

人牙髓干细胞和根尖乳头干细胞体外分化能力的对比研究*

谭小兵¹, 郭宇¹, 刘佳¹, 徐静舒¹, 戴青原^{2△}

(1. 云南省第一人民医院口腔内科, 昆明 650032; 2. 昆明医科大学第一附属医院心内科, 昆明 650032)

[摘要] **目的** 对比研究人牙髓干细胞(DPSCs)和根尖乳头干细胞(SCAP)的体外生长特性、增殖及矿化能力。**方法** 采用酶消化法体外培养人 DPSCs 和 SCAP, 诱导分化培养基诱导细胞成骨/成牙本质向分化, 流式细胞仪检测特异性标记物, 茜素红染色检测矿化程度, 逆转录 PCR(RT-PCR)检测分化标记物表达。**结果** 人 DPSCs 和 SCAP 为成纤维细胞样贴壁生长, SCAP 增殖率较高; 两种细胞表达特异性间充质干细胞(MSCs)标记物: CD34、CD45(-), CD90、CD105、CD146(+), 基质细胞抗原 1(STRO-1)、八聚体转录因子 4(OCT-4)(+), SCAP 特异性标记物 CD24(+). 成骨诱导 3 周可形成明显钙化结构, SCAP 钙化能力较强。成骨诱导 2 周 2 种细胞均可表达分化标记物: 骨涎蛋白、骨钙素、牙本质涎磷蛋白, 且随诱导时间表达逐渐增加。**结论** 人 DPSCs 和 SCAP 均具有间充质干细胞典型特征, 可分化为成牙本质样细胞, 是牙源性组织工程的可靠干细胞来源。

[关键词] 牙髓; 干细胞; 牙根尖; 牙再矿化; 组织工程**[中图分类号]** R781.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)05-0586-04

Comparative characterization of osteo/odontogenic differentiation capability of human dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in vitro*

Tan Xiaobing¹, Guo Yu¹, Liu Jia¹, Xu Jingshu¹, Dai Qingyuan^{2△}

(1. Department of Cariology and Endodontics, the First people's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To compare the growth characteristics, proliferation and osteo/odontogenic differentiation capability of stem cells from human dental pulp (dental pulp stem cells, DPSCs) and apical papilla (stem cells from apical papilla, SCAP) in vitro. **Methods** Human dental pulp and apical papilla tissues were separated from impacted third molars of young healthy donors at the age of root development and digested by collagenase type I and dispase type II to derive primitive DPSCs and SCAP. Cells were then induced for osteo/odontogenic differentiation by medium containing β -glycerophosphate, dexamethasone and KH_2PO_4 . Flow cytometry was utilized to test the expression of specific markers of stem cells, including CD24, CD34, CD45, CD90, CD105, CD146, STRO-1 and OCT-4. AR-S was used to display the mineralization structure and RT-PCR was applied to analyze the expression of bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN) and dentine sialophosphoprotein (DSPP). **Results** Both DPSCs and SCAP were positive for CD90, CD105, CD146, STRO-1 and OCT-4, in percentages varying according to cell type, without expression of CD34 or CD45. Only SCAP expressed CD24 positively. Both cells formed organized mineralization structure after 2 weeks of induction in time-dependent manner, with more mineralization by SCAP and expressed differentiation markers, including BSP, OCN and DSPP. **Conclusion** Human DPSCs and SCAP possess the characteristics of MSCs and could be differentiated into odontoblast-like cells in vitro. Both cells are approachable stem cell sources for dental tissue engineering.

[Key words] dental pulp; stem cells; tooth apex; tooth remineralization; tissue engineering

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新能力和多向分化潜能,能分化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞等^[1]。MSCs能进入生物材料内部生长、分化,可修复缺损组织^[2]。骨髓 MSCs(BMMSCs)是组织工程最为可靠的干细胞,但获取困难,细胞数量及增殖能力有限,限制了其进一步应用^[3]。最近人们成功从牙组织中分离出多种 MSCs:首先是牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)^[4];其后又发现另一种特性的 MSCs:根尖乳头干细胞(stem cell from apical papilla, SCAP)^[5]。与 BMMSCs 相比,牙源性 MSCs 易于获取,增殖速率高,体外蛋白表达模式相似,有多向分化潜能,牙源性 MSCs(包括 DPSCs、SCAP)均可在体外分化为成牙本质细胞,植入免疫缺陷小鼠皮下可形成牙髓-牙本质样复合体组织^[6-7]。

DPSCs 和 SCAP 来源组织结构相似、位置相邻,即牙髓和

根尖乳头组织。两种细胞虽然有相同特征,但二者遗传特性不同,有不同基因和蛋白表达模式,在不同微环境中功能也不同^[8]。本研究通过体外对比研究 DPSCs 和 SCAP 成骨/成牙本质分化能力,以了解不同牙源性 MSCs 的生物特性,为进一步牙髓再生研究提供研究基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 基础培养基(α -MEM)、I 型胶原酶、FITC 结合 CD24/34/45/基质细胞抗原 1(STRO-1)(小鼠抗人单抗)购自美国 Invitrogen 公司, FBS 购自美国 Hyclone 公司, II 型中性蛋白酶购自瑞士 Roche 公司, 70 μm 细胞滤网购自美国 BD 公司, 成人 MSCs 成骨诱导分化培养基购自广州赛业生物科技有限公司, PE 结合 CD90/105/146/八聚体转录因子 4(OCT-4)(小鼠抗人单抗)购自美国 eBioscience 公司, 总 RNA 提取试

试剂盒购自德国 Qiagen 公司, c-DNA 合成试剂盒/iTaq DNA 聚合酶/dNTP 混合物购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分离培养 收集阻生拔除的下颌第三磨牙(<20 岁), 无菌工作台内切取根尖孔外乳头组织; 釉牙骨质界处做一环形切口, 分离暴露髓腔, 30# k 锉取出牙髓组织。充分剪碎, 37℃、I 型胶原酶(3 mg/mL)与 II 型中性蛋白酶(4 mg/mL)混合液内振荡孵育 60 min, 离心, 弃上清液, 加入 α-MEM 完全培养基(α-MEM + 15% FBS+1% 谷氨酰胺+1% 青/链霉素), 过 70 μm 细胞滤器得到单细胞悬液, 加入适量完全培养基, 37℃、5% CO₂ 恒温箱内常规培养。第 2 天换液, 常规培养, 每日倒置相差显微镜下观察。细胞 90% 融合后传代培养, 第 2~5 代细胞用于实验。细胞计数: 两种细胞接种于 6 孔板(2×10⁵/孔), 每 24 小时计数细胞, 共培养 96 h, 绘制细胞生长曲线。本实验所有操作均符合云南省第一人民医院伦理委员会标准, 并取得患者书面同意。

1.2.2 成骨/成牙本质诱导 第 3 代 DPSCs、SCAP 接种于 6 孔板(2×10⁴/cm²), 第 2 天换为成骨诱导分化培养基(α-MEM 完全培养基+10 mmol/L β-磷酸甘油+0.1 μmol/L 地塞米松+50 μmol/L 抗坏血酸), 37℃、5% CO₂ 常规培养, 每 2~3 天换液, 共诱导 3 周。每周处理: 弃原液, PBS 清洗, 4% 甲醛室温固定 15 min, 1% 茜素红(美国 Sigma 公司)室温染色 20 min, PBS 清洗, 倒置相差显微镜(Olympus CKX-4, 日本)下, 观察矿化情况, 计算矿化比例。同等数量的 DPSCs 和 SCAP 接种于 6 孔板内常规培养, 作为正常对照。

1.2.3 细胞特异性标志物检测 收集第 3 代 DPSCs、SCAP, D-PBS 冲洗, 加入流式缓冲液吹打, 再加入 10 μL 相应抗体(CD24、CD34、CD45、CD90、CD105、CD146、STRO-1), 室温避

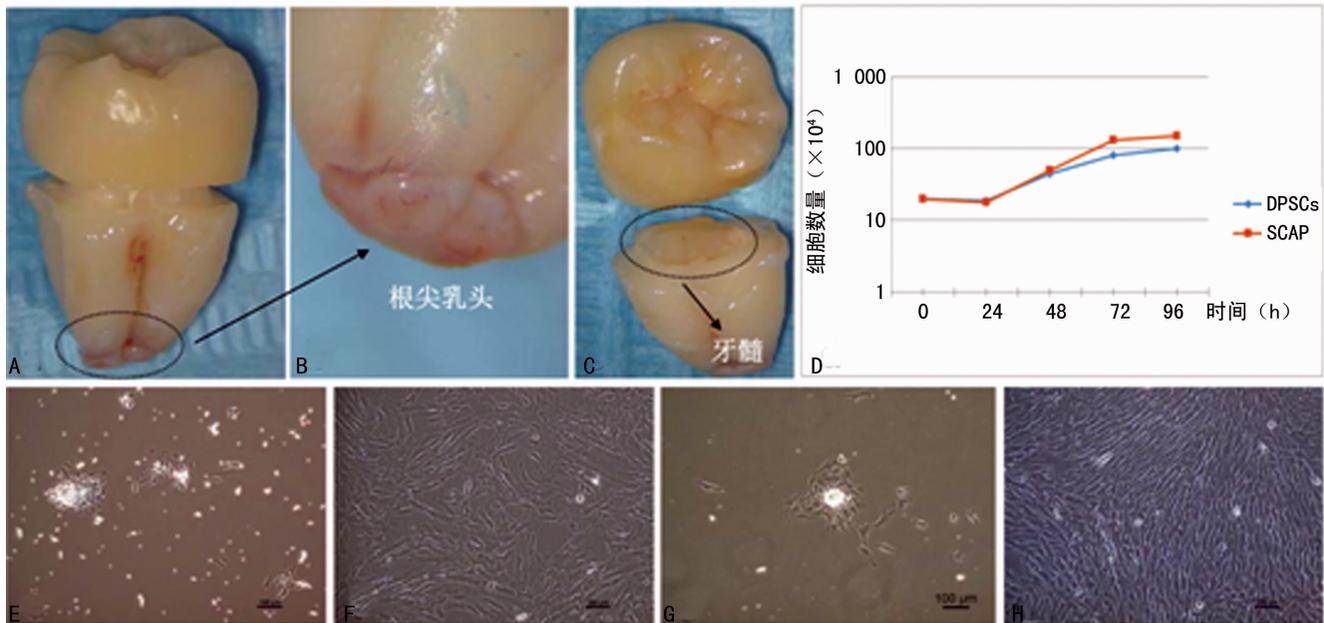
光孵育 30 min; 加入 1% PFA, 上机检测。OCT-4、IgG2ak-PE 抗体处理; 4% PFA-磷酸盐缓冲液(PBS)固定液、室温避光孵育 20 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1×细胞打孔液, 室温避光孵育 10 min, 同样条件离心、弃上清液, 加入对应抗体 10 μL, 再加入 D-PBS 混匀, 室温避光孵育 30 min, 加入 1% PFA 液, 流式细胞仪(美国贝克曼)检测, Summit 5.1 软件分析数据。

1.2.4 细胞成骨诱导分化标志物检测 成骨诱导 2 周后收集两种细胞, 总 RNA 试剂盒提取 RNA, 取 5 μL RNA, 紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)测量浓度, 20 μL 体系逆转录试剂盒合成单链 cDNA, 反应条件: 25℃ 5 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min, 4℃ 保存。检测 3 个相关基因: 骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP), GAPDH 为管家基因。根据目的基因设计引物(表 1)。PCR 反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 35 次; 72℃ 7 min, 4℃ 保存。电泳检测、成像。

1.3 统计学处理 SPSS12.0 软件进行分析, 两两比较用 t 检验, 检验水准 α=0.05。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态和生长特性 分离培养 1 d 即可看到单个细胞贴壁生长, 第 4 天形成克隆生长, SCAP 需 5~6 d 铺满培养瓶, DPSCs 要 10 d 形成单细胞层铺满。DPSCs 细胞为纺锤形、多角形或长梭形, 形态较大, 而 SCAP 细胞形态较小, 多为成纤维细胞样或星形, 有许多胞质突或伪足, 很快形成致密单细胞层。结果显示 DPSCs 和 SCAP 表现有不同增殖率, 相应细胞生长曲线也说明这一点(图 1)。



A、B、C: 下颌第三磨牙牙髓和根尖乳头组织; D: 细胞生长曲线; E: DPSCs 第 4 天(P0, 100×); F: DPSCs 第 10 天(P0, 100×); G: SCAP 第 4 天(P0, 100×); H: SCAP 第 10 天(P0, 100×)。

图 1 人 DPSCs 和 SCAP 原代培养(Olympus CKX-41 倒置相差显微镜)

2.2 细胞体外矿化 成骨/成牙本质诱导 1 周即观察到单层细胞边缘开始聚集并形成高密度团, SCAP 主要从周边向中央迁移形成细胞团, DPSCs 整层细胞卷曲形成细胞团, 同时有明显矿化结构形成。随着诱导时间延长, 矿化结构逐渐增多, 3

周后两种细胞都观察到大量棕红色钙化物, 诱导分化早期 DPSCs 矿化结构形成较多, 后期二者矿化比例相似, 但 SCAP 钙化物密度明显要高, 同时对照组内也出现极少量钙化结构(见图 2、表 2)。

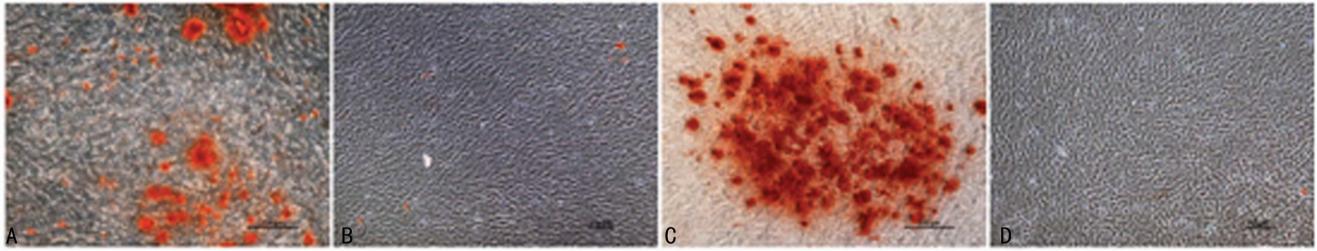


图 2 人 DPSCs 和 SCAP 诱导矿化组织染色(Olympus CKX-41 倒置相差显微镜)

表 1 BSP、OCN 及 DSPP 上下游引物碱基序列

基因	引物序列(5'-3')
BSP-F	ATG GAG AGG ACG CCA CGC CT
BSP-R	GGT GCC CTT GCC CTG CCT TC
OCN-F	GAC TGT GAC GAG TTG GCT GA
OCN-R	AAG AGG AAA GAA GGG TGC CT
DSPP-F	GGG ACA CAG GAA AAG CAG AA
DSPP-R	TGC TCC ATT CCC ACT AGG AC
GAPDH-F	GAA GGT GAA GGT CGG AGT
GAPDH-R	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

表 2 DPSCs 和 SCAP 不同时间矿化组织比例分析(%)

时间	DPSCs		SCAP	
	诱导	未诱导	诱导	未诱导
第 1 周	10~20	<5	5~10	<5
第 2 周	60~70	<5	50~60	<5
第 3 周	80~90	<5	80~90	<5

2.3 细胞特异性标志物 流式细胞检测结果显示 DPSCs、SCAP 均不表达 CD34、CD45, 几乎 100% DPSCs、SCAP 均为 CD90、CD105 阳性, CD146 染色均为强阳性(分别为 28.4%、54.8%)。细胞多潜能标记物 STRO-1(分别为 28.3%、12.4%), OCT-4(分别为 43.6%、58.0%)染色均为阳性。SCAP 表达特异性标记物 CD24(10.9%), 而 DPSCs 没有表达(图 3)。

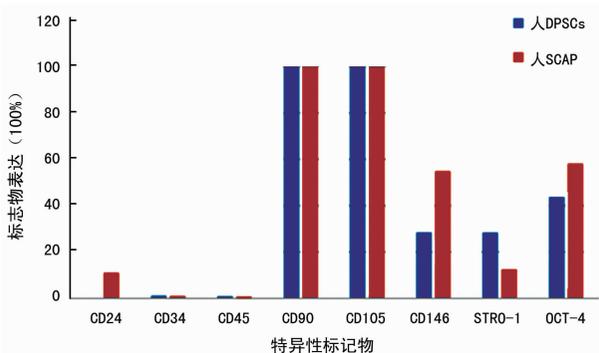


图 3 人 DPSCs 和 SCAP 特异性标志物流式检测

2.4 细胞分化标记物表达 DPSCs、SCAP 诱导第 1 周两种细胞即均有分化标记物的表达: BSP(322 bp 左右)、OCN(140 bp 左右)和 DSPP(226 bp 左右)。随着诱导时间的延长, 各标记物表达量明显增加。DPSCs 未诱导组第 1 和 2 周时也见

BSP、DSPP 和 OCN 的少量表达, SCAP 未诱导组的 DSPP 有少量表达(图 4)。

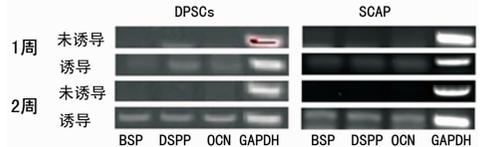


图 4 RT-PCR 检测 DPSCs 和 SCAP 诱导不同时间后 BSP、DSPP 及 OCN 的表达

3 讨论

本研究采用酶消化法进行人 DPSCs 和 SCAP 的原代分离, 酶消化法理论上会释放组织内包含的所有细胞, 来自于血管周围微环境中的成纤维样细胞、未成熟干/祖细胞、内皮细胞和周细胞会贴壁生长, 血细胞和碎屑则随细胞换液而去除^[9]。牙髓组织属于疏松结缔组织, 牙根尖乳头组织是根部牙髓组织的前体组织, 两种组织之间有一层富集细胞层, 酶消化法得到的 DPSCs 和 SCAP 均可形成具有不同特征的克隆形成单位——成纤维细胞(colonyforming unit-fibroblasts, CFU-Fs), 在同一克隆内有不同大小和形态的细胞, 其重要特性之一就是成牙本质细胞分化潜能^[10]。因此有必要指出, 与其他研究者相同^[11-12], 本研究中人 DPSCs 和 SCAP 也非纯干细胞培养, 主要混杂有血干/祖细胞及少量其他成纤维样细胞, 但两种细胞均取自同一个牙齿, 在同样环境下培养, 将同样的细胞混杂因素考虑在内, 对本实验对比结果并无影响。目前仍没有一个或几个标记物可以特异性鉴定人 DPSCs 和 SCAP, 主要参照 BMMSCs 的鉴定标准, 并结合细胞多向分化潜能及牙源性特异性标记物 DSPP 的表达。两种牙源性 MSCs 的具体定位尚不十分清楚, 可能位于血管周及神经鞘周^[13]。

本研究结果显示, SCAP 细胞为小圆形、纺锤形, 体外矿化能力强, 可能是由于根尖乳头组织尚未完全发育, 与 DPSCs 相比, SCAP 表现为更高的增殖率。CD34 和 CD45 选择性表达于哺乳动物造血干/祖细胞或所有白细胞表面。本研究 DPSCs 和 SCAP 均不表达 CD34、CD45, 说明无血细胞污染。CD90、CD105 为人 MSCs 特异性标记物, 本实验 DPSCs 和 SCAP 几乎均为 CD90、CD105 阳性, 纯度很好。CD24 是人根尖乳头干细胞特异性标记物, 表达率为 3.2%~15.3%, 在其他 MSCs 中没有表达, 包括 DPSCs, 本研究 SCAP 的 CD24 表达率为 10.9%, 与 Bakopoulou 等^[14]研究结果一致。CD146、STRO-1 均为 MSCs 表面标志物, 与细胞分化潜能有关, 本实验两种牙源性 MSCs 细胞 CD146、STRO-1 均为阳性, 说明 DPSCs 和 SCAP 有良好的自我更新能力和分化潜能, 与 Bakopoulou 等^[15]研究结果一致。本研究还检测了与干细胞维持自我更新能力有关的胞内标记物 OCT-4 的表达情况, 结果进一步说明了两种细胞的自我更新能力。

DPSCs 和 SCAP 成骨/成牙本质诱导 3 周后均能形成矿

化小节及三维矿化结构。成骨/成牙本质诱导液中添加成分在胞外基质矿化过程中发挥重要作用。地塞米松与 β -磷酸甘油、抗坏血酸体外协同作用可促进 MSCs 分化为成骨/成牙本质系,其适宜浓度为 $10\sim 100\text{ nmol/L}$ ^[16]。 β -磷酸甘油在矿化过程及成骨细胞活性调整方面起到重要作用,其功效与成骨/成牙本质细胞高碱性磷酸酶(ALP)活性密切相关, β -磷酸甘油与 KH_2PO_4 同时提供有机和无机磷酸根离子以促进生物矿化^[17]。细胞迁移和矿化结构形成也出现在正常对照组中,但数量非常少,因为缺乏有机和无机磷酸根离子的来源。

DPSCs 和 SCAP 诱导 1 周和 2 周后,成骨/成牙本质系分化标记物检测均有表达,包括 BSP、OCN、DSPP,且随着诱导时间延长,各标记物表达量明显增加,与文献^[18-19]研究结果一致。BSP 是主要的骨胞外基质涎蛋白,其表达与基质沉积同时出现,与矿化过程密切相关;OCN 是成骨细胞分化晚期标志物,其出现提示基质沉积的开始^[18]。DSPP 是 DSPP mRNA 初始翻译产物,随后分为牙本质磷蛋白和牙本质涎蛋白,是牙源性组织的特异性标记^[19]。DSPP 在牙本质形成过程中起关键作用,是成牙本质分化的相对特异性标记物。

本研究得到的 DPSCs 和 SCAP 能分化为成牙本质样细胞,具有迁移和矿化能力,可在体外形成有序矿化结构,为了解牙源性 MSCs 生物特性提供了实验证据,有助于牙源性干细胞用于牙髓再生等方面的研究。如何联合应用牙源性 MSCs、生物可吸收性支架(如聚乳酸-羟基乙酸共聚物、多肽凝胶等)、生长因子(如骨形态发生蛋白家族、趋化因子等)诱导牙髓再生是下一步的研究方向。

参考文献

- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- Kang R, Luo Y, Zou L, et al. Osteogenesis of human induced pluripotent stem cells derived mesenchymal stem cells on hydroxyapatite contained nanofibers [J]. *RSC Adv*, 2014, 4(11): 5734-5739.
- Han G, Jing Y, Zhang Y, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by adenovirus-mediated expression of leptin [J]. *Regul Pept*, 2010, 163(1): 107-112.
- Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, et al. A comparison of the in vitro mineralization and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp [J]. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33(4): 371-382.
- 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.
- Lei M, Li K, Li B, et al. Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(24): 6332-6343.
- Tran HLB, Doan VN. Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived scaffold can regenerate dentin-like tissue in vivo [J]. *Cell Tissue Bank*, 2015, 16(4): 559-568.
- Syed-Picard FN, Du Y, Lathrop KL, et al. Dental pulp stem cells: a new cellular resource for corneal stromal regeneration [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2015, 4(3): 276-285.
- Garg A, Houlihan DD, Aldridge V, et al. Non-enzymatic dissociation of human mesenchymal stromal cells improves chemokine-dependent migration and maintains immunosuppressive function [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(4): 545-559.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine [J]. *J Dent Res*, 2009, 88(9): 792-806.
- Abuarqoub D, Awidi A, Abuharfeil N. Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(10): 1545-1553.
- Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, et al. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(11): 1205-1216.
- Liu J, Yu F, Sun Y, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(3): 627-638.
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative characterization of STRO-1 (neg)/CD146 (pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry [J]. *Arch Oral Biol*, 2013, 58(10): 1556-1568.
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative analysis of in vitro steo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP) [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(7): 709-721.
- Ghali O, Broux O, Falgayrac G, et al. Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation [J]. *BMC Cell Biology*, 2015(1): 9.
- Tan K, Sim E, Shekaran A, et al. Efficient expansion and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in microcarrier culture [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(4): S87.
- Paino F, Noce M, Tirino V, et al. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(1): 279-289.
- Guo S, Lim D, Dong Z, et al. Dentin sialophosphoprotein: a regulatory protein for dental pulp stem cell identity and fate [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(23): 2883-2894.