

人牙周膜细胞接种于纳米-羟基磷灰石上的形态学研究

毛 钊¹, 毛 曦², 储成林³

(1. 南京军区南京总医院口腔科, 江苏南京 210002; 2. 南京大学生命科学院, 江苏南京 210093; 3. 东南大学材料研究所, 江苏南京 210096)

[摘要] 目的 观察人牙周膜细胞接种于三维多孔纳米-羟基磷灰石上的组织形态学表现。方法 将原代培养的人牙周膜细胞接种于三维多孔纳米-羟基磷灰石上, 培养15天后, 采用扫描电子显微镜观察细胞的生长情况, 探讨两者的复合情况。结果 作为种子细胞的人牙周膜细胞接种到支架材料上后, 细胞粘附充分, 生长旺盛, 并有钙结节和少量胶原纤维形成。结论 三维多孔纳米-羟基磷灰石支架材料是一种比较符合牙周组织工程学条件的支架材料。

[关键词] 人牙周膜细胞; 三维多孔纳米-羟基磷灰石支架材料; 牙周组织工程

中图分类号: R783 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)03-0161-03

The study on morphology by seeding human periodontal ligament cells onto three-dimensional porous nano-hydroxylapatite

MAO Zhao¹, MAO Xi², CHU Cheng-lin³ (1. Department of Stomatology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Department of Biological Science and Technology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China; 3. Institute of Functional Materials, Southeast University, Nanjing 210096, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To observe the morphology by seeding human periodontal ligament cells onto three-dimensional porous nano-hydroxylapatite. **Methods** Human periodontal ligament cells were seeded onto three-dimensional porous nano-hydroxylapatite scaffolds, cultured for 15 days in vitro. Scanning electron microscopy was used to observe morphology of cells seeded on three-dimensional porous nano-hydroxylapatite scaffolds. **Results** The cells seeded on three-dimensional porous nano-hydroxylapatite scaffolds had sufficient adhesive behavior, proliferated well and produced many tiny calcium nodules and collagenous fibers. **Conclusion** The study demonstrates that three-dimensional porous nano-hydroxylapatite scaffolds may be considered as a suitable scaffold in periodontal tissue engineering.

[Key words] Human periodontal ligament cells; Three-dimensional porous nano-hydroxylapatite scaffolds; Periodontal tissue engineering

牙周支持组织的破坏是在多种致病因素的作用下产生的, 因此这种破坏往往难以恢复。组织工程学的发展为解决这个难题提供了新的思路和方法。组织工程是由种子细胞、支架材料和生长因子三大要素构成。牙周膜细胞是一种具有多向分化功能的群

体细胞^[1], 其生物学功能包括趋化、粘附、增生、生物合成, 且能分化为成骨细胞、成牙骨质细胞和形成矿化组织等, 因此可以作为非常优良的种子细胞。而纳米-羟基磷灰石的超微结构与人骨相似, 具有骨诱导作用, 可以整合到新生骨中^[2], 且有提高磷酸钙材料促进成纤维细胞骨化分化的能力^[3], 可以作为很好的牙周组织工程的支架材料。本研究的目的在于观察作为种子细胞的牙周膜细胞接种于三维多孔纳米-羟基磷灰石上后的生长情况, 为牙周组织工程治疗牙周支持组织缺损提供实验依据。

基金项目: 江苏省科技厅高技术研究资助项目(BG2001033)

南京军区十五医药卫生基金资助项目(02MB003)

作者简介: 毛 钊(1959-), 男, 上海人, 教授, 主任医师, 口腔医学博士, 从事牙周病研究。

1 材料与方法

1.1 人牙周膜细胞原代培养 取因正畸治疗或阻生而拔除的牙周健康、无龋的青少年牙,受试者全身无免疫缺陷病、内分泌疾病、肝肾功能正常。将拔下的牙齿立即用Hank液清洗3遍,放入含15%胎牛血清(购自南京医科大学管小红实验室)的DMEM(美国Gibaco公司)培养液中,然后自牙根中、下1/3处刮取正常牙周膜组织,并剪成 1 mm^3 大小的组织块,以贴块法均匀铺于25 ml培养瓶底,加入3~4 ml含20%胎牛血清的DMEM培养液(内含 $100\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的青霉素和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的链霉素)。置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱内孵育5 h,翻瓶,让组织块全部浸入培养液,每3天换一次培养液,直至细胞从组织块边缘游出。细胞成片生长后,胰酶消化,传代培养,用免疫组化ABC法行角蛋白和丝蛋白染色,确定细胞为中胚层来源的成纤维样细胞后,取4代的细胞进行试验。

1.2 人牙周膜细胞生长情况和形态学观察 每隔5天在倒置显微镜上观察细胞的形态变化和生长情况,并拍摄活细胞照片。

1.3 碱性磷酸酶细胞化学染色(Gomori钙钴法) 接种有生长良好的第四代牙周膜细胞的盖玻片在培养10天后,用PBS漂洗2次,吹干后用冷甲醛固定15 min,放入碱性磷酸酶孵育液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h,1%番红复染10 min。抽取底物作对照。

碱性磷酸酶孵育液配制(pH9.0~9.4):2%硫酸镁5 ml,2%巴比妥钠5 ml,2%硝酸钙10 ml,2% β -甘油磷酸钠5 ml。

1.4 三维多孔纳米-羟基磷灰石支架材料的制备

用溶胶-凝胶制备工艺合成出粒径为50 nm左右的纳米-羟基磷灰石与生物可吸收降解的 β -磷酸三钙生物陶瓷超细粉体,再用溶剂浇铸-粒子沥出法制备出三维多孔支架,用扫描电镜观察。然后将支架切割成 $15\text{ mm}\times 10\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 大小的块状,去离子水浸泡、漂洗、烘干,高温灭菌后备用。

1.5 种子细胞-支架材料复合体的形成 将生长良好的第四代牙周膜细胞以 $2\times 10^7/\text{ml}$ 细胞接种浓度接种于纳米-羟基磷灰石支架材料上,在 75 cm^2 的培养瓶内培养15天后,用扫描电镜观察。

扫描电镜观察法:用3%戊二醛缓冲液(pH7.4)固定,冲洗,锇酸再固定,逐级脱水,醋酸异戊酯浸泡,临界点干燥,喷金镀膜,JEM.1010型扫描电镜观察。

2 结果

2.1 活牙周膜细胞形态学观察 原代培养的牙周膜细胞贴壁生长,多数为典型的梭形或星形成纤维样细胞,两端有细长突起,胞浆透亮,折射率高,生长状态良好(见图1)。

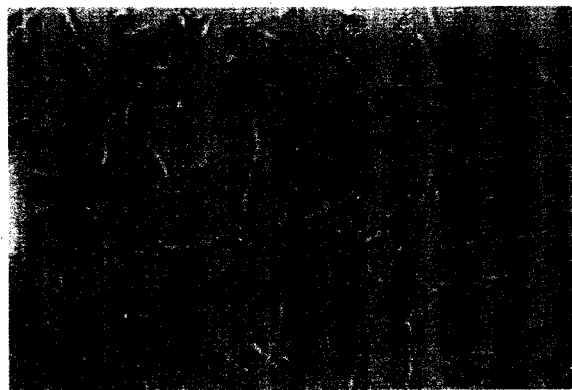


图1 活牙周膜细胞形态表现(倒置显微镜 $\times 100$)

2.2 碱性磷酸酶染色观察 碱性磷酸酶阳性反应物呈褐色至深褐色。培养10天的第四代牙周膜细胞,可见胞浆内褐色的碱性磷酸酶染色颗粒较多,说明细胞的碱性磷酸酶活性较高(见图2)。

图2 牙周膜细胞碱性磷酸酶染色 $\times 300$

2.3 三维多孔纳米-羟基磷灰石支架材料的扫描电镜观察 三维多孔纳米-羟基磷灰石支架材料为具有良好三维立体结构,且含孔率较高,孔径多为0.5 mm左右^[2]。

2.4 种子细胞-支架材料复合体的扫描电镜观察 种子细胞接种到支架材料上15天后,细胞形态充分伸展,表现为星形或多角形,细胞表面可见有许多细小的钙结节,有少量胶原纤维长入支架组织中,显示出细胞在支架材料上生长旺盛,且对支架材料有良好的粘附状态(见图3)。

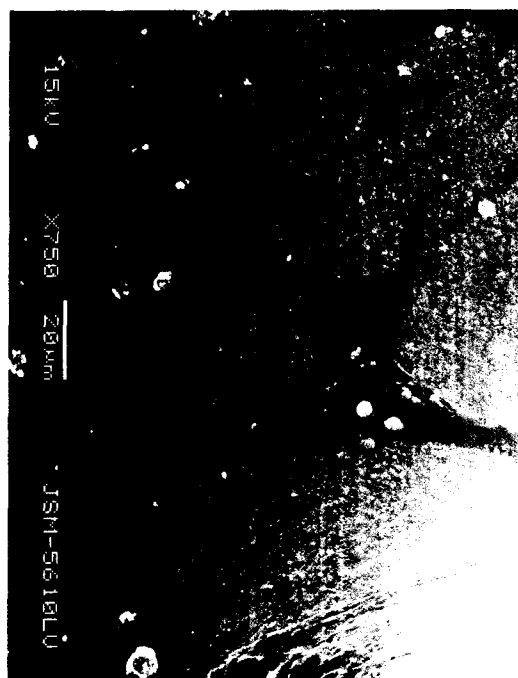


图3 牙周膜细胞-支架材料复合体扫描电镜表现

3 讨论

牙周组织再生依赖于牙周膜细胞增殖、趋化、生物合成及分化功能的充分发挥,而这仅仅是牙周组织工程中种子细胞所需的要求。要想获得牙周组织工程治疗牙周缺损的成功,使种子细胞、支架材料、生长因子达到尽可能的完美结合是至关重要的。目前,牙周膜细胞作为牙周组织工程的种子细胞已经得到广泛的认可,并就如何增加牙周膜细胞增殖、趋化、生物合成及分化功能进行了广泛的研究^[4-6]。在此基础上,对支架材料的研究也已经成为组织工程学研究的重点。人工合成的羟基磷灰石由于与人骨组织中的羟基磷灰石结晶十分相似,具有一定的骨诱导作用,植入人体后一边吸收,一边诱导新骨形成。而纳米级的羟基磷灰石由于在颗粒大小上有独特的优越性,能够更好地促进新骨的形成和生长^[7]。本研究中应用的纳米-羟基磷灰石具有整合到新骨中的能力,并可直接被吸收后使新骨的形成增快。研究发现这种纳米-羟基磷灰石微粒可以诱导牙周膜细胞碱性磷酸酶表达^[3],与壳聚糖复合成膜使用后有利于牙周膜细胞的粘附^[8],具有良好的组织相容

性。当制成三维多孔支架材料后,将大鼠骨髓基质干细胞接种其上,可见细胞生长良好,提示此材料可作为构建组织工程化骨的支架材料^[2]。在本实验中,我们观察了将人牙周膜细胞接种于纳米-羟基磷灰石三维多孔支架材料上的细胞组织学表现,结果发现:接种15天后,星形或多角形细胞充分伸展,细胞表面可见细小的钙结节,并有少量胶原纤维长入支架组织中。提示:三维多孔纳米-羟基磷灰石支架材料具有良好的组织相容性,其多孔性和高孔隙率有利于细胞的生长和粘附,出现钙结节表明了其还具有促进牙周膜细胞向成骨细胞分化的能力,是一种比较符合牙周组织工程学条件的支架材料,有进一步研究推广的价值。

参考文献

- [1] Phipps RP, Borrello MA, Biede TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissue[J]. J Periodont Res, 1997, 32(2):159.
- [2] 毛 曦,储成林,毛 钊,等. 大鼠骨髓基质干细胞接种于纳米-羟基磷灰石构建组织工程化骨组织的研究[J]. 医学研究学报, 2004, 17(1):21.
- [3] 孙卫斌,吴亚菲,丁 一,等. 纳米-羟基磷灰石诱导人牙周膜细胞碱性磷酸酶表达的研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(6):348.
- [4] 杨 俭,毛 钊,毛 曦,等. 人参皂苷Rg1、甲壳胺和转化生长因子 β_1 对人牙周膜细胞增殖和分化功能的作用[J]. 医学研究学报, 2004, 17(11):961-965.
- [5] 吴织芬,董广英,石 玲. 转化生长因子- β 和胰岛素对人牙周膜细胞增殖的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 1997, 32(5):300-302.
- [6] 冯 雪,林 珠,段银钟,粒/巨噬细胞集落刺激因子对培养人牙周膜成纤维细胞生物学特性的影响[J]. 口腔医学, 2000, 20(1):6-7.
- [7] Zhang YF, Cheng XR, Chen Y, et al. Three-dimensional nano-hydroxylapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue[J]. J Biomater Appl, 2007, 21(4):333-349.
- [8] 孙凯堂,孙卫兵,储成林,等. 纳米羟基磷灰石-壳聚糖复合材料对细胞粘附的影响[J]. 临床口腔医学杂志, 2007, 23(3):150-153.

(收稿日期:2008-03-25)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王学文)