

文章编号: 1674-8085(2017)03-0093-03

dentonin 对牙髓干细胞增殖的实验研究

*曾常爱¹, 孙小春²

(1.井冈山大学临床医学院, 江西, 吉安 343000, 2.新干县人民医院口腔科, 江西, 新干 331300,)

摘要: 目的 研究 *dentonin* 促进牙髓干细胞增殖, 获得有关 *dentonin* 对牙髓干细胞增殖的实验证据。方法 把构建好的含有真核细胞表达质粒 pcDNA-*dentonin*, 在脂质体 LipofectAMINE 介导下, 转染到体外培养的牙髓干细胞, 再进行 MTT 检测细胞增殖。结果 发现 *dentonin* 对牙髓干细胞生长有明显的增殖作用。结论 牙髓干细胞生长速度较快, 但是在两周后进入平台期, 牙髓干细胞生长速度减慢。

关键词: *dentonin*; 牙髓干细胞; 增殖

中图分类号: R780.2

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2017.03.017

RESEARCH ON THE EFFECT OF *DENTONIN* FOR DENTAL PULP STEM CELLS PROLIFERATION

* ZENG Chang-ai¹, SUN Xiao-chun²

(1. Oral Department, Clinical Medical College of Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343000, China;

2. Department of Stomatology, The People's Hospital of Xingan, Xingan, Jiangxi 331300, China)

Abstract Objective: To study the promotion effect of *dentonin* on dental pulp stem cells proliferation and obtain the relative experimental evidence. **Methods:** Eukaryotic cells expression plasmid pcDNA-*dentonin* was transfected into dental pulp stem cells cultured in vitro by being mediated by LipofectAMINE, and then the cell proliferation were determined by MTT. **Results:** We found *dentonin* an obvious proliferation effect on dental pulp stem cells. **Conclusion:** The cell growth rate was faster, but cell growth had slowed in the plateau after two weeks.

Key words: *dentonin*; dental pulp stem cells; proliferation

牙周病是牙周组织的慢性进行性破坏性疾病, 牙周膜、牙槽骨和牙骨质都受到损害时, 最终因支持组织破坏而导致牙齿脱落, 严重影响人们的生活质量。MEPE(Matrix extraceluar phosphogl-ycoprotein, 细胞外基质糖蛋白)是一种细胞外基质的非胶原磷酸化糖蛋白, 也是一种调磷因子, 对磷酸盐代谢紊乱及各种骨组织疾病的成骨细胞增生以及牙周组织生理连接的重建有重要作用。*dentonin*/AC-100 作为 MEPE 的一个基因片断, 对骨组织形成的作用已成为研究热点, 而牙髓干细胞是人体中的一种成体

干细胞, 具有多向分化的能力, 其具备矿化成骨组织的能力^[1-3]。本研究将把构建好的含有真核细胞表达质粒 pcDNA — *dentonin*, 在脂质体 LipofectAMINE 介导下, 转染到体外培养的牙髓干细胞, 利用 *dentonin* 促进大量牙髓干细胞增殖, 获得有关 *dentonin* 对牙髓干细胞增殖的实验证据。

1 主要试剂与仪器

DMEM培养基、I型胶原酶、胎牛血清、免疫

收稿日期: 2017-02-12; 修改日期: 2017-04-06

基金项目: 江西省科技厅科技计划项目 (20122BBG70151-2)

作者简介: *曾常爱(1962-), 男, 江西永丰人, 副教授, 主要从事口腔临床研究(E-mail:zca31688@163.com);

孙小春(1963-), 男, 江西新干人, 主治医师, 主要从事口腔临床研究(E-mail: 13970638266@139.com)。

组织化学试剂盒(DAKO, USA), 胰蛋白酶、70 μ m 细胞筛网(Falcon, USA)、pCDNA-dentonin真核表达质粒以及牙髓干细胞(保存于井冈山大学医学院中心实验室), 细胞培养箱(Shellab, 美国)、生物安全柜(上海博讯实业有限公司)、微量移液器(Eppendorff, 德国)、倒置显微镜(OLYMPUS, 日本), 电泳仪(Bio-Rad, 美国), GDS8000凝胶扫描系统(UVP, 美国)。平底24孔、96孔塑料培养板、YJ-875型超净工作台(苏州净化设备厂), 二氧化碳培养箱(nuaire, America), 细胞培养瓶及培养板, 高速离心机, 细胞记数板。

2 方法

2.1 牙髓干细胞的复苏

从冰箱中取出牙髓干细胞冻存管, 温水浴 37 $^{\circ}$ C。细胞在37 $^{\circ}$ C复苏后, 离心弃上清后加入培养基再放入培养箱。相对湿度100%, 5%CO₂培养箱中, 置于双抗的DMEM培养基的条件下培养, 每3 d换液1次, 5~6 d消化传代1次。壁面至80%融合后, 在超净工作台上吸除培养瓶中旧培养基, 0.25%胰酶消化液约2 mL, 直到显微镜下见牙髓干细胞收缩变圆后, 振动瓶底使细胞脱落, 用培养基后轻轻吹打, 收集细胞至离心管, 吹打成细胞悬液, 按照1:2比例传代至无菌细胞培养瓶内继续培养。

2.2 pCDNA3.1-dentonin 质粒转染牙髓干细胞

本次实验分为3组, 分别为D1表示正常细胞, D0表示转染空载体的细胞, D2表示转染目标质粒的细胞。首先在96孔板中加入微量培养基, 使每

孔细胞的接种量达到 2×10^7 个左右细胞, 然后再更换新的DMEM, 将0.5 μ g 质粒和2 μ L TransLipid 稀释培养基中, 把牙髓干细胞放在室温中孵育5 min。含有质粒的DMEM和接种有细胞的DMEM培养基轻轻混匀, 室温孵育20 min, 轻摇培养皿混匀培养基, 孵育后更换新的DMEM培养液继续培养数小时。

2.3 MTT 检测细胞增殖

从经过不同处理的牙髓干细胞中, 取生长良好的第4代细胞, 计数调整细胞浓度至 1×10^6 mL, 分别接种于96孔板中, 每孔100 μ L, 常规培养24 h后, 将96孔板移入培养箱中继续培养(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。根据不同分组要求, 分别在第3 d, 7 d, 11 d和15 d加入20 μ L 5 mg/mL MTT 溶液, 将培养板在培养箱内孵育4~6 h, 轻轻吸去每孔内的培养液, 然后每孔加入150 μ L DMSO, 最后选择波长520 nm, 用酶联免疫检测仪来测量各孔的吸光值进行分析。

3 结果

3.1 牙髓干细胞的培养

复苏培养的牙髓干细胞6 h后大部分细胞贴壁, 12 h后开始伸展, 培养两天后已形成细胞克隆球, 呈长梭形的成纤维细胞样细胞, 或回形状或椭圆形, 牙髓干细胞较小, 排列比较紧密, 胞体丰满, 牙髓干细胞较大。图1及图2为传代培养6 d和14 d的光镜照片, 放大倍数为100倍数; 图3及图4为茜素红染色的细胞, 形态呈现长梭型状, 在14 d的时候融合成单层细胞。

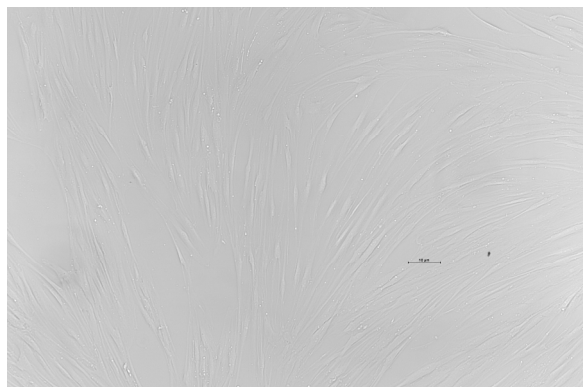


图1 培养6 d牙髓干细胞 $\times 100$
Fig.1 DPSC cultured after Six days



图2 培养14 d牙髓干细胞 $\times 100$
Fig.2 DPSC cultured after fourteen days



图3 培养6 d 牙髓干细胞(茜素红)×100
Fig.3 DPSC cultured after Six days(Alizarin red)

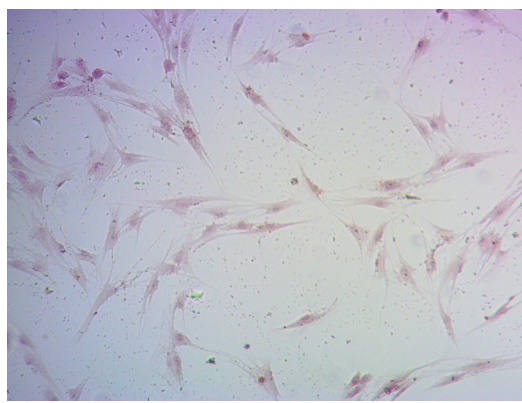


图4 培养14 d 牙髓干细胞(茜素红)×100
Fig.4 DPSC cultured after fourteen days(Alizarin red)

3.2 MTT 法细胞增殖情况

与对照组相比,发现 *dentonin* 对牙髓干细胞生长有明显的增殖作用,细胞生长速度在初期较慢,但是在 7~14 d 中间加快,14 d 后进入平台期,细胞生长速度明显减慢 ($P < 0.05$),统计学分析具有统计学意义。

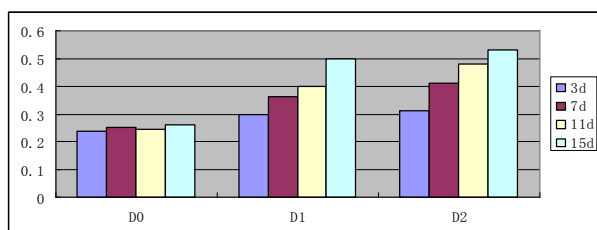


图5 *dentonin* 对牙髓干细胞增殖的影响

Fig.5 *Dentonin* impacted on dental pulp stem cell proliferation

4 讨论

Dentonin 作为 MEPE 的一个基因片段,源于 MEPE 的中间保守序列。目前已知含有 23 个氨基酸残基的多肽链,研究发现,能导致大量成骨细胞增加,刺激新骨的形成,在培养的人原代成骨细胞中能刺激细胞的增殖,提高碱性磷酸酶(ALP)的活性,应用 *dentonin* 在牙槽骨中具有成骨能力,但对其促进细胞增殖能力的机理却并不清楚^[4-5]。临床上可利用 *dentonin* 诱导未分化间充质细胞分化为成软骨细胞和成骨细胞,促成骨细胞损伤的修复^[6-8]。本实验利用 *dentonin* 促进牙髓干细胞的增殖,发现 *dentonin* 对牙髓干细胞生长有明显的增殖作用,细胞生长速度在 7~14 d 内较快,但是在两周后进入平台期,牙髓干细胞生长速度减慢。因此,可利用 *dentonin* 促进牙髓干细胞的增殖能力。而且,可进

一步对其促进分化的机理进行研究,为在口腔领域中治疗牙周炎及颌骨骨折愈合等提供一个广阔的空间。

参考文献:

- [1] 李颖,谷子芽,吕秋峰,等. 酶解组织块法原代培养人牙周膜干细胞和牙髓干细胞[J].中国组织工程研究,2012,16(32):5993-5998.
- [2] 李景辉,张方明,张振庭. 人恒牙牙髓干细胞分化为脂肪细胞的体外实验研究[J].北京口腔医学,2012,20(3):142-146.
- [3] 麻丹丹,高杰,吴补领. 改良组织块酶消化法培养人龋损牙髓干细胞的实验研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2011(7):371-374.
- [4] 辛红,陈润良,裴英波. 干细胞因子促进牙髓干细胞增殖与骨向分化能力[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(14):2568-2571.
- [5] 贺慧霞,金岩,史俊南,等. 牙髓干细胞向神经细胞方向的诱导分化实验[J].华西口腔医学杂志,2007,25(4):331-334.
- [6] Quarles L D. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization[J]. J Physiol Endocrinol Metab, 2003,285(1):1-9.
- [7] Gowen L C, Petersen D N, Mansolf A L, et al. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass[J]. J Biol Chem, 2003,278(3):1998-2007.
- [8] MacDougall M, Simmons D, Gu T T, et al. MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21[J]. J Connect Tissue Res,2002,43(2-3):320-30.