

·技术研究·

大鼠牙囊细胞培养方法的探讨

谷海晶, 凌均荣, 杜宇

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院牙体牙髓科, 广东 广州 510055)

摘要: 【目的】探讨大鼠牙囊细胞体外培养的方法。【方法】分离出大鼠牙囊组织, 分别采用组织块培养法、细胞消化分散法、及改良组织块法进行牙囊细胞原代及传代培养, 倒置相差显微镜下进行细胞形态学观察, 透射电镜观察细胞超微结构。【结果】培养至第 3 天, 倒置相差显微镜观察发现, 采用组织块培养法, 见少数细胞从组织块爬出; 而细胞消化分散法则可获得数量多的牙囊细胞, 但与杂质细胞混杂生长; 改良组织块法见量多、相对纯的牙囊细胞。电镜下牙囊细胞无桥粒, 胞浆中含有高密度电子颗粒和大量粗面内质网。组织块法、细胞消化分散法和改良组织块法牙囊细胞培养成功率分别为 80%、60%和 100%; 分别于 10 d、7 d 和 6 d 左右进行第一次传代。【结论】改良组织块法是一种良好的大鼠牙囊细胞培养方法。

关键词: 牙囊细胞; 细胞培养; 方法学

中图分类号: R329-33

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0586-04

Exploration of Culture Method of Rat Dental Follicle Cells In Vitro

GU Hai-jing, LING Jun-qi, DU Yu

(Department of Operative and Endodontics, Guanghua College of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】To explore the culture method of rat dental follicle cells in vitro. 【Methods】The dental follicle (DF) tissues were dissected for primary generation and passage culture by methods of explant, dissociation cell and improved explant, respectively. Consequently, the morphology of the cultured first passage DF cells and their ultrastructure were discovered under inversion phase difference microscope and transmission electronic microscope, respectively. 【Results】At the third day in vitro, only a few cells extended from the explant by way of explant, and many DF cells mixing with impure cells adhered wall by way of dissociation cell. However, a large quantity of relative pure DF cells was discovered by way of improved explant at the same time. Transmission electron microscopy showed that the cultured cells contained electron-dense granules, and abundant rough endoplasmic reticulum(RER) and no desmosomes. At about 10th, 7th and 6th day in vitro, DF cells were passed first time with achievement ratio of eighty, sixty and one hundred percent by ways of explant, dissociation cell and improved explant culture respectively. 【Conclusion】Improved explant culture was a good culturing method for rat DF cells.

Key words: dental follicle cells; cell culture; methodology

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1):586-589]

牙囊对牙齿萌出起重要作用。牙萌出必须是在牙槽骨的吸收、形成牙槽骨的通道后, 才能够完成这一生理过程^[1]。Cahill 和 Marks^[2,3]研究表明, 以手术方法去除小鼠牙囊, 牙齿则不能萌出; 而保留牙囊, 用其它物质替代牙胚, 结果替代物可以萌出。Larson^[4]在狗前磨牙牙冠形成后萌出前四周去

除牙囊, 牙齿同样不能萌出, 将剥离的牙囊立即放回成釉器表面, 牙齿即能重新萌出。这些研究证明牙齿萌出依赖牙囊的存在。牙囊在牙齿萌出过程中, 从组织、细胞和分子水平上对牙齿萌出起重要的调控作用^[5,6]。目前关于牙囊细胞的体外培养, 国内外报道尚不多^[7]。本研究以 SD 大鼠为实验对象,

收稿日期: 2007-04-25

基金项目: 国家自然科学基金(30672318); 广东省卫生厅科技攻关项目(Z2005189)

作者简介: 谷海晶(1974-), 女, 山东威海人, 2002 届中山大学口腔专业硕士, 讲师, E-mail: guhj@sysu.edu.cn; 凌均荣, 通讯作者, 教授, 博士生导师

采用组织块培养法、细胞消化分散法及改良组织块法培养大鼠牙囊细胞,比较不同方法的优缺点,以寻求培养牙囊细胞的最佳方法,为研究牙囊在牙齿萌出过程中的作用在细胞方面提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂、仪器及动物实验来源

MEM培养基(GIBCO公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司),HEPES(Sigma公司,美国),胰蛋白酶(Advanced Technology & Industrial Company),左旋谷氨酰胺(GIBCO公司,美国),青霉素、链霉素(华北制药股份有限公司),丙酮酸钠(Sigma公司,美国),PBS(北京中山生物技术有限公司),细胞培养瓶(Corning, USA),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),细胞培养箱(Sanyo, Japan),倒置相差显微镜(Leica, Germany),SD乳鼠(中山大学动物实验中心)。

1.2 牙囊组织的分离与获取

取5只新生6或7d的SD乳鼠,引颈法处死后,用75%酒精浸泡2~3s,外科法取出下颌骨,置入D-Hanks'平衡盐溶液(含300U/mL青霉素,300 μ g/mL链霉素),在解剖显微镜下分离出下颌第1、第2磨牙牙胚。进一步在解剖显微镜下分离牙囊与成釉器,将分离出的牙囊组织立即置入MEM培养基中(含300U/mL青霉素,300 μ g/mL链霉素,pH7.2)。用眼科剪将组织块切成1~2mm大小的块。

1.3 牙囊细胞原代培养

1.3.1 组织块培养法 将上述方法获得的组织块离心5min,弃上清液,加入12%MEM培养基0.5mL,转入25cm²培养瓶中,用弯头吸管把组织小块摆布在培养瓶底上。小块相互距离0.5cm,轻轻翻转培养瓶,使牙囊组织贴附在培养瓶底,置入细胞培养箱中,于体积分数5%CO₂、37 $^{\circ}$ C饱和湿度条件下培养。12h补加1.5mL培养液,2~3d换液1次,细胞长满后传代,以1.25g/L胰蛋白酶和0.025%的EDTA(1:1)液消化。

1.3.2 细胞消化分散法 用眼科剪将组织块切成1~2mm大小的块,离心5min,弃上清液。1.25g/L胰蛋白酶消化10min,待组织块分散成细胞团或单个细胞,再次离心5min,弃上清液,加入12%MEM培养基2mL,置入25cm²培养瓶中,体积分

数5%CO₂、37 $^{\circ}$ C饱和湿度培养。2~3d换液1次,细胞生长形成单层后常规消化传代。

1.3.3 改良组织块法 采用细胞消化分散法与组织块培养法相结合法,用眼科剪将组织块切成1~2mm大小的块,离心5min,弃上清液。1.25g/L胰蛋白酶消化5min,再次离心5min,弃上清液,加入12%MEM培养基0.5mL,转入培养瓶,体积分数5%CO₂、37 $^{\circ}$ C饱和湿度条件下培养,12h后补加12%MEM培养基1.5mL。2~3d换液1次,细胞生长形成单层后常规消化传代。

1.4 牙囊细胞的传代培养

上述3种培养方法分别重复5次实验。将上述方法培养的原代细胞分别进行传代培养。弃去培养瓶内培养液,D-Hanks'平衡盐溶液洗涤细胞。加入1.25g/L胰蛋白酶和0.02%EDTA(1:1)液2mL。倒置显微镜下观察,梭形细胞在1~2min内收缩变圆,细胞相互分离。此时立即吸出消化液,加入12%MEM培养液4mL以终止消化。用弯头吸管吸取瓶内培养液,反复吹打10次左右,使细胞脱离瓶底形成细胞悬液。将细胞悬液按1:2进行培养,培养条件与原代相同。

1.5 透射电镜观察牙囊细胞

收集第3代细胞,加入2.5%戊二醛(0.1mol/L磷酸缓冲液,pH7.4,含有2.5mmol/L的氯化钙)固定15min。将全部细胞收集在锥形离心管内,经2000r/min离心15min成团。将团块转移至1.5mL EP管内,经3000r/min离心10min使细胞沉淀结块。用冷蔗糖缓冲液洗团块1h,4 $^{\circ}$ C条件下1%饿酸固定1~2h;体积分数50%、70%和90%丙酮脱水各10~15min,体积分数100%丙酮脱水30~45min。浸入1%丙酮包埋剂混合液,室温下放置1h。浸入环氧树脂37 $^{\circ}$ C 24h,60 $^{\circ}$ C 固化48h。AO切片机做超薄片切,制备电镜标本。标本用饱和醋酸铀水溶液染色10~15min,柠檬酸盐染色5~10min。透射电镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 不同方法培养的原代牙囊细胞

组织块法培养牙囊细胞,见组织块4h贴壁,24h见个别细胞从组织块中爬出,呈贴壁型生长,第3天时从组织块中爬出的细胞数量逐渐增多(图1),呈两种细胞形态。一种细胞呈梭形,中央

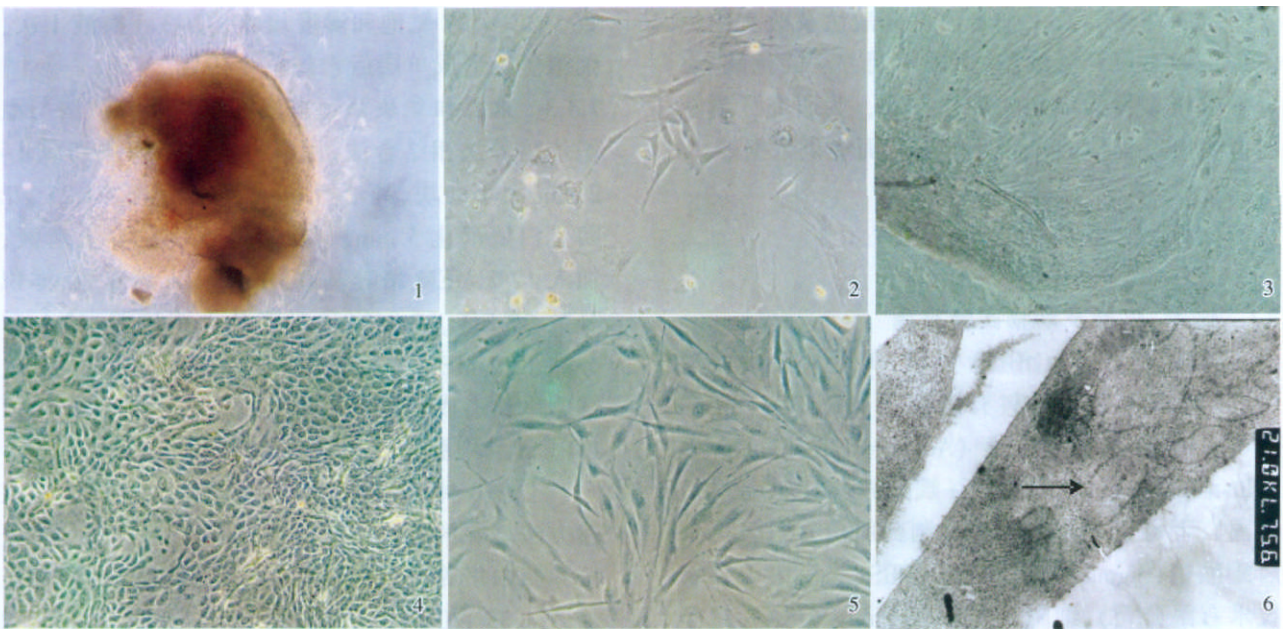


图 1 组织块法培养牙囊细胞至第 3 天梭形细胞游出

图 2 细胞消化分散法培养牙囊细胞至第 3 天

图 3 改良组织块法培养牙囊细胞至第 3 天

图 4 多角形细胞

图 5 第 2 代牙囊细胞

图 6 牙囊细胞胞浆中含丰富 RER (电镜)

Fig.1 The cultured dental follicle cells at the third day by methods of explant($\times 100$)

Fig.2 The cultured dental follicle cells at the third day

by methods of dissociation cell($\times 100$)

Fig.3 The cultured dental follicle cells at the third day by methods of improved explant($\times 100$)

Fig.4 Multi-angles cells($\times 100$)

Fig.5 The second passage dental follicle cells($\times 100$)

Fig.6 Electron micrograph of cultured dental follicle cells showing abundant RER($\times 21\ 000$)

有卵圆形核;另一种为上皮型细胞,呈扁平不规则多角形,中央有圆形核,且核较大。

细胞消化分散法培养牙囊细胞,可见细胞 6 h 贴壁,24 h 半数以上细胞恢复形态,呈梭形或扁平多角形,两种形态细胞混杂生长(图 2)。

改良组织块法培养牙囊细胞,可见消化后的组织块呈絮状,组织块 4 h 贴壁,24 h 可见细胞从组织块中爬出,培养至第 3 天时,组织块周围有大量梭形或不规则三角形细胞,呈放射状或旋涡状走形,为典型的成纤维细胞表现(图 3)。梭形细胞周围有上皮型细胞,随着梭形细胞增多,上皮型细胞数量也增多,并逐渐融合成单层细胞(图 4)。

2.2 细胞的传代和纯化

将 3 种方法获得的原代细胞,均采用胰蛋白酶和 EDTA 混合消化法传代,注入酶 2~3 min,即可见成纤维细胞样细胞胞质回缩,胞体趋于变圆,细胞间隙变大、分离。上皮样细胞则无上述变化。此时及时中止消化,进行吹打。将吹打脱落的细胞置入新培养瓶 6 h 后,细胞恢复形态,呈梭形或不规则三角形,并且部分开始分裂增生。改良组织块

法培养 6 d 左右第一次传代,传代培养至第 6 天见生长活跃的第 2 代牙囊细胞(图 5),传至第 3 代时,可得到纯化的牙囊细胞。

2.3 透射电镜下超微结构

细胞细长,两极明显。胞浆中含有丰富的粗面内质网(rough endoplasmic reticulum, RER),并在细胞两极处消失,有的 RER 囊状扩张,含有大量絮状物质,偶见高密度电子颗粒(图 6)。

2.4 三种方法培养结果的比较

采用 3 种方法各作 5 次培养,培养过程中细胞消化法出现 2 次污染,7 d 左右牙囊细胞增殖形成单层并进行第一次传代,成功率为 60%;组织块培养法未出现污染,出现一次组织块未贴壁,10 d 左右进行第一次传代,成功率为 80%;改良法培养过程中未出现污染,6 d 左右进行第一次传代,成功率为 100%。

3 讨 论

牙囊起源于外胚间充质,是包绕在成釉器外

围的一层致密的结缔组织,在牙齿发育后期形成牙骨质、牙周膜和固有牙槽骨。在牙齿发育及萌出过程中,牙囊细胞在上皮根鞘及牙乳头细胞的诱导下分化形成牙骨质细胞、成纤维细胞及成骨细胞,分泌牙骨质基质、胶原纤维、骨基质,最终形成牙周组织^[8,9]。有文献报道,体外培养的牙囊细胞具有某些成牙骨质、成骨样细胞表型^[10],最近有学者从永生化的牙囊细胞中分离出了成牙骨质的祖细胞成份^[7],进一步说明牙囊在牙齿萌出过程中,从组织、细胞和分子水平上对牙齿萌出起到重要的调控作用。牙囊细胞的体外培养是研究牙齿萌出过程中分子调控作用的细胞学基础。

体外培养牙囊细胞采用的动物模型主要有狗、小鼠和大鼠。文献报道中仅见牙囊细胞的细胞消化培养法^[4],细胞消化分散法是用胰蛋白酶分解牙囊组织,使之分散成牙囊细胞团或单个牙囊细胞,然后进行原代培养。由于该方法在消化分离过程中细胞损伤大,可影响细胞的贴壁和成活率,此外消化分散法获得的细胞中,往往由于消化得到单个细胞或者小的细胞团,因而容易混杂有杂质细胞,不利于牙囊细胞的纯化,在本实验中观察到混杂有较多的上皮细胞,获得的牙囊细胞纯度不高。本实验尝试采用组织块培养法培养大鼠牙囊细胞,并进一步摸索出改良组织块培养法,因而作者尝试采用组织块培养法是将牙囊组织剪切成1 mm大小的组织块,使之贴附于培养瓶底,待细胞从组织内爬出、生长以获得原代细胞,该方法获得的牙囊细胞纯度较高,但在实验过程中观察到:组织块接种后难离翻动和振动,使组织块不易贴壁;加入培养液后,受浸泡的组织块受液体轻微的波动及浮力作用易脱落下来,即使贴壁也难以生长;处于组织团块中心的细胞因营养穿透有限而代谢不良、生长缓慢,因而获得的牙囊细胞数量较少。因而培养效率降低,成功率为80%。

改良法是结合消化分散法和组织块法来培养牙囊细胞,同组织块培养方法一样,获得1~2 mm的牙囊组织块,但是将细胞分散法中的胰蛋白酶消化组织块时间由10 min缩短至5 min,这样获得的组织块大多变得疏松,细胞间距增大,但细胞之间未解离成单个散在细胞,仍呈团块状;同时由于缩短消化时间减少了消化酶对细胞的损耗,处于该状态的牙囊组织块,营养穿透性增强、细胞生长速度快,传代周期缩短,并且所得的牙囊细胞纯度高。而在预实验中发现将消化时间缩短在5~9 min时,则

相当一部分细胞脱离组织块,因而胰蛋白酶消化时间控制在5 min是比较好的消化时间。牙囊细胞与其他成纤维细胞具有许多共同的特征,本组通过电镜观察到培养的细胞浆中含有大量的高密度电子颗粒,这种高密度电子颗粒无膜包被,直径约6 μm,这是一个重要特征,除牙囊细胞外,还在牙齿萌出前期的星网状层出现,而在其他的成纤维细胞中不出现。改良法培养成功率达100%,高于组织块培养法(80%)和细胞消化分散法(60%),传代周期为6 d,也较另外两种方法缩短,因而改良法简便易行,成功率高,值得推荐。

参考文献:

- [1] WISE G E, LUMP KIN S J, HUANG H, et al. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption[J]. *J Dent Res*, 2000, 79(12): 1937-1942.
- [2] CAHILL D R, MARKS S C. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle [J]. *J Oral Path*, 1980, 9(4):189-200.
- [3] MARKS S C, CAHILL D R. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process[J]. *Arch Oral Biol*, 1984, 29(4):311-322.
- [4] LARSON E K, CAHILL D R, GORSKI J P, et al. The effect of removing the true dental follicle on premolar eruption in the dog [J]. *Arch Oral Biol*, 1994, 39(4): 271-275.
- [5] YAO S, PAN F, WISE G E. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat: implications for tooth eruption [J]. *Arch Oral Biol*, 2007, 52(3): 228-232.
- [6] LIU D, YAO S, WISE G E. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle [J]. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114(1): 42-49.
- [7] YAO S, NORTON J, WISE G E. Stability of cultured dental follicle cells [J]. *Cell Prolif*, 2004, 37(3): 247-254.
- [8] MOON I C, PHILIAS R G. Development and general structure of the periodontium [J]. *Periodontology*, 2000, 24(1):9-27.
- [9] 唐倩,梁焕友,刁惠波. IL-1对培养的人牙龈成纤维细胞间sICAM-1表达的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(增刊):21-23.
- [10] HANDA K, SAITO M, YAMAUCHI M, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells [J]. *Bone*, 2002, 3(5):606-611.

(编辑 王晓鹰)