昆明医科大学学报 2012,(7):36~40
Journal of Kunming Medical University
CN 53 -1049/R

联合培养法进行人牙周膜细胞的比较培养与鉴定

仲维广[1)]，纪舒昱[1)]，胥 春[2)]，郑根建[1)]，于蕾[1)]，张富强[2)]
(1) 海南医学院附属医院口腔科，海南 海口 570102；2）上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔修复科，上海 200011)

［摘要］**目的** 比较消化法与组织块法联合培养与单纯组织块法两种方法获得人牙周膜细胞的成功率及细胞来源鉴定情况. **方法** 刮取因正畸需要而拔牙的牙周膜，分别进行组织块法和消化法与组织块法联合培养进行人牙周膜细胞的原代培养，并进行波形丝蛋白、角蛋白和碱性磷酸酶（ALP）的检测，以鉴定细胞来源. **结果** 组织块法在1~2周内有原代细胞游出. 在第2或第3天，联合培养法消化游离出来的细胞开始贴壁，消化后的疏松状牙周膜亦可贴壁，且有细胞爬出. 组织块法的成功率为27%，联合培养法成功率为70%. ABC免异组化法及ALP鉴定其为非牙龈来源的中胚层细胞. **结论** 联合培养法可显著提高原代细胞培养的成功率，并在短期内获得大量和相对纯化的实验用细胞.

［关键词］人牙周膜成纤维细胞；组织块法；消化法与组织块联合培养法；细胞来源鉴定
［中图分类号］R34 ［文献标识码］A ［文章编号］1003-4706（2012）07-0036-05

Culture and Identification of Human Periodontal Ligment Cells by Combined Method

ZHONG Wei-guang[1)], JI Shu-yu[1)], XU Chun[2)], ZHENG Gen-jian[1)], YU Lei[1)], ZHANG Fu-qiang[2)]
(1) Dept. of Stomatology, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570102; 2) Dept. of Prosthodontics, The Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

［**Abstract**］Objective To evaluate the success rate of obtaining human periodontal ligment cells（HPLCs）and cells identification in vitro. Methods We scraped the periodontal ligament from human teeth which were extracted from who need to orthodontic repair, and obtained the HPLCs by tissue block method and combined method of enzymolytic and tissue block. Cells were indentified through detecting vimentin, keratin and Alkaline Phosphatase（ALP）. Results The cells emigrated from tissue block after 1-2 weeks in tissue block method, however cells attachment occurred after 2-3 days in combined method. The success rate of tissue block method and combined method was 27% and 70%, respectively. The cells cultured were indentified as non-gingival derived mesoblastemas by ABC immunohistochemistry and ALP method. Conclusion Combined culture method could improve success rate of primary culture cells apparently and obtain plenty of cells in short time.

［**Key words**］Human periodontal ligament cells; Tissue block method; Combined method; Identification of cell source.

牙周膜介于牙槽骨和牙骨质之间，厚度通常为0.15~0.38 mm，是稳固牙齿的重要结构. 牙周膜细胞是牙周膜的主要功能细胞，其中包含未分化的间充质干细胞，可以向牙骨质、牙槽骨等分化. 所

［基金项目］上海市重点学科建设项目(T0202，S30206-sms02)
［作者简介］仲维广（1973~），男，吉林吉林市人，医学博士，主治医师，主要从事牙齿组织工程、口腔修复学工作.
［通讯作者］张富强. E-mail:fredzc@online.sh.cn

以牙周膜细胞与牙周组织健康有直接的关系，尤其在牙周膜和牙槽骨的改建过程中起重要的作用. 在口腔环境中，牙周膜不断承受牙齿所传递的咬合力、正畸力等，对牙周膜细胞的分化、增殖和代谢产生一定影响. 进行体外实验通常是以细胞培养为条件，体外培养细胞可以排除复杂的体内环境对细胞可能产生的影响. 通过研究单一因素对细胞的调节作用，则可以阐明这一因素可能的作用机制. 目前国内外学者对牙周膜细胞的研究大都采用组织块法或酶消化法获得. 本实验拟采用联合培养法（消化法与组织块法结合）和单纯组织块法培养技术，进行人牙周膜成纤维细胞的比较培养及鉴定，以期探讨更为有效、便捷的获取人牙周膜细胞的方法.

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

DMEM 培养基（Gibco，Grand Island，NY，USA）；注射用硫酸链霉素、青霉素钠（上海新先锋制药有限公司）；碱性磷酸酶（上海仁宝医用试剂研究有限公司）；胎牛血清（Hyclone，Logan，Utah，USA）；胰蛋白酶（Gibco，Grand Island，NY，USA）；ABC 免疫组化试剂盒（Vector，USA）；96 孔培养板（Corning，NY，美国）；二氧化碳恒温培养箱（WJ–80L，ThermoForma，美国）；YJ－875 型超净工作台（苏州净化设备厂）；倒置相差显微镜（Leica，Germany）；全自动微板读数仪（Biohit BP800 Bio–Tek Instruments USA）；低温高速离心机（Heraus 28 RS，Germany）

1.2　方法

1.2.1　组织块法培养人牙周膜细胞（HPDL 细胞）　征求患者或 / 和其家长同意后，取年龄 15～25 岁，性别不限，因正畸需要而拔除的正常牙齿，牙齿拔除后立即将其置入分别含 100 u/mL 青霉素和链霉素的 D–Hank's 溶液中暂时保存. 尽快在超净台内将牙冠向下，用 D–Hank's 溶液从根尖开始冲洗约 30 s，以去除牙齿上可能的污染物，然后将牙冠部分浸入 75%酒精内约 2 min. 用眼科剪刮取牙根中部 1/3 的牙周膜，将其剪成约 1 mm 大小的碎块，均匀铺于无菌的 25 mL 培养瓶底，将瓶底向上，加入含 15 %胎牛血清（FBS）、100 u/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基 4ml. 然后将培养瓶置于 5% CO_2、37 ℃、100%湿度条件下的培养箱内孵育，3 h 后将瓶底翻转向下继续培养. 倒置相差显微镜下观察细胞游出及生长情况，约 4～5 d 换液一次，等待细胞从组织块中爬出.

1.2.2　消化法与组织块法联合培养　牙齿的取材及刮取方法同以上组织块法，用眼科剪将牙周膜剪成约 1～2 mm 碎块. 然后将牙周膜碎块用含 EDTA（0.02%）的胰蛋白酶（0.25%）消化 5min 后 800 转 /min 进行离心，弃去上清液. 再用Ⅰ型胶原酶（1%）于摇床内，保持 37 ℃持续消化 45 min，800 转 /min 离心，弃上清，再加入 5 mL DMEM 培养基，用吸管轻轻吹打混匀后，将组织块与消化下来的细胞移入 25 mL 培养瓶中，放置于细胞培养箱（37 ℃、5%、100%湿度）进行培养.

1.2.3　HPDL 细胞的传代培养　待组织块法的 HPDL 细胞从组织块中爬出来，或联合培养法的游离细胞贴壁，以及有细胞从消化后的组织块中爬出. 细胞生长增殖铺满瓶底约 80%后. 在超净台内先将培养瓶中的 DMEM 培养液弃之，再用 D－Hank's 溶液漂洗 2 次. 用含 EDTA（0.02%）的 0.25%胰蛋白酶对贴壁细胞进行处理，同时在倒置相差显微镜下观察细胞变化，当细胞之间的连接逐渐分离而呈圆形，一般约 5 min 后用 DMEM 培养液终止消化，用滴管轻轻吹打使细胞脱离瓶底. 将细胞悬液转移至离心管，以 800 转 /min，离心 5 min，弃上清液，传代比例为 1:1，然后用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养.

1.2.4　细胞生长曲线绘制　取第 4 代 HPDL 细胞，以 0.25%胰蛋白酶消化，用含 10% FBS 的 DMEM 培养液调整细胞数至 1×10^4/m L，将细胞悬液接种于 8 个 96 孔细胞培养板中，每孔 200 μL，然后分别在接种细胞后的每一天取一个 96 孔细胞培养板，共 8 d. 分别在取出的培养板的每孔中加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL，37 ℃的细胞培养箱内继续孵育 4h，然后小心吸弃各孔中的培养液后加入 150 μL二甲基亚砜（dimethyl sulphoxide，DMSO），振荡 10 min. 将各孔中液体转移至比色用 96 孔板中，在全自动微板读数仪上，选择 490 nm 波长进行比色，测定各孔光吸收值（OD 值），绘制生长曲线.

1.2.5　细胞来源的鉴定　将第 4 代细胞消化后，接种于放有消毒好的盖玻片的培养皿中进行培养，3 d 后取附着有 HPDL 细胞的盖玻片 3 张，分别用 ABC 免异组化法进波形丝蛋白，角蛋白单抗染色和碱性磷酸酶（ALP）染色，封片后光镜观察，HE 染色作为对照.

2 结果

2.1 细胞生长情况观察

每天在倒置显微镜下观察原代细胞的生长状况. 在组织块法实验组中，一般情况下 1～2 周内有原代细胞从组织块边缘游离出来，以组织块为中心呈放射状排列生长，细胞呈长梭形，胞体较丰满，胞浆均匀，细胞核呈圆形，核仁清晰. 联合培养法的细胞一般在 2～3 d 内，多数被消化游离出来的细胞即开始贴壁，并且有少量消化后的疏松的牙周膜亦可贴壁，而且在其边缘有细胞爬出（见图 1）. 在 12 代以前，牙周膜细胞的生长速度较快，生长旺盛，状态良好. 见图 2 为培养 2、4、6、8 d 时，第 4 代 HPDL 细胞的生长情况，可见在培养 2 d 细胞贴壁良好，呈长梭型或多角形. 在培养 8 d 后细胞呈密集排列，相互接触，已经铺满培养瓶底. 一般 12 代以后的细胞逐渐呈衰老生状，胞体变大，细胞生长缓慢. 细胞生长曲线绘制，见图3.

通过对人牙周膜细胞 1～8 d 的连续培养，实验发现在接种后第 2 天细胞数逐渐增加，第 4 天开始倍增，第 7 天达到峰值，第 8 天与第 7 天的细胞数量无明显变化. 通过 MTT 法对不同天数的细胞检测其 OD 值，并绘制出细胞生长曲线如图 3 所示，细胞生长曲线呈“S”型，两种培养方法的细胞生长曲线无明显变化.

2.2 人牙周膜细胞的来源鉴定

通过 ABC 法对人牙周膜细胞进行抗波形丝蛋白、抗角蛋白抗体染色. 本实验所分离培养的 HPDL 细胞均表现出明显的抗波形丝蛋白阳性（见图 4），在胞浆内阳性颗粒分布均匀，抗角蛋白阴性(见图 5)，提示细胞均为间充质来源，而非上皮来源. 同时碱性磷酸酶（ALP）检测呈阳性（见图 6），从而与牙龈组织来源的牙龈成纤维细胞相区别，牙龈成纤维细胞 ALP 染色为阴性. 另外 HE 染色显示细胞呈梭型或多边形，胞核蓝染，位于胞体中央，细胞核有分裂相（见图 7）.

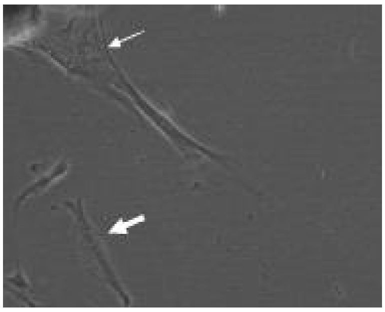

图 1 细胞从组织块边缘爬出（细箭头处），消化游离细胞亦贴壁生长（粗箭头处）（×100）

Fig. 1 HPDL cells growed from the border of the tissue（×100）

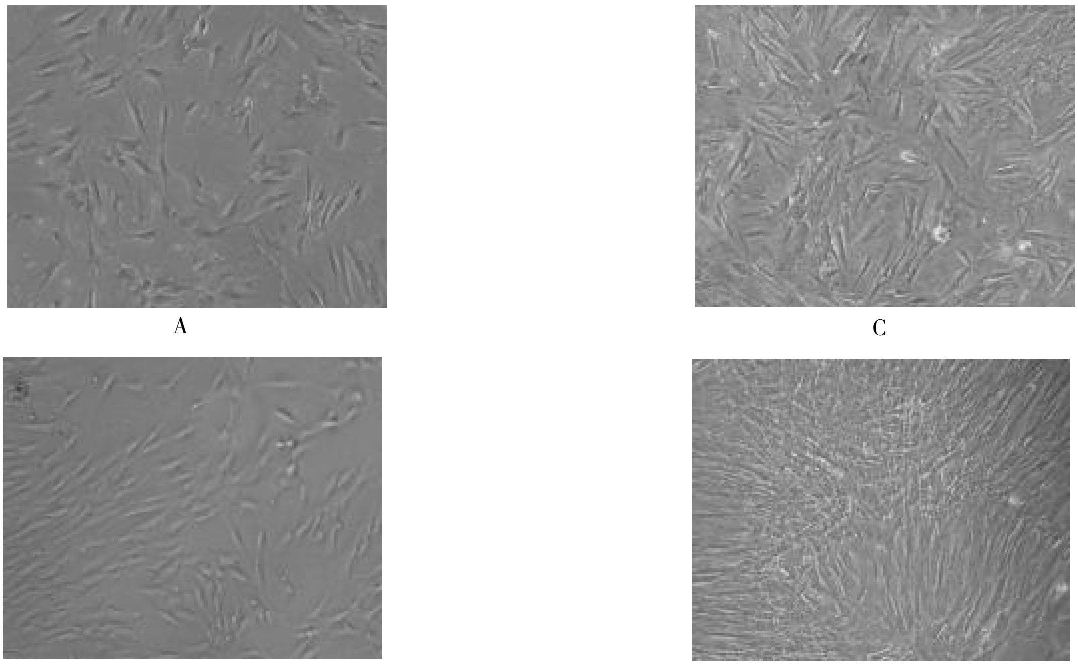

图 2 人牙周膜细胞的传代培养（×100）

Fig. 2 HPDL cells were passaged

A:传第 4 代细胞，培养 2 天贴壁良好，呈梭型或多角形；B:第 4 代细胞培养第 4 天，细胞有一定增殖，部分细胞相互接触；C:培养第 6 天，细胞相互汇合,数量明显增加；D:细胞培养第 8 天细胞数量明显增加，细胞呈长梭型并密集排列

图 4 Vimentin（+）阳性表明为间充质来源（×400）

Fig. 4 Vimentin (+) positive, means it derived from mesenchymal（×400）

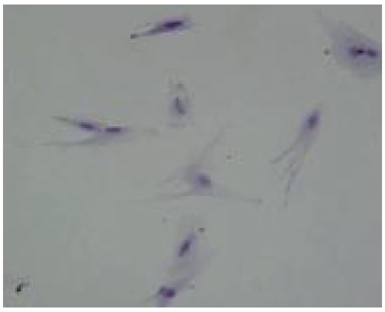

图 5 CK（-）角蛋白为阴性，表明非上皮源性质来源（×400）

Fig. 5 CK(-) keratin negative, means it derived from non-epithelium（×400）

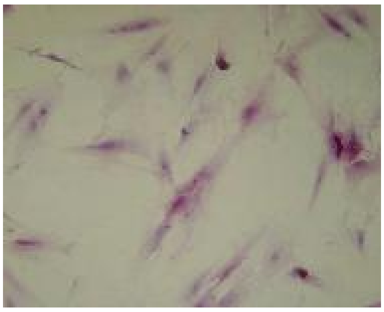

图 6 碱性磷酸酶阳性 ALP（+）（×400）

Fig. 6 ALP(+) positive（×400）

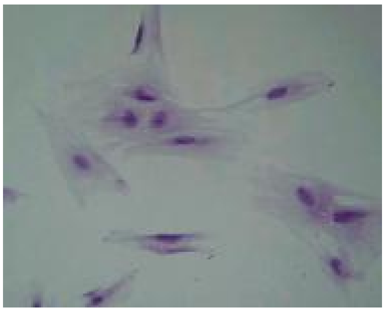

图 7 HE 染色示细胞呈梭型或多角形，胞核蓝染位移胞体的中央，胞核有分裂相（×400）

Fig. 7 HPDL cells showed shuttle or polygon in shape, and nucleus located in center of cells, and had mitosis phase（×400）

3 讨论

细胞培养技术是细胞生物学的重要的研究手段之一．从组织中分离出来的原代细胞能够较好地保存源组织细胞的遗传特征和生物学特性，具有对各种实验刺激表现出与体内相近的反应性．体外培养获得的 HPDL 细胞对研究牙周组织的再生、修复和改建提供了先决条件．

3.1 牙周膜细胞培养方法比较

人牙周膜细胞的体外培养方法目前亦主要有 2 种，一是组织块培养法；一是酶消化法[1-4]．因为组织块法的培养步骤简单，对牙周膜损伤减小，降低污染机会，故多数学者常用此法．然而组织块法的细胞贴壁率偏低，有学者采用胶原凝胶涂布、使用高糖 DMEM 和进口塑料培养瓶等手段来提高组织块的贴附率[5-7]．消化法得到的细胞是使用胰酶消化牙周膜而来，其中包含牙周膜细胞和上皮细胞．因为 HPDL 细胞生长速度较快，同时对胰蛋白酶耐受力低，所以用 0.05%的胰蛋白酶和 0.04%的 EDTA 1:1 混合消化液进行处理，牙周膜细胞首先从瓶壁上分离变圆，通常经过 2～3 次的传代后可基本去除上皮样细胞，从而获得相对纯净的人牙周膜细胞．本实验利用联合培养方法，先使用消化法初步使牙周膜碎块结构疏松，从而更有利于细胞从组织块中游出，同时消化过程中亦有部分细胞游离出来．本实验共收集正常牙齿 23 颗，顺利刮取牙周膜 21 颗牙，其中组织块培养法的 11 颗牙中成功 3 颗，联合培养法的 10 颗牙中成功 7 颗，所以组织块法成功率为 27%，联合培养法成功率为 70%．对于牙周膜细胞的分离培养有较多报道，但关于细胞培养成功率仍有不一致的结果，一般在 10 %～30 %之间[8]．本实验通过对人牙周膜细胞的原代分离培养，发现组织块法虽然操作简便，但成功率相对较低，而消化法与组织块法联合培养可以汲取二者优点，从而明显提高成功率．联合培养法的成功率高于组织块法，其原因可能是胰蛋白酶和胶原酶将牙周膜的细胞外基质部分降解，组织块边缘的细胞轻易地游离出来，由于组织块被消化后结构变得疏松，在组织块深部的细胞也可以游离出来．

3.2 牙周膜细胞的鉴定与培养时限

牙周膜细胞与牙龈细胞有显著不同的生物学特性．在牙周膜刮取过程中必须注意操作位置，以阻止其它细胞混入．一般刮取牙根的根中 1/3 的牙周膜．本实验采用免疫组化染色，波形丝蛋白

阳性提示为中胚层细胞（间充质来源），而角蛋白阳性则提示为外胚层细胞（上皮来源），本实验培养细胞经检测证实细胞为波形丝蛋白阳性，为来自中胚层细胞．同时 ALP 在牙周膜细胞中高表达，而牙龈成纤维细胞则不表达，因此在牙周膜的刮取过程中可以排除牙龈来源，得到实验所需的目的细胞．本实验对 HPDL 细胞生长特性进行监测，绘制出细胞的生长曲线，其结果与文献报道相近[9,10]，通过观察发现，细胞传代到 12 代以后细胞的生长状态较差，胞体变宽大，梭型不典型，同时生长速度逐渐变缓，细胞趋于老化．所以可以看出 HPDL 细胞在 12 代以前生长相对恒定．

尽管对体外培养牙周膜细胞的生长繁殖、定向分化和与生长因子等的相互作用进行了大量的研究，但是体外培养的细胞只能反映单一情况，对不同细胞之间相互作用的研究复杂而难以控制，因此在解释实验结果时要注意到其局限性，应该结合体内实验的结果进一步明确结论[11,12]．综上所述：采用组织块法和消化法与组织块法联合培养两种方法皆可成功地培养出了人牙周膜细胞，并且通过波形丝蛋白和角蛋白鉴定其为外胚层间充质来源，以及 ALP 检测以与牙龈成纤维细胞区分．但本实验显示消化法与组织块法联合培养法的成功率明显高于单纯组织块法．联合法可在短期内获得大量并且相对纯化的实验用牙周膜细胞．

[参考文献]

[1] ARNOLD L F,BARAM P. In vitro culture of periodontal ligament cells[J]. J Dent Res,1972,51(4):953－959.

[2] 马佳音,胥春,郝轶,等. 三种组织块法培养人牙周膜细胞的比较研究［J］. 组织工程与重建外科杂志，2010,6(6):136－140.

[3] 王祥,张斌,关呈超,等. 提高人牙周膜成纤维细胞体外培养成功率的方法总结［J］. 现代口腔医学杂志，2011,25(6):467－469.

[4] 司晓辉,刘正. 人牙周膜成纤维细胞的体外培养及其生物学性状[J]. 陕西医学杂志,2001,(4):195－197.

[5] ZAMAN K U,SUGAYA T,KATO H. Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response[J]. J Periodontal Res,1999,34(5):244－250.

[6] 刘加强,刘洪臣,王懿.等. 高糖对人牙周膜细胞的生物学作用[J]. 上海口腔医学,2011,20(3):225－229.

[7] BUURMA B,GU K,RUTHERFORD R B. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds[J]. Eur J Oral Sci,1999,107(4): 282－289.

[8] 万玲,刘斌,吴织芬,等. 牙周韧带细胞与牙龈成纤维细胞生长特性及其胶原表达的比较研究[J]. 实用口腔医学杂志,1995,(04):254－259.

[9] 韩文利,焦岩涛,陈新民. 人牙周膜成纤维细胞分离、纯化培养及生物学特性观察[J]. 临床口腔医学杂志,2000,(02):71－73.

[10] 张明珠,雷雅燕,刘晓,等. 原代人牙周膜成纤维细胞的培养及培养方法的改进［J］. 昆明医学院学报，2004,(01):53－56.

[11] 张凤秋,孟焕新,韩劼,等. 釉基质蛋白对人牙周膜细胞生物学影响的体外研究[J]. 北京大学学报(医学版),2012,44(1):6－10.

[12] 徐娟,刘洪臣,徐璐璐,等. 人牙周膜细胞条件培养基促PC12 细胞分化的作用研究[J]. 南方医科大学学报，2010,30(3):549－551.

（2012－04－1 收稿）