繁殖。Alipour 等^[9]用免疫荧光检测到来源于人剥脱的乳牙和脂肪中干细胞的表面标记物发现,2 种细胞均表达 CD44,而脂肪干细胞表面还可表达 CD105 分子。本实验通过免疫组织化学采用 CD44 和 CD105 为检测标记物,并得到双阳性的结果,说明从大鼠脂肪组织中获取的细胞为脂肪干细胞。

通过细胞观察,2 种诱导液在作用 ADSCs 3 d 后,细胞发生极性改变,表型也开始与原来的细胞明显不同,细胞可能开始发生定向分化。细胞的增殖和分化能力高低取决于其微环境是否适宜。Yu 等^[10]使用 TGC-CM 成功地将牙髓干细胞诱导为牙髓牙本质复合体并证明 TGC-CM 能够为牙本质的形成提供微环境,是介导牙髓干细胞形成规则牙本质的有效方法。TGC-CM 能够诱导干细胞向牙本质方向分化的原因是其在作用的微环境中存在着调节的分子信号和生长因子如 Notch-1、TGF- β s、BMPs、FGFs,能参与牙本质形成中的信号转导和调控。而 DNCPM 组成成分中的唾磷蛋白在牙本质矿化中具有重要作用,糖胺多糖能促进牙本质细胞的极化,同时也含有一些生长因子如 TGF- β s、BMP-2、BMP-3、BMP-7 等。Deng 等^[11]证实第一鳃弓来源的间充质细胞能在 DNCPM 或 DNCPM+TGF- β 1 诱导下分化为成牙本质样细胞。Wen 等^[12]使用牙囊条件培养液与 DNCPM 混合后诱导脂肪干细胞分化为成牙骨质样细胞,与此同时诱导后的成牙骨质细胞很快就丧失了增殖能力。这也与本研究观察到的情况是符合的,DNCPM 与 ADSCs 共培养 6 d 后,细胞的数量就开始发生明显地减少。2 种诱导剂均能够诱导脂肪干细胞形成牙样组织,但他们对细胞生长的影响的比较却未见报道。本实验将 TGC-CM 与 DNCPM 单独作用于脂肪来源干细胞,并将诱导后细胞的增殖情况和调亡率在各组之间进行比较,以此作为细胞生长状态的评估。经 TGC-CM 诱导后的细胞增殖率与调亡率与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明在诱导中 TGC-CM 并没有影响细胞的正常生长。但与 TGC-CM 组相比,DNCPM 组增殖率明显降低,调亡率增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。这可能是 DNCPM 本身或在提取过程中产生的某些成分影响了细胞的增殖并诱导调亡。而在 TGC-CM 的细胞培养上清液中,包含了保持细胞增殖活力的各种细胞因子、基质蛋白、细胞代谢物,更利于细胞的生长。由此可以推断,TGC-CM 可能对种子细胞向成牙本质样细胞的诱导更具优势。

参考文献

- [1] Busilacchi A, Gigante A, Mattioli-Belmonte M, et al. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration[J]. Carbohydr Polym, 2013, 98(1): 665-676.
- [2] Wang YX, Ma ZF, Huo N, et al. Porcine tooth germ cell conditioned medium can induce odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(5): 354-362.
- [3] Huo N, Tang L, Yang Z, et al. Differentiation of dermal multipotent cells into odontogenic lineage induced by embryonic and neonatal tooth germ cell-conditioned medium[J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(1): 93-104.
- [4] Tabatabaei FS, Ai J, Jafarzadeh-Kashi TS, et al. Effect of dentine matrix proteins on human endometrial adult stem-like cells: in vitro regeneration of odontoblasts cells[J]. Arch Oral Biol, 2013, 58(7): 871-879.
- [5] Hu CC, Zhang C, Qian Q, et al. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors[J]. J Endod, 1998, 24(11): 744-751.
- [6] Liu J, Jin T, Ritchie HH, et al. In vivo differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract[J]. In Vitro Cell Dev Anim, 2005, 41(7): 232-238.
- [7] Jing W, Wu L, Lin Y, et al. Odontogenic differentiation of adipose-derived stem cells for tooth regeneration; necessity, possibility, and strategy[J]. Med Hypoth, 2008, 70(4): 540-542.
- [8] Hung CN, Mar K, Chang HC, et al. A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration[J]. Biomaterials, 2011, 32(29): 6995-7005.
- [9] Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, et al. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells[J]. Int J Prev Med, 2010, 1(3): 164-171.
- [10] Yu JH, Deng ZH, Shi JN, et al. Differentiation pulp stem cells into regular-shaped dentin pulp complex induced by tooth germ cell condition medium tissue[J]. Tissue Engineering, 2006, 12(11): 3097-3105.
- [11] Deng M, Shi J, Smith AJ, et al. Effects of transforming growth factor beta1(TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins(DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(11): 937-945.
- [12] Wen X, Nie X, Zhang L, et al. Adipose tissue-deprived stem cells acquire cementoblast features treated with dental follicle cell conditioned medium containing dentin non-collagenous proteins in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 409(3): 583-589.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-12-27)