

Notch 信号分子于小鼠牙髓 干细胞样细胞表达的研究

陆 群¹, 吴补领², 王冀妹³, 韩 骅³, 周学东¹

(1. 四川大学华西口腔医学院 口腔内科教研室, 四川 成都 610041; 2. 第四军医大学口腔医院 牙体病科;
3. 遗传学与发育生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 研究 Notch 基因在小鼠牙髓干细胞样细胞表达。方法 采用酶消化培养法获得小鼠的单个牙髓细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^4 个/孔细胞, 干细胞培养液培养 14 d, 挑选细胞克隆扩增, 提取细胞的总 RNA, 反转录聚合酶联反应 (RT-PCR) 检测 Notch 基因的表达。结果 小鼠牙髓细胞呈集落状生长, 克隆形成率约为 1.6 ~ 2.5 个/ 10^4 细胞, 所形成的集落细胞结合紧密, 细胞胞体小, 胞核大, RT-PCR 结果显示 Notch 的 mRNA 在牙髓干细胞样细胞中有表达。结论 培养的集落状生长的小鼠牙髓细胞具有干细胞增殖快的特性, Notch 基因于牙髓干细胞中表达, 表明 Notch 信号参与了牙髓干细胞样细胞的早期分化的调控过程。

[关键词] 牙髓干细胞; Notch; 牙齿发育; 反转录聚合酶联反应

[中图分类号] R781 [文献标识码] A

Characterization of Notch Gene Involved in Genetic Regulatory Networks in Dental Pulp Stem Cells LU Qun¹, WU Buling², WANG Ji-shu³, HAN Hua³, ZHOU Xue-dong¹. (1. Dept. of Oral Medicine, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Operative Dentistry; 3. Dept. of Genetics and Biology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the characterization of Notch gene involved in genetic regulatory networks in dental pulp stem cells. **Methods** The pulp tissue was separated from mouse teeth and digested by collagenase type I. Single-cell suspensions of dental pulp were seeded into 6-well plates with alpha modification of Eagle's medium supplemented with ES cell qualified Fetal Bovine Serum. Colony-forming efficiency was assessed in 14ds culture. Transcripts for Notch were detected by reverse transcription-PCR by using total RNA isolated from cells. **Results** There were clonogenic cells in dental pulp cell and the incidence of colony-forming cells derived from mouse dental pulp cells was 1.6 ~ 2.5 colonies/ 10^4 plate. Mouse-specific Notch mRNA expressed in colony-forming cells. **Conclusion** Notch mRNA expressing in colony-forming cells provided a more detailed understanding of mouse dental pulp stem cell biology.

[Key words] dental pulp stem cells; Notch; tooth differentiation; reverse transcription-PCR

外胚层和神经嵴源性间充质细胞相互作用使得牙齿由最初的原始细胞发育生成有多种细胞组成的复杂器官, 这过程中有 Notch 信号参与¹⁻⁴。Notch 信号是进化保守细胞间通讯信号分子, 决定邻近细胞命运⁵; 最新研究报道⁶, Notch 与干细胞分化密切相关, Notch1 被认为是未分化的神经前体细胞的标记物, 于不断生长的鼠前牙的根尖颈环处呈网层表达, 从而推测 Notch 信号与定位于颈环上皮细胞及周围的网织细胞小鼠的干细胞增殖分化有关⁷。2000

年, Gronthos 等⁸报道体外成功培养并鉴定了人牙髓干细胞。本研究分离培养小鼠的牙髓干细胞样细胞, 采用反转录聚合酶联反应 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 方法观察 Notch 信号在体外培养的小鼠牙髓干细胞样细胞的表达。

1 材料和方法

1.1 实验材料及动物来源

ES 培养液: 20% 胎牛血清 ES cell qualified Fetal Bovine Serum、L-谷氨酰胺、青链霉素、-MEM (GIBCO 公司, 美国), 型胶原酶 (Sigma 公司, 美国), TriZol reagent (GIBCO/BRL 公司, 美国), Superscript (GIBCO/BRL 公司, 美国), Notch1 引物合成 (TaKaRa 大连宝生物有限公司)。直径 70 μm 细胞筛网、直径

[收稿日期 2002-12-27; 修回日期] 2003-10-12

[基金项目] 国家 973 计划资助项目子项目 (2001CB509906); 全国高等学校骨干教师计划资助 (1999 年)

[作者简介] 陆 群 (1969-), 女, 安徽人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 吴补领, Tel: 029-3376238

35 mm培养皿(Facol 公司,美国)。BALB/c 小鼠(第四军医大学实验动物中心提供)。

1.2 鼠的牙髓组织获得及消化培养⁸

引颈处死小鼠,游离鼠下颌牙槽骨,酒精消毒1 min,放入加有抗生素的1 × PBS液中。用显微外科器械在体视显微镜下获得小鼠前牙和磨牙的完整牙髓组织。以下参照2000年 Gonthos 等人牙髓干细胞分离培养方法分离培养牙髓干细胞。用3 g/L 胶原酶,37 ℃,消化2~3 h,离散细胞。离散后移入离心管,0.01 mol/L 的PBS洗涤3次,每次1 000 r/min 离心2 min,弃上清以洗净胶原酶。沉淀用200 ml/L 胎牛血清的α-MEM 培养液充分混匀,反复吹打离散细胞团块,通过孔径70 μm 的细胞筛网,以滤过获得单个离散的细胞。计数细胞,按每升 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个的密度接种于直径35 mm 的培养皿。

1.3 鼠的细胞克隆率

37 ℃,50 ml/L CO₂ 饱和湿度的CO₂ 孵箱培养,3 d后完全更换培养液,弃去未贴壁的细胞,2~3 d 换液1次。细胞培养14 d,镜下观察培养皿中出现细胞克隆,14 d 终止培养,弃去培养液,姬姆萨染色计算细胞克隆率,含有50个以上细胞团记为一细胞克隆,克隆形成率等于克隆数与接种细胞数间的百分比。

1.4 纯化集落状细胞并扩增

用细而软的丙烯酰胺凝胶吸头挑取细胞克隆,胰酶消化15 min,细胞以每升 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 个密度接种于25 cm² 塑料培养瓶里,培养5 d待细胞长满。

1.5 提取细胞总 RNA 以及 cDNA 合成

参照 Gibco Trizol Reagent 说明书提取总 RNA,即每升 10^5 个细胞中加入1 ml TRIZOL,混匀室温放置10 min,用细胞刷刮下培养瓶内贴壁的细胞后移入1.5 ml EF 导管;加入200 μl 氯仿剧烈振荡15 s,室温孵育3 min,4 ℃,12 000 r/min 离心15 min,收集上清加入500 μl 异丙醇,于4 ℃,12 000 r/min 离心10 min;沉淀用75%乙醇洗2次,7 500 r/min,4 ℃ 离心5 min,弃上清空气干燥5 min,沉淀溶于DEPC处理的水中,并用紫外分光光度仪定量。参照 Gibco 说明书合成cDNA,即5 μg RNA 为模板加入引物 oligo-dT12-18,放入70 ℃ 水浴10 min 立即转移入冰水中变性,加入反转酶 AMV-RT,42 ℃,60 min,加37 ℃,20 min,终止反应。

1.6 PCR 检测 Notch1 的 mRNA 的表达

设计鼠的 Notch1 引物(片段为404 bp):5'-GGGATGATGACTGAACACCTG-3'; 5'-AGTAGAAGGCTGT CACCAAGCA-3'。

1.7 PCR 扩增

以cDNA 模板,在50 μl 反应体系中加入 Notch1

引物 PCR 扩增。参数设为:94 ℃ 变性1 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s 共35个循环,72 ℃ 延长5 min,取10 μl PCR 产物1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯观察并照相。

2 结果

2.1 原代培养牙髓干细胞

用α-MEM(含20%FCS)培养胶原酶离散的单个牙髓细胞,2 d后部分细胞贴壁生长,4 d完全换液,弃去悬浮未贴壁细胞,镜下观察,贴壁细胞为成纤维样细胞,外形长梭形,其中有少数几个细胞增殖迅速,培养14 d左右形成细胞克隆,呈集落状生长。细胞间排列紧密,难以分开,每个细胞呈圆形,苏木精-伊红染色见体积小,核大,有一个或几个核仁,胞浆少,形似鸟巢,界限不清。而克隆周边小鼠牙髓细胞是梭形的成纤维细胞(图1,2)。计算细胞克隆率为 $1.6 \sim 2.5$ 个/ 10^4 细胞。

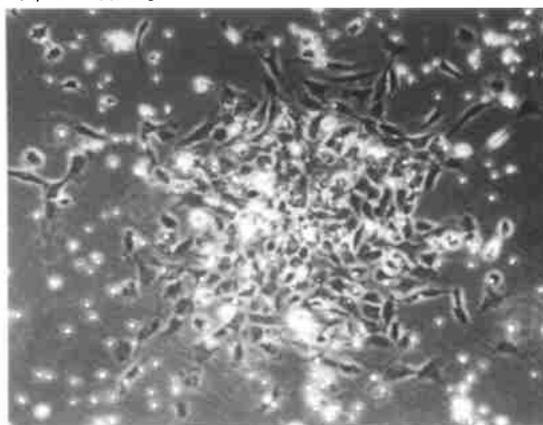


图1 培养4 d时,小鼠牙髓细胞贴壁,并有细胞形成克隆状生长趋势 倒置显微镜 ×20

Fig 1 Adhesive cells and colony-forming efficiency after 4 days phase-contrast micrograph ×20

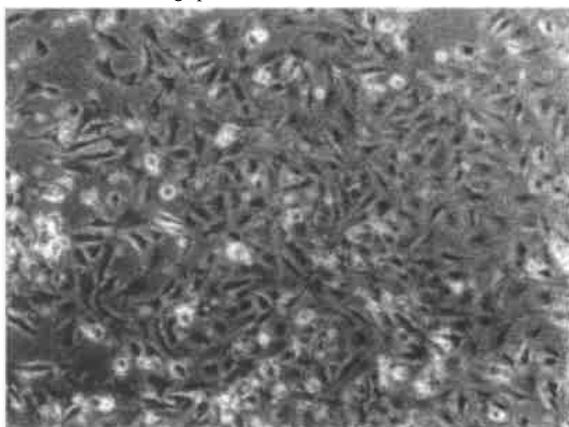


图2 培养14 d时的典型克隆状生长细胞 倒置显微镜 ×40

Fig 2 Representative high density colonies after 14 days phase-contrast micrograph ×40

2.2 RT-PCR 检测 Notch 信号于体外培养鼠牙髓干细胞中的表达

RT-PCR 法检测 Notch1 于牙髓干细胞中的表达情况见图 3,凝胶电泳,获得预期的 404 bp 左右大小片段产物。

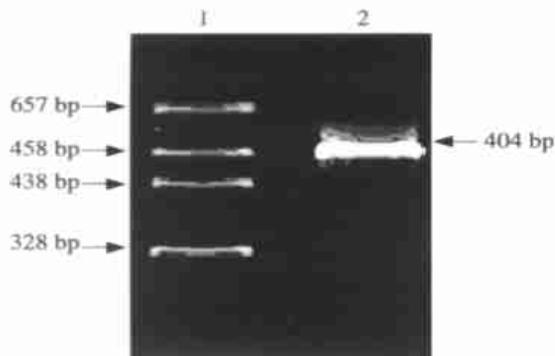


图3 RT-PCR 法检测 Notch1 于牙髓干细胞中的表达
带 1:pGEM-7z(+)/Hae ;带 2:设计 Notch1 引物

Fig 3 The Notch1 products expressed in dental pulp stem cells by RT-PCR

3 讨论

Notch 是高度保守的跨膜受体蛋白,通过结合配体 Delta 或 Jagged 在干细胞和周围细胞间传递信号,是细胞间相互作用的信号。Harada 等⁷ 利用 Brdu 和 DiI 标记未萌出的鼠切牙,将干细胞定位于不断生长的鼠牙根颈环上皮及相邻的星网层细胞,此处细胞可持续增殖、分化为成釉细胞,从而鼠牙可不断生长,并确定 Notch1 于鼠牙根颈环上皮细胞处表达。研究报道,Notch 信号还参与调节其他干细胞增殖分化,诱导神经干细胞向胶质细胞方向分化,促进造血干细胞的自我更新。当 Notch 受体与其配体结合时,干细胞进入分化阶段;当 Notch 活性受到抑制时,干细胞进入分化程序,发育为功能细胞⁹。

干细胞具有自我复制的能力,在一定条件下,它可分化成各种功能细胞。根据其发育阶段,干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞。最新研究表明成体干细胞普遍存在于人体各器官。2000 年,Gronthos 等⁸ 报道体外成功培养并鉴定了人牙髓干细胞。本实验采用该文献报道的分离培养干细胞方法,细胞连续培养 14 d 左右,细胞可快速增殖形成细胞克隆,计算细胞克隆形成率为 1.6~2.5 个克隆/ 10^4 细胞。集落状生长的细胞排列密集,形似鸟巢,界限不清,胞体体积小,核大,有一个或几个核仁;具有快速生长的特性。另有实验¹⁰ 用细而软的丙烯酰胺凝胶吸头挑取细胞克隆,胰酶消化 15 min,运用骨形成蛋白 2、转化生长因子、纤维生长因子细胞因子刺激体外培养第二代牙髓干细胞 8 d,RT-PCR 凝胶电泳结果显示实验组表

达牙本质涎磷蛋白的 mRNA,表明尽管牙髓干细胞于体外呈高度无序性分化,但在细胞生长因子作用下,有定向分化趋势,具有干细胞分化的特性。

本实验提取牙髓干细胞总 RNA,反转录 PCR,PCR 产物凝胶电泳,获得预期的 404 bp 大小 Notch1 基因片段,表明牙髓干细胞样细胞中有 Notch1 基因的表达。研究干细胞增殖分化中的基因调控及微环境对其影响,对认识干细胞定向诱导分化十分重要。由于目前技术局限,不能获得完全纯化的细胞,细胞中可能包括有部分前体细胞,实验中使用干细胞培养液将有益于维持干细胞特性,阻滞干细胞的体外分化。干细胞的早期增殖分化中有很多基因参与,包括有关信号转导、细胞周期的调控、蛋白折叠、细胞死亡、DNA 修复等功能基因。Notch 属于高度保守的细胞间信号分子,它在牙髓干细胞样细胞中的表达,有助于认识牙髓干细胞基因调控生物化学机制,有助于研究干细胞中基因调控网络。

[参考文献]

- 1] Micchelli CA, Blair SS. Dorsoventral lineage restriction in wingimaginal discs requires Notch J. Nature, 1999, 401(6752): 473-476.
- 2] Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, et al. Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate J. J Cell Biol, 1995, 130 (2): 407-418.
- 3] Mitsiadis TA, Henrique D, Thesleff I, et al. Mouse Serrate-1 (Jagged-1): Expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and broblast growth factor-4 J. Development, 1997, 124(8): 1473-1483.
- 4] Mitsiadis TA, Hirsinger E, Lendahl U, et al. Delta-Notch signaling in odontogenesis: Correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation J. Dev Biol, 1998, 204(2): 420-431.
- 5] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development J. Science, 1999, 284(5415): 770-776.
- 6] Johansson CB, Mamma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system J. Cell, 1999, 96(1): 25-34.
- 7] Harada H, Kettunen P, Jung HS, et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling J. J Cell Biol, 1999, 147(1): 105-120.
- 8] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo* Proc J. Natl Acad Sci, 2000, 97 (25): 13625-13630.
- 9] Li L, Milner LA, Deng Y, et al. The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1 J. Immunity, 1998, 8 (1): 43-55.
- 10] 陆群,吴补领,周学东. 小鼠牙髓干细胞培养及诱导分化研究 J. 第四军医大学学报, 2003, 24(18): 1731-1734.

(本文编辑 汤亚玲)