

[文章编号 1000-1182(2004)04-0275-03]

成骨细胞和牙周膜成纤维细胞交互作用的初探

宫 苹, 谭 震, 赵 青

(口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 了解牙周组织再生中两种重要的细胞(成骨细胞和牙周膜成纤维细胞)之间的相互调控作用,以探讨牙周膜形成和维持的相关因素及其对牙种植体周围结构的影响机制。方法 采用原代培养法获取同一 SD 大鼠的成骨细胞和牙周膜成纤维细胞,将两种细胞分别接种于培养板上,再置于细胞培养池中以建立体外共同培养模型,分别测试两种细胞的碱性磷酸酶(ALP)及 I 型胶原表达。结果 两种细胞在共同培养后,其 ALP 活性都发生显著变化,牙周膜成纤维细胞 ALP 表达明显提高,而成骨细胞 ALP 则降低; I 型胶原未发生显著变化。结论 当两种细胞在体外共同培养时,牙周膜成纤维细胞能抑制成骨细胞的成骨作用,而成骨细胞则能诱导牙周膜成纤维细胞向成骨样细胞分化。

[关键词] 牙周膜成纤维细胞; 成骨细胞; 细胞共同培养

[中图分类号] Q2 **[文献标识码]** A

Interaction between Osteoblasts and Fibroblasts Derived from Same Individual GONG Ping, TAN Zhen, ZHAO Qing.

(Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** In order to determine the effect of factors pertaining to the development and metabolism of periodontal ligament, the author investigated the interaction between osteoblasts and fibroblasts. **Methods** The cell co-culture model was established by cell culture inserts. The expression difference of protein related to mineralization (ALP, Type I collagen) between these two kinds of cells cultured individually and co-cultured were evaluated. **Results** Co-culture changed the ALPase activity of the two kinds of cells greatly. The ALP expression of osteoblasts decreased, but the ALP expression of periodontal ligament fibroblasts increased. The Col-I expression of these two kinds of cells did not change significantly when they were co-cultured. **Conclusion** Periodontal ligament fibroblast could restrain the osteogenesis function of osteoblast, while osteoblast could induce the differentiation of fibroblast when both of them existed in periodontal tissue.

[Key words] periodontal ligament fibroblast; osteoblast; cell co-culture

天然牙周膜界面有多种细胞组分,这些细胞组分在长期的发生、发展中达到了彼此的平衡。它们的生物学特性受到多方面的调控,如:同种细胞,异种细胞,细胞外基质,或其他生物因子等等。成骨细胞和牙周膜成纤维细胞是其中的两种重要的细胞成分,它们对于维持正常牙周膜的生理功能起关键作用。本实验的目的是了解来源于同一个体的成骨细胞和牙周膜成纤维细胞之间的相互影响,以探讨牙周膜形成和再生的相关因素,为今后探索其对牙种植体周围结构形成的影响机制提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

二氧化碳恒温孵箱(SANYO 公司,美国),生物倒

置相差显微镜(OLYMPUS 公司,日本),细胞培养池(Gibco 公司,美国),体视显微镜及光源(OLYMPUS 公司,日本),超净工作台(NUAIRE 公司,美国),培养瓶、皿,高糖 DMEM(dulbecco's modified eagle's medium, Gibco 公司,美国),洗必泰,次氯酸钠溶液(分析纯),胰蛋白酶,EDTA(二乙烯四乙酸二钠),I 型胶原酶(Sigma 公司,美国),兔抗鼠 I 型胶原多克隆抗体,生物素标记的羊抗兔二抗,辣根酶标记的链霉卵白素,DAB 显色剂,8 周龄 SD 雄性大鼠。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养 采用酶消化结合组织块培养法培养牙周膜成纤维细胞。取 8 周龄 SD 雄性大鼠颌骨,用洗必泰、冰冷含双抗的 DMEM 反复冲洗,在体视显微镜下分离牙齿。用手术刀去除根冠方、根尖 1/3 的牙龈及牙周膜,用拔髓针去除牙髓;将牙冠浸入 5.25% 次氯酸钠 2 min,并用少量次氯酸钠溶液冲洗髓腔;用大量生理盐水、DMEM(含双抗)冲洗牙冠和髓腔;将牙齿置入离心管,加入 0.125% 胰蛋白酶及 0.1% 胶原酶 5 ml,分阶段消化,离心,将固体成分用

[收稿日期 2004-01-08; 修回日期 2004-06-08]

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(B120010610059)

[作者简介] 宫 苹(1960-),女,山东人,教授,博士

[通讯作者] 宫 苹, Tel: 028-85503579

该培养基稀释至 2 ml,移入培养皿,置于 37℃ 恒温孵箱中培养。常规换液培养、传代。

采用组织块培养法培养成骨细胞。取同一大鼠的颅盖骨 10 mm²,用生理盐水冲洗,彻底剥离骨片上的软组织;将骨块剪碎成 1~3 mm³ 的碎块,胰酶消化,去除消化液,小牛血清终止消化,培养基冲洗;将碎骨块接种于培养瓶,常规换液培养、传代。

两种细胞经原代培养,鉴定,传代培养至第五代,获得足够的细胞量用于实验。

1.2.2 建立共同培养模型 在两个直径 60 mm 的培养皿中置入标准塑料片用于测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和玻片(用于免疫组化)数个,玻片的面积大小一致(在玻片上作好标记,以区分正反面)。加少量全培养基后再按每毫升 1×10⁶ 接种两种细胞,尽量使细胞生长于培养片的上表面。显微镜下观察细胞在培养片上长满后,再将部分玻片和塑料片移至细胞培养池和配套的六孔培养板内,培养池内为成纤维细胞,培养板内为成骨细胞。注意细胞的生长面向上,常规换液培养 6 d(细胞共同培养模型见图 1)。

实验分为 4 组。第 1 组为成骨细胞单独培养组;第 2 组为与成纤维细胞共同培养的成骨细胞组;第 3 组为成纤维细胞单独培养组;第 4 组为与成骨细胞共同培养的成纤维细胞组。

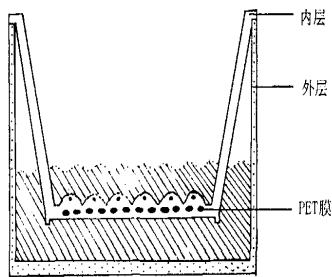


图 1 细胞共同培养模型

Fig 1 Model of cell co-culture

1.2.3 碱性磷酸酶(ALP)活性的测定 去除培养基,将长满细胞的标准塑料片取出,超纯水洗 2 次,置于 24 孔培养板中,每孔 1 片,再分别加入细胞裂解液(Tris, 10 mmol/L, pH 7.4; 0.5% 三硝基甲苯 Triton X-100) 200 μl, 37℃ 裂解约 4 h,适当吹打,收集裂解液¹。

取裂解液 50 μl,加入底物 50 μl (5 mmol/L p-nitropheny phosphate,溶于 50 mmol/L Glycine, 1 mmol/L MgCl₂, pH 10.5), 37℃ 保温 5~20 min, 420 nm 波长测定 OD 值²。

1.2.4 型胶原免疫组化染色 常规丙酮固定,用 Triton X-100 打孔 10 min, 3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶,加 10% 羊血清孵育 20 min;然后吸去血清,依次

加入一抗、二抗、辣根酶标记的链霉卵白素, DAB 显色 5 min,苏木素复染 3 min,封片。

免疫组化结果以胞浆/细胞间质无棕色反应为阴性,出现棕色为 型胶原阳性。

1.2.5 图像分析 免疫组化结果采用图像分析仪 (spot diagnostic instruments inc, version 3.0) 分析,在低倍镜下随机锁定多个视野,再用分析软件 Image-Pro Plus 进行分析。每组测定 27 个点的灰度值(平均密度值),按顺序去除 9 个最大值, 9 个最小值,剩下值为测定结果。

1.2.6 统计学分析 测量结果以均值(\bar{x})±标准差(s)列出,统计方法用单因素方差分析, SNK 法做两两比较, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两种细胞 ALP 的变化

成骨细胞和成纤维细胞单独培养和共同培养时碱性磷酸酶表达见表 1。单因素方差分析得 $F=216.048$, $P<0.01$,可知 4 组均数不都相同, SNK 检验得各组间差别都有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 碱性磷酸酶 OD 值($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The optical density of ALP($\bar{x} \pm s$)

细胞类别	培养方式	
	单独培养	共同培养
成骨细胞	0.683 2 ±0.054 9	0.241 5 ±0.045 7
成纤维细胞	0.071 0 ±0.021 2	0.169 3 ±0.005 1

2.2 两种细胞 型胶原变化

经 ABC 法染色, 型胶原抗体染色细胞核周围呈黄褐色阳性,成骨细胞和成纤维细胞单独培养和共同培养时 型胶原表达光密度值见表 2。单因素方差分析得 $F=3.873$, $P<0.05$,可知 4 组均数不都相同, SNK 检验得第 1 组与第 2 组、第 3 组差别无统计学意义,第 3 组和第 4 组差别无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 型胶原表达平均密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The mean density of osteoblasts and fibroblasts($\bar{x} \pm s$)

细胞类别	培养方式	
	单独培养	共同培养
成骨细胞	160.887 8 ±17.649 7	159.728 9 ±16.475 7
成纤维细胞	175.078 9 ±16.002 0	181.115 6 ±14.139 6

3 讨论

牙周膜在健康状态下保持生理和代谢平衡,源于其结构中多种细胞通过一定的途径相互作用,彼此间进行数量和位置的相互调控³。在牙周组织界面有

成牙骨质细胞、成骨细胞和牙周膜成纤维细胞等。其中,成牙骨质细胞和成骨细胞来源相同,有较高的矿化能力⁴,而且成骨细胞可以修复牙骨质缺损,故成骨细胞与牙周膜成纤维细胞的关系在牙周膜的改建中处于核心地位⁵。本实验采用细胞培养池进行成骨细胞和成纤维细胞的共同培养,可同时检测交互作用对两种细胞的影响,较以往相关研究有明显的改进⁶。

3.1 两种细胞碱性磷酸酶(ALP)的表达

ALP是反映细胞向成熟骨细胞分化的重要标志之一,也是细胞分化活跃和具有成骨能力的标志之一,在牙周膜成纤维细胞分化和向成骨样细胞转化中起重要作用。由实验结果可知牙周膜细胞也表达ALP,但较成骨细胞低,Arceo等⁷也发现PDL细胞ALP表达明显高于同一患者体外培养的同代牙龈成纤维细胞,且可形成矿化小节,一般认为这是体外成骨样细胞的特点。

本实验结果证明,当成骨细胞与牙周膜成纤维细胞共同培养后,二者碱性磷酸酶表达都发生了变化,表明两种细胞在功能上具有相互调控的作用。牙周膜成纤维细胞单独培养时所表达的ALP较低,当两种细胞共同培养后,其ALP表达明显提高;成骨细胞与牙周膜成纤维细胞共同培养后,成骨细胞ALP表达有所下降,故认为牙周膜成纤维细胞降低了成骨细胞的钙化能力,抑制了局部骨质的形成;成骨细胞则诱导了牙周膜成纤维细胞向成骨样细胞分化,两种细胞之间有一定的互相调控作用。

成纤维细胞抑制成骨细胞的作用表现在体内牙周膜结构宽度的保持及发育期颅骨骨缝的维持中⁸。其机制可能是成纤维细胞分泌的前列腺素(prostaglandins,PG)等物质抑制了成骨细胞的成骨作用,用环加样酶抑制剂吲哚美辛、前列腺素E₂(PGE₂)和前列腺素F₂(PGF₂)抗体可降低其影响⁶。本实验从矿化蛋白的表达方面证明了牙周膜成纤维细胞对成骨细胞成骨作用的抑制。

成骨细胞、成纤维细胞都能分泌胶原纤维和有机基质,但成骨细胞分泌的纤维和基质能钙化成骨组织,而成纤维细胞分泌的纤维和基质一般没有钙化成骨的现象发生。推测其原因与胶原纤维和蛋白多糖共同形成的立体化学结构、成骨细胞所含有的碱性磷酸酶和无机焦磷酸酶等有关。学者^{9,10}研究表明,成纤维细胞表达ALP,在受到一些成骨因子的诱导后会表现一定的成骨作用。本实验结果证明了此点。

3.2 两种细胞Ⅰ型胶原的表达

Ⅰ型胶原是成骨细胞和成纤维细胞分泌的最主要的蛋白质。在牙周膜中,其主要功能是作为生物矿

化过程中的支架,同时赋予组织张力,为牙周组织的主要支持结构。在牙槽骨中,Ⅰ型胶原是钙化结节形成的必要成分,骨组织的主要有机成分,亦是成骨细胞表型和形成钙结节的基本保障^{7,11}。本实验发现,成骨细胞和牙周膜成纤维细胞单独培养时的Ⅰ型胶原表达无明显差异,当两种细胞共同培养后,其表达也未发生显著变化。这充分体现了Ⅰ型胶原表达具有较强的稳定性¹¹。

当然,细胞之间的交互作用还包括细胞直接接触,由膜蛋白介导的交互作用等途径,这些调控方式如何对牙周组织改建产生影响尚有待于进一步研究。同时,本实验结果提示,细胞之间的交互作用可能影响到种植体周界面的形成,在诱导形成骨结合界面和类牙周膜界面时必须充分考虑到这些因素。

[参考文献]

- 1] Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, et al. Osteogenic potential *in vitro* of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic J. J Biomed Mater Res, 1999, 44(1): 98-108.
- 2] Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation J. J Cellular Biochem, 1997, 64(2): 278-294.
- 3] Amar S, Chung KM. Clinical implications of cellular biologic advances in periodontal regeneration J. Curr Opin Periodontol, 1994, 18(2): 128-140.
- 4] Lang H, Schuler N, Arnhold S, et al. Formation of differentiated tissues *in vivo* by periodontal cell populations cultured *in vitro* J. J Dent Res, 1995, 74(5): 1219-1225.
- 5] Lindskog S, Blom L. Quality of periodontal healing. IV: enzyme histochemical evidence for an osteoblast origin of reparative cementum J. Swed Dent J, 1994, 18(5): 181-189.
- 6] Ogiso B, Hughes H, Melcher AH. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells *in vitro* J. J Cell Physiol, 1991, 146(3): 442-450.
- 7] Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, et al. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro* J. J Periodontol, 1991, 62(8): 499-503.
- 8] Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat J. Anat Rec, 1980, 19(6): 191-200.
- 9] Sampath TK, DeSimone DP, Reddi AH. Extracellular bone matrix-derived growth factor J. Exp Cell Res, 1982, 142(2): 460-464.
- 10] Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography J. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(20): 7109-7113.
- 11] Owe TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationship in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of bone ECM J. J Cell Physiol, 1990, 143(3): 420-430.