

·综述·

# 人牙周膜成纤维细胞体外培养的研究进展

姜竹玲<sup>1</sup> 王祥<sup>1</sup>综述 张斌<sup>1</sup> 关呈超<sup>1</sup> 高睿<sup>2</sup>审校

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院口腔种植科 哈尔滨 150086;

2. 哈尔滨医科大学口腔医院正畸科 哈尔滨 150001)

[摘要] 人牙周膜成纤维细胞是牙周细胞生物学、药理学、毒理学和牙周组织工程学研究的基础, 对口腔各个领域意义重大。由于受到牙周组织的解剖结构和取材数量的限制, 牙周膜成纤维细胞的体外培养较为困难, 因此本文就人牙周膜成纤维细胞的体外培养方法和应用等研究进展作一综述。

[关键词] 牙周膜成纤维细胞; 细胞培养; 应用

[中图分类号] Q 256 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.05.012

**Research progress on human periodontal ligament fibroblast culturing *in vitro*** Jiang Zhuling<sup>1</sup>, Wang Xiang<sup>1</sup>, Zhang Bin<sup>1</sup>, Guan Chengchao<sup>1</sup>, Gao Rui<sup>2</sup>. (1. Dept. of Oral Implantation, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China; 2. Dept. of Orthodontics, Hospital of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[Abstract] Human periodontal ligament fibroblasts play a basis role in biological, pharmacy, and tissue engineering research of periodontal cells, which are critical to the study of stomatology. Because of the limited anatomy structure and the limited amount of periodontal ligament. The culture of human periodontal ligament fibroblasts is relatively hard. This review describes the methods on culture of human periodontal ligament fibroblasts *in vitro*.

[Key words] periodontal ligament fibroblast; cell culture; use

人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblast, hPDLF)是牙周组织再生修复的细胞基础, 在牙周病理变化和转归中起着重要的作用。成功的体外培养 hPDLF 是研究牙周病病因、病理和治疗的关键, 对研究牙周细胞生物学、药理学、毒理学和牙周组织工程学具有重要的意义<sup>[1-5]</sup>。牙周膜是一种致密的结缔组织, 由细胞和基质以及大量的胶原纤维组成。由于受到牙周组织的解剖结构和取材数量的限制, hPDLF 的培养较为困难, 也成了限制牙周细胞生物学的瓶颈<sup>[6-8]</sup>。

## 1 hPDLF 的体外培养方法

### 1.1 酶消化法培养

Ragnarsson 等<sup>[7]</sup>曾用酶消化法对 hPDLF 进行体外培养并取得成功。在酶消化法培养时需要将刮取的牙周膜组织剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 的小

块, 以质量分数 0.25% 的胰蛋白酶消化 5 min, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 6 min 后, 弃上清液; 再用质量分数 0.2% 的 型胶原酶于恒温摇床内, 37 ℃ 消化 50 min, 800 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min, 弃上清液; 加入含质量分数 20% 胎牛血清和双抗的达尔贝科极限必需培养液(Dulbecco minimum essential medium, DMEM)5 mL, 吹打混匀后将培养瓶置于 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育。单纯的酶消化法是通过酶消化液使已被剪成小块的组织进一步松散, 直接获得细胞进行培养的方法; 但应用酶消化法获取细胞后, 能够贴壁的细胞数量并不是很多, 有时可能会达不到传代生长的要求。研究显示: 一方面牙周膜组织量太小, 总体细胞数量相对于别的组织来说就太少; 另一方面酶对组织胶原基质消化酶解的同时对细胞也有毒性作用, 而且在酶消化的过程中, 牙周膜组织因为脱离营养环境过久, 也会造成大量的细胞死亡。

### 1.2 组织块法培养

Arnold 等<sup>[9]</sup>采用组织块法成功地培养了 hPDLF。Brunette 等<sup>[10]</sup>用组织块法成功地培养了猪的牙周膜成纤维细胞。组织块法就是将刮取的牙周膜组织

[收稿日期] 2011-12-11; [修回日期] 2012-07-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170960)

[作者简介] 姜竹玲(1983—), 女, 黑龙江人, 博士

[通讯作者] 张斌, Tel: 0451-86297063

剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 的小块, 均匀铺于无菌的 25 mL 培养瓶内。倒置培养瓶, 加入 5 mL 含质量分数 20% 胎牛血清和双抗的 DMEM, 然后将培养瓶置于 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育。4 h 后翻转培养瓶, 继续培养。每周换液 1 次。待细胞逐渐从组织周边爬出贴壁生长后, 每 3 d 换液 1 次。待瓶底基本长满单层细胞后, 用胰酶和乙二胺四乙酸混合液进行消化传代<sup>[11]</sup>。组织块法操作简单易行, 污染率低, 对组织损伤小, 已被广泛用于各种组织的原代培养中; 但在实践中利用此方法培养牙周膜细胞时, 组织块很容易漂浮, 影响了细胞的游出, 因此提高组织块的贴壁率是影响培养细胞成功率的一个关键因素。

### 1.3 酶消化联合组织块法培养

有学者<sup>[12]</sup>在研究中采用酶消化联合组织块法培养 hPDLF。即收集刮下的牙周膜组织不经剪切直接将其移入离心管, 加入含质量分数 0.2% 的型胶原酶 3 mL, 37 °C 振荡消化 110 min, 待大部分细胞游离后用吸管吹打使游离细胞充分分散, 加入少量含质量分数 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化。1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清液。再加入少量含质量分数 10% 胎牛血清的 DMEM, 接种于 25 mL 细胞培养瓶中, 用巴氏吸管将组织块摆放均匀, 倒置培养瓶, 加入 5 mL 含质量分数 20% 胎牛血清和双抗的 DMEM, 然后将培养瓶置于 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育, 4 h 后翻转培养瓶, 继续培养。为了最大限度地利用组织, 减小损伤, 将不经切割的牙周膜直接用酶消化, 以去除部分妨碍细胞生长的基质和纤维。由于消化的目的不是直接获取细胞, 而是松散组织; 因此可以适当缩短消化时间, 减少酶消化中消化时间过长对细胞活性的影响; 但是此法步骤相对烦琐, 且组织块不易贴壁尚没得到较好的解决。

### 1.4 改良组织块法培养

有学者<sup>[13]</sup>将组织块法改良(玻片覆盖组织块法), 也就是在培养皿底壁间隔均匀地滴加 4 滴含质量分数 0.2% 胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素的 DMEM, 在磷酸缓冲盐溶液浸润条件下用眼科剪将牙周组织剪成 0.5~1.0 mm<sup>3</sup> 大小的组织块, 用牙科探针将组织碎块移入培养皿中的培养液滴中, 使每滴培养液内含 5~7 小块组织。取细胞培养专用圆形盖玻片, 在其四周边缘涂少量无菌凡士林后缓慢覆盖于组织块上, 轻轻加压, 通过凡士林将盖玻片黏附在底壁以固定

组织块。注意培养液应充盈于盖玻片与组织块之间, 勿产生气泡。最后小心地加入上述培养液 10 mL 并将其培养皿放入 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中孵育。试验中加入少量培养液后再将盖玻片缓慢覆盖于组织块上, 使培养液充盈于盖玻片与组织块之间, 这样可以避免组织块漂浮而不影响细胞的游出, 以提高 hPDLF 培养的成功率。

### 1.5 改良酶消化联合组织块法培养

有学者<sup>[14]</sup>改良了酶消化联合组织块法, 也就是牙周膜组织不经剪切而直接移入离心管内, 加入 4 mL 含质量分数 0.05% 胶原酶的 DMEM, 置于 37 °C 培养箱孵育。酶消化 20~30 min, 其间每隔 5 min 振荡 1 次。当肉眼观察到培养液略混浊, 显微镜下见组织松散时, 将离心管从培养箱内取出。用吸管吹打组织块使其松散, 离心后去除上清液。使用无血清 DMEM 漂洗 1 次后去上清液, 收集组织块并将其放入直径 3.5 cm 的培养皿中, 加入少量含胎牛血清的 DMEM, 将盖玻片缓慢覆盖于组织块上致培养液充盈于盖玻片与组织块之间。培养皿在 CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 4 h 后添加培养液 1~2 mL, 再静置培养, 此后每 3 d 换液 1 次。此法较大限度地利用组织, 减小损伤, 适当的酶消化时间有利于组织松散, 且使用了盖玻片防止组织块漂浮, 使其紧密黏贴于培养皿壁, 提高了细胞培养的成功率。

### 1.6 组织块自然贴壁法<sup>[15]</sup>

将冲洗过的组织块在培养液的浸润下用眼科剪剪切成 1 mm<sup>3</sup> 左右的小块, 加入少量培养液, 用吸管吹打使组织小块分离, 再送入 15 mL 培养皿中并加适量培养液, 置培养皿于 CO<sub>2</sub> 恒温箱中静置密闭培养。自然贴壁法引入了适者生存的理念, 让其中有活性的组织块自然贴壁, 同时最大限度地保留了组织块中各种普遍生长因子的活性, 保存了其细胞增殖的促进作用。

### 1.7 全牙消化法<sup>[16]</sup>

超净工作台内用刀片仔细刮除附着的牙龈和根尖组织, 用 D-汉克液冲洗 3 次, 将牙冠浸入含质量分数 5.25% 次氯酸钠的溶液中 2 min, 再用含高质量分数双抗的 D-汉克液冲洗 2 次, 将全牙放入含质量分数 0.1% 胶原酶的青霉素小瓶内, 牙根向下使消化液浸没牙根, 37 °C 温箱内消化 1 h, 用吸管充分吹打牙根表面, 加入等量含血清的培养液, 离心, 弃上清液, 加入含 10% 质量分数胎牛血清、青霉素 100 U·mL<sup>-1</sup> 和链霉素 100 mg·L<sup>-1</sup>

的培养液 3 mL 吹打形成细胞悬液，将其移入 25 mL 培养瓶内，置 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。全牙消化法不但减少了牙周膜被反复剪切而导致的组织块损伤，而且可减少刮取组织块时的机械损伤。

### 1.8 组织块酶消化湿润贴壁法<sup>[17]</sup>

在洁净工作台中仔细将牙根中 1/3 的牙周膜刮下，大块组织稍剪小使组织块最大不超过 2 mm<sup>3</sup>，将其送入离心管，D-汉克液漂洗 2 次，加入 1 型胶原酶 3 mL，37℃ 消化 30 min，每隔 5 min 振荡 1 次，待组织块变成絮状后将其移入 25 mL 培养瓶底壁，以 5 mm 的间隔均匀接种，小心地加入 0.5 mL 含有质量分数 15% 胎牛血清的 DMEM，让液体缓慢浸过组织块使其湿润，谨防组织块漂动。把培养瓶置入含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气的 37℃、饱和湿度的孵箱中孵育 24 h，轻轻加入培养液至 3 mL，倒置相差显微镜下隔天观察是否有细菌和霉菌污染，一旦污染需及时清除，移动培养瓶时动作要轻巧，严禁晃动。湿润贴壁法简化了操作过程，效果与其他研究相似，且减少了微生物污染的危险。

## 2 hPDLF 的应用

hPDLF 作为牙周膜的主体细胞，是牙周组织改建和再生修复的基础<sup>[8, 18]</sup>。有学者<sup>[19]</sup>利用 hPDLF 体外培养模型，在牙周组织疾病发病机制研究和治疗方面取得了一定的进展。另外，hPDLF 是一类具有多分化潜能的细胞<sup>[2-3, 20]</sup>，对正畸牙移动过程中牙骨质的形成和牙槽骨改建具有重要的意义<sup>[8, 21]</sup>。还有研究<sup>[22]</sup>发现，移植 hPDLF 可以促进牙周新附着的形成，因此 hPDLF 可视为牙周组织工程的种子细胞。王丽霞等<sup>[23]</sup>研究了人牙周膜细胞在玻璃酸-胶原支架上的黏附与生长，发现玻璃酸-胶原支架更有利于人牙周膜细胞的黏附，提示该材料具备成为牙周组织工程理想支架材料的潜力。

综上所述，hPDLF 在各领域都有广泛的应用，其培养方法也各有千秋，选择一种恰当的可提高培养成功率的方法对进一步的研究具有重要的意义。

## 3 参考文献

[1] Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, et al. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells[J]. J Endod, 2010, 36(4) :647-652.

[2] Jäger A, Götz W, Lossdörfer S, et al. Localization of SOST/sclerostin in cementocytes *in vivo* and in mineralizing periodontal ligament cells *in vitro*[J]. J Periodontol Res, 2010, 45(2) :246-254.

[3] Hakki SS, Hakki EE, Nohutcu RM. Regulation of matrix metallo proteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by basic fibroblast growth factor and dexamethasone in periodontal ligament cells[J]. J Periodontol Res, 2009, 44(6) :794-802.

[4] Flores MG, Yashiro R, Washio K, et al. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats[J]. J Clin Periodontol, 2008, 35(12) :1066-1072.

[5] Yang ZH, Zhang XJ, Dang NN, et al. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues[J]. J Periodontol Res, 2009, 44(2) :199-210.

[6] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996 :63-71.

[7] Ragnarsson B, Carr G, Daniel JC. Isolation and growth of human periodontal ligament cells *in vitro*[J]. J Dent Res, 1985, 64(8) :1026-1030.

[8] Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells[J]. J Periodontol Res, 2006, 41(4) :303-310.

[9] Arnold LF, Baram P. *In vitro* culture of periodontal ligament cells[J]. J Dent Res, 1972, 51(4) :953-959.

[10] Brunette DM, Melcher AH, Moe HK. Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions[J]. Arch Oral Biol, 1976, 21(7) :393-400.

[11] 蒋俊强, 王忠朝, 黎春晖, 等. 三种方法原代培养人牙周膜细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23) :4290-4294.

[12] Murphy KG, Daniel JC. Human periodontal ligament *in vitro*: Cell culture passage effect on collagen gel contraction[J]. J Periodontol Res, 1987, 22(5) :342-347.

[13] 余占海, 张国英, 张小恒, 等. 玻片覆盖组织块法原代培养人牙周膜成纤维细胞及其生物活性的观察[J]. 广东医学, 2007, 28(9) :1424-1426.

[14] 汤楚华, 施生根, 牛忠英, 等. 酶消化组织块法原代培养人牙周膜成纤维细胞的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(8) :656-658.

[15] 胡军, 陈新民, 麻健丰. 人牙周膜成纤维细胞原代培养的研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2002, 16(2) :176-177.

[16] 张丽, 王永, 张军梅, 等. 体外培养人牙周膜细胞方法的探讨[J]. 贵阳医学院学报, 2008, 33(5) :465-468.

[17] 张建兴, 黄生高, 钟孝欢, 等. 人牙周膜细胞体外培养和机械压力模型构建[J]. 口腔医学研究, 2006, 22(1) :38-42.

- motherapy[J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(2) :151-160.
- [12] Chiou SH, Yu CC, Huang CY, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13) :4085-4095.
- [13] Marhaba R, Klingbeil P, Nuebel T, et al. CD44 and EpCAM : Cancer-initiating cell markers[J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8(8) :784-804.
- [14] Ahn SM, Goode RJ, Simpson RJ. Stem cell markers : Insights from membrane proteomics[J]. *Proteomics*, 2008, 8(23/24) :4946-4957.
- [15] LaBarge MA, Bissell MJ. Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6) :2021-2024.
- [16] Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, et al. AC133/CD133/Prominin-1[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(4) :715-719.
- [17] Rizzo S, Attard G, Hudson DL. Prostate epithelial stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2005, 38(6) :363-374.
- [18] Zhou L, Wei X, Cheng L, et al. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. *Laryngoscope*, 2007, 117(3) :455-460.
- [19] 康非吾, 王开, 吴滔, 等. 舌鳞状细胞癌Tca8113细胞系 CD133<sup>+</sup>亚群生物学特性的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(5) :560-564.
- [20] Wei XD, Zhou L, Cheng L, et al. *In vivo* investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. *Head Neck*, 2009, 31(1) :94-101.
- [21] 姜蕾, 赵良瑜, 何金, 等. 骨桥蛋白及其受体CD44v6在口腔鳞状细胞癌中的定量表达及意义[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26(3) :248-251.
- [22] Pries R, Witkopf N, Trenkle T, et al. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer[J]. *In Vivo*, 2008, 22(1) :89-92.
- [23] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(3) :973-978.
- [24] Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(17) :2871-2875.
- [25] Visus C, Ito D, Amoscato A, et al. Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8<sup>+</sup> T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21) :10538-10545.
- [26] Clay MR, Tabor M, Owen JH, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase[J]. *Head Neck*, 2010, 32(9) :1195-1201.
- [27] Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, et al. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma[J]. *Mol Vis*, 2005, 11 :729-737.
- [28] Wang X, Wang Y, Yu L, et al. CSPG4 in cancer : Multiple roles[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10(4) :419-429.
- [29] Fang D, Nguyen TK, Leishear K, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20) :9328-9337.
- [30] Tokar EJ, Ancrile BB, Cunha GR, et al. Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer[J]. *Differentiation*, 2005, 73(9/10) :463-473.
- [31] Zhang P, Zhang Y, Mao L, et al. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes[J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(2) :227-234.
- [32] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8) :3716-3724.
- [33] Burkert J, Otto WR, Wright NA. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells[J]. *J Pathol*, 2008, 214(5) :564-573.
- [34] Harper LJ, Piper K, Common J, et al. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Pathol Med*, 2007, 36(10) :594-603.

(本文编辑 刘世平)

(上接第 603 页)

- [18] 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.
- [19] Lackler KP, Cochran DL, Hoang AM, et al. Development of an *in vitro* wound healing model for periodontal cells[J]. *J Periodontol*, 2000, 71(2) :226-237.
- [20] 刘娟, 赵红宇, 轩东英, 等. 人牙周膜细胞群多向分化潜能的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(2) :185-189.
- [21] Ivanovski S, Li H, Haase HR, et al. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Periodontol Res*, 2001, 36(3) :131-141.
- [22] Lang H, Schüler N, Nolden R. Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects—a study in minipigs[J]. *J Dent Res*, 1998, 77(2) :393-405.
- [23] 王丽霞, 赵震, 蒋波, 等. 人牙周膜细胞在透明质酸/胶原支架上的黏附与生长[J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(2) :220-223.

(本文编辑 刘世平)