

人牙龈成纤维细胞的体外培养及生长曲线测定*

1.宁波市海曙口腔医院 2.福建医科大学附属口腔医院 王文瑜¹ 闫福华² 姚丽艳² 陈小玲²

【摘要】 目的:体外培养正常人牙龈成纤维细胞并测定其生长曲线,初步了解该细胞生物学特性。方法:用改良组织块法培养人牙龈成纤维细胞,通过MTT比色法研究细胞的生长曲线。结果:改良组织块法原代培养细胞成活率达80%,培养细胞呈梭形,从第3天呈对数生长,第4-5天进入平台期。结论:改良组织块法能简便快速地获得人牙龈成纤维细胞,初步了解其生物学特性。

【关键词】 人牙龈成纤维细胞 组织培养 生长曲线

人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblasts, HGFs)是牙龈固有层结缔组织的主要组成细胞,不仅具有活跃的自身更新能力,而且具有合成和降解胶原、弹力纤维、糖蛋白等细胞外基质的功能^[1]。本实验采用改良组织块培养法进行人GFs的原代培养,研究其生物学特性,为进一步研究做好准备。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM培养液(Gibco,美国),胰蛋白酶(Gibco,美国),胎牛血清FBS(天津灏洋生物公司),超净工作台(上海力申科学仪器有限公司),CO₂孵箱(Heraeus,德国),倒置相差显微镜(广州光学仪器厂),MTT(Sigma,美国),酶联免疫检测仪(Human 德国)

1.2 方法

1.2.1 原代培养

选取本院需行阻生牙拔除的患者,在征得患者同意后在术中切取小块牙龈组织。要求患者没有牙龈增生、炎症及使用过导致牙龈增生的药物。术前将拔牙器械及术区周围消毒灭菌,无菌条件下获取小块牙龈组织(约3mm×3mm)^[2],立即放入装有无血清DMEM培养液的小瓶中,在超净工作台内用含有抗生素(青霉素100u/ml,链霉素100μg/ml)的PBS反复冲洗,用锐利小剪刀尽量去除牙龈上皮,在玻璃皿上剪成1mm³左右的碎块,均匀铺于六孔培养板底面,其上覆盖20×20mm盖玻片。沿盖玻片边缘缓慢加入含10%FBS的DMEM培养液4ml,在饱和湿度、5%CO₂、37℃标准环境下孵育。倒置显微镜下严密观察细胞生长情况,培养最初3天避免过多观察细胞,待细胞爬满培养板底70%后进行传代。

1.2.2 传代培养

在倒置显微镜下观察,当从组织块游出的原代细胞爬满培养板底70%后,揭开覆盖的盖玻片,用2.5g/L胰蛋白酶+1g/L乙二胺四乙酸混合消化液进行传代。将待传代的细胞培养孔中的旧培养液吸掉,PBS冲洗两遍后,加入2ml消化液,10分钟左右,在倒置相差显微镜下观察见胞质回缩,细胞由细长变为圆形,立即加入含10%FBS培养液终止消化,反复吹打孔底细胞,使之脱离,并形成细胞悬液,首次传代比例为1:1,待细胞长满后,以1:4传代,再继续传代并扩传。

1.2.3 形态观察

倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 生长曲线测定

取生长良好的第四代细胞,消化后收集细胞,按每孔细胞数8000个接种于96孔培养板,于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,3d换一次培养液。于培养1d,2d,3d,4d,5d取出培养板,各检测孔内分别加入20μl MTT液,放入细胞培养孵育4h后取出,轻轻吸去上清液,每孔分别加入二甲亚砜150μl,混匀,充分振荡10min,酶联免疫检测仪490nm检测各孔吸光值,用平均OD值与各时间点绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 细胞生长形态观察

本实验共接种细胞五孔,四孔培养成功,成功率约为80%。原代细胞于8-11天从组织块游出,以组织块为中心呈放射状排列生长。倒置显微镜下观察细胞呈长梭形,胞体丰满,胞浆突2-4个,胞浆均匀,细胞核呈圆形(见图1)。细胞生长特点是贴壁生长,随着培养天数的增加,逐渐向四周伸展。同时,也可见少量呈扁平的多角形细胞,在胞质中央处有圆形的细胞核,此为上皮样细胞。传代后人牙龈成纤维细胞生长旺盛,状态良好,上皮样细胞消失。

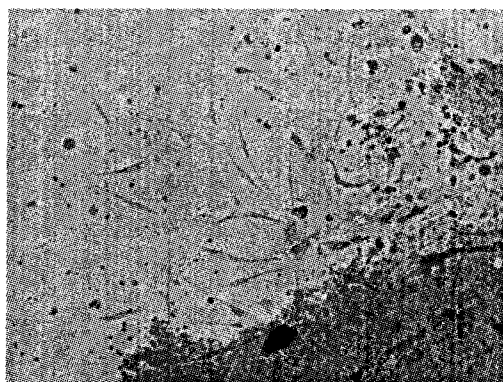


图1 原代培养的HGFs,接种8天后可见组织周围有细胞游出(倒置显微镜,×200)

2.2 生长曲线

接种后第2天开始细胞数目开始增加,第3天进入对数生

*福建省卫生厅医学创新课题项目编号:2003-cx-11。

人牙龈成纤维细胞的体外培养及生长曲线测定

长期,第4-5天细胞生长减缓,细胞生长曲线大致呈S形(见图2)。

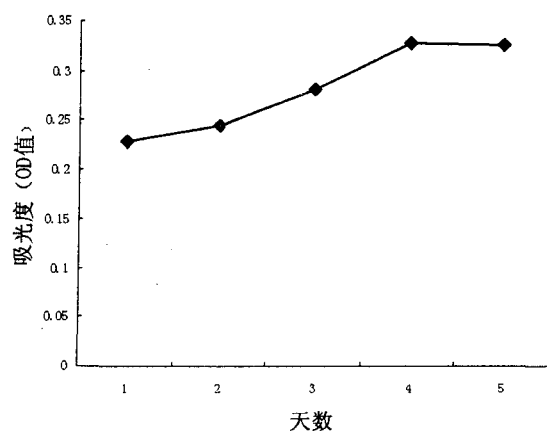


图2 HGFs生长曲线

3 讨论

人牙龈成纤维细胞是牙龈固有层的主要细胞,不仅具有活跃的自身更新能力,而且具有合成和降解胶原等细胞外基质的功能,在许多生理和病理过程中起着重要作用。近年来,牙龈成纤维细胞体外培养模型常常用来研究牙周发病机制和治疗^[3,4]。

实验采用本实验室改良的组织块法进行人牙龈成纤维细胞的原代培养,培养成功率高^[5]。由于实验中取得牙龈组织来源较丰富,在细胞培养中组织块多的培养容易成功^[6]。细胞培养成功的前提是细胞附着于壁上,利用盖玻片轻压组织块的方法能有效防止组织块漂起,培养板和玻片的组织面能形成更多的细胞贴附面,更利于细胞更好的贴壁生长及繁殖。而且,为提高培养成功率培养液应使用适当的血清浓度,大多数文献报道使用10%胎牛血清,本实验使用该浓度也取得较好的效果^[7]。

在将组织块进行剪切成小块的过程中尽量去除上皮组织,

由于牙龈组织的结构特殊性,上皮钉突多而细长,较深地插入固有层中,并不能完全去除,因此在原代培养时细胞的成分较杂,随着消化和传代,上皮细胞减少而成纤维细胞大量繁殖。

通过生长曲线测定,我们发现细胞在传代后第1-2天生长较为缓慢,自第三天起细胞分裂增殖活跃,生长迅速,进入对数生长期,在第4天时可达最高峰,当细胞生长接近饱和时,生长速度明显减缓,可见其生长呈现“滞缓-对数生长-平台”模式^[8]。

实验通过改良的体外培养方法,简便快速地获得人牙龈成纤维细胞并初步了解其生物学特性,为将来进行相关的研究奠定了基础。

参考文献

- [1]Hoang AM, Chen D, Oates TW, et al. Development and characterization of a transformed human periodontal ligament cell line. *J Periodontol*, 1997, 68(11): 1054.
- [2]Somerman MJ, Archer SY, Imm GR et al. A Comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res*, 1988; 67(1): 66.
- [3]Ohazama A, Isatsu K, Hatayama J, et al. Periodontal tissue regeneration using fibrin tissue adhesion material in vitro and in vivo. *Periodont Clin Investig*, 1996, 18(1): 26.
- [4]Feng F, Liu CM, Hsu WC, et al. Long-term effects of gingival fibroblasts-coated hydroxylapatite graft on periodontal osseous defects. *J Formos Med Assoc*, 1995, 94(8): 494.
- [5]林敏魁, 闫福华, 赵欣等. 狗牙周膜成纤维细胞的体外培养及其生物学活性[J]. *中国临床康复*, 2004, 8 (8): 1456.
- [6]葛少华, 杨丕山, 戚向敏等. 人牙周组织中三种细胞的培养、形态学及增殖性研究[J]. *北京口腔医学*, 2003, 11(2): 70.
- [7]Dean JW, Blankenship JA. Migration of gingival fibroblasts on fibronectin and laminin. *J Periodontol*, 1997, 68(8): 750.
- [8]刘斌, 吴军正, 司徒镇强, 等. 人牙龈成纤维细胞系的建立及其生物学特性. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 1999, 9(1): 34.

(上接第4页) in the beagle dog[J]. *J Periodontal Res*, 1973, 8(1): 1-10

[6]Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, et al. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction [J]. *Clin Infect Dis*, 1995, 20(Suppl 2): 304-307

[7]Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2004, 19(3): 168-176

[8]Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(11): 4950-4954.

[9]Hiroshi M, Chiyo Fujimoto, Yasuhiro Haruki, et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria[J]. *Immunol Med Microbiol*, 2003, 39(1): 81-86.

[10]User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. P/N 4303859B: 1-36.

[11]Mark A, Valasek, JJ Repa. The power of real-time PCR[J]. *Adv Physiol Educ*, 2005, 9(3): 151-159.

[12]Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, et al. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2004, 19(3): 168-176.