

富血小板纤维蛋白凝胶析出液对人牙髓细胞体外矿化的影响^①

何璇, 韦维, 陈文霞^②

(广西医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科, 广西南宁 530021)

E-mail: hexuan269@163.com

摘要: **目的** 探索富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)凝胶析出液对人牙髓细胞(human dental pulp cells, hDPCs)体外矿化的影响。**方法** 组织块法培养 hDPCs。采用 Choukroun 一步离心法制备 PRF 凝胶。将新鲜制备的 PRF 凝胶浸泡于 DMEM 培养基中, 于第 7 d 取析出液。用 PRF 凝胶析出液孵育 hDPCs 3 d 后更换矿化诱导液。采用茜素红染色和 RT-PCR 检测人牙髓细胞矿化的潜能。**结果** 矿化诱导 21 d 后, 茜素红染色观察到实验组有少量钙结节生成, 而对照组无钙结节生成; RT-PCR 结果显示, 实验组 hDPCs 碱性磷酸酶(ALP)的表达为对照组的 1.5 倍, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** PRF 凝胶析出液可促进人牙髓细胞矿化。

关键词: 富血小板纤维蛋白凝胶; 析出液; 人牙髓细胞; 矿化

中图分类号: R322.41

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2015)03-0349-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.03.01

The effect of platelet-rich fibrin gel precipitate liquid on mineralization of human dental pulp cells *in vitro*

He Xuan, Wei Wei, Chen Wenxia

(Department of Endodontics, the Affiliated Hospital of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China E-mail: hexuan269@163.com)

Abstract: **Objective** This study was designed to investigate the effect of platelet-rich fibrin gel (PRF gel) precipitate liquid on the mineralization of human dental pulp cells (hDPCs) *in vitro*. **Methods** The hDPCs were separated and cultured by using tissue block culture method. PRF gel was prepared by Choukroun's protocols. The newly prepared PRF gel was dipped in DMEM culture media, the precipitate liquid of PRF gel was collected on day 7. hDPCs were treated with mineralization induction solution 3 days after being incubated with the precipitate liquid of PRF gel. The capacity of mineralization was measured by using alizarin red staining and RT-PCR. **Results** Twenty-one days after mineralization induction, a small amount of mineralized nodules on alizarin red staining were observed in experimental group while no mineralized nodule was observed in control group; RT-PCR revealed that the expression of alkaline phosphatase (ALP) in experimental group was 1.5 times higher than that in control group, comparison yielded statistical difference ($P < 0.05$).

Conclusion The precipitate liquid of PRF gel can accelerate the mineralization of hDPCs.

Key words: platelet-rich fibrin gel; precipitate liquid; human dental pulp cells; mineralization

组织工程化牙髓再生包括三个基本要素: 种子细胞、生物支架和局部诱导微环境^[1]。含有未分化间充质干细胞的牙髓细胞来源相对广泛、分离培养过程简单, 使其进入牙髓再生种子细胞的选择之列。富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)因其具有良好的三维结构和生长因子释放性能, 目前已有研究者将其作为支架材料应用于组织再生领域^[2-3]。

本研究通过探索 PRF 凝胶析出液对人牙髓细胞(human dental pulp cells, hDPCs)体外矿化的影响, 评价 PRF 凝胶作为牙髓组织再生支架的生物学活性。

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器 DMEM 培养基(Hyclone, 美国); 胎牛血清(Hyclone, 美国); 胰蛋白酶(索莱宝, 北京); 地塞米松(Sigma, 美国); β -甘油磷酸钠(Sigma, 美国); 维生素 C(Sigma, 美国); 5 ml 一次性使用真空采血管(精宇, 南昌); PBS(迈新, 福州); 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); CO₂ 孵育箱(Sheldon Manufacturing 公司, 美国); 倒置显微镜及照相系统(Olympus 公司, 日本); 台式离心机(Sigma, 美国)。

1.2 hDPCs 的分离培养 经广西医科大学附属口腔医院伦理委员会通过, 经患者知情同意。选取患者因

① 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160133)

② 通讯作者, E-mail: angelaxiacw@163.com

治疗需要拔除的健康恒牙, 无菌高速涡轮机金刚砂车针沿牙釉质—牙骨质界进行环形切割, 暴露髓腔, 取出牙髓后转移至超净台。剪弃根尖 1 mm 牙髓, 在培养皿中将牙髓组织剪碎成约 1 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块若干。用滴管将组织块转移至 25 ml 塑料培养瓶中, 均匀平铺于培养瓶底部, 组织块间距 5~10 mm。加入 1.5 ml 含 20% FBS 的 DMEM 培养基。置饱和湿度、含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次。待细胞生长达 80%~90% 融合时, 胰蛋白酶消化传代。

1.3 PRF 凝胶析出液的制备 经广西医科大学附属口腔医院伦理委员会通过, 获得志愿者的知情同意。抽取志愿者静脉血 5 ml 即刻置入真空采血管(不含任何抗凝剂), 采用 Choukroun 一步离心法^[4], 即 400 g 离心 10 min, 静置 5 min 制备 PRF 凝胶, 离心后血液分为 3 层, 上层为液态贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP), 下层为红细胞, 中间层即为 PRF 凝胶。将真空采血管中的 PRF 凝胶取出并称重, 每 1.0 g PRF 凝胶置入 2.5 ml 的 DMEM 中, 于第 7 d 取析出液。

1.4 PRF 凝胶析出液对 hDPCs 体外矿化的影响 取第 3 代 hDPCs, 以 1×10⁴/孔的密度接种于 6 孔板, 在常规培养基(含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基)中添加 PRF 凝胶析出液孵育 3 d(析出液与培养基的比例为 1:1), 以常规培养基作对照。在细胞贴壁生长达到 80% 融合时, 更换含 10 mmol/L β-甘油磷酸钠、100 μg/ml 维生素 C、10 nmol/L 地塞米松、20% FBS 的 DMEM 矿化诱导液, 每 3 d 换液 1 次。

1.5 茜素红染色 矿化诱导 21 d 时, 从培养箱中取出 6 孔板, PBS 浸泡清洗 3 次, 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, PBS 冲洗 3 次, 加入 0.2% 茜素红溶液, 37 °C 染色 30 min, 蒸馏水洗去多余染料, 晾干, 镜检。

1.6 RT-PCR 反应 矿化诱导 21 d 时, 从培养箱中取出 6 孔板, 用 Trizol 法提取总 RNA 并逆转录合成 cDNA; 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate, GAPDH)做内参, 按试剂盒说明书进行实时定量 PCR 反应, 检测 ALP mRNA 表达水平, 所用各引物序列见表 1, 实验重复 3 次。

表 1 人 ALP 引物序列

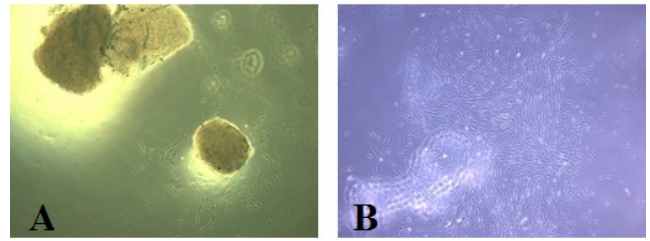
基因	引物序列(5'-3')	基因库序列号
ALPL-F	CATGCTGAGTGACACAGACAAGAA	NM_000478.4
ALPL-R	ACAGCAGACTGCGCCTGGTA	
GAPDH-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	NM_002046.3
GAPDH-R	TGGTGAAGACGCCAGTGGTA	

1.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件包对实验结果进行统计学分析, 统计方法为单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织块培养法培养 hDPCs 原代细胞培养时, 贴壁的组织块在体外培养 5~7 d 开始向外爬出细胞,

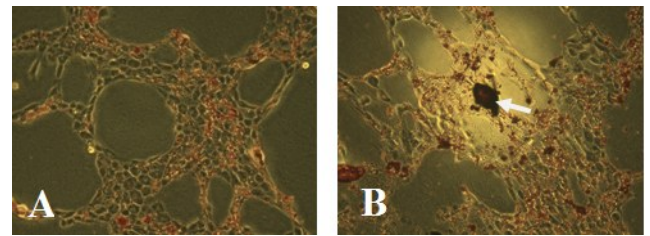
细胞呈典型的长梭形、成纤维细胞样形态, 15 d 时可传代。传代后细胞呈放射状集落生长, 形态稳定, 平均约 4 d 传代 1 次, 见图 1。



A 图示培养第 5 d 细胞从组织块中爬出(×40);
B 图示培养 hDPCs 呈放射状集落样生长(×40)

图 1 组织块法培养牙髓细胞

2.2 茜素红染色结果 矿化诱导 21 d 后, 茜素红染色观察到 hDPCs 由长梭形、成纤维细胞样形态变成了鹅卵石状并呈叠瓦状排列, 实验组有少量橘红色的钙结节生成, 而对照组无钙结节生成, 见图 2。



A 图示矿化诱导 21 d 后对照组染色结果, 未发现有钙结节; B 图示矿化诱导 21 d 后实验组染色结果, 可见橘红色的钙结节生成(箭头所示)

图 2 hDPCs 矿化诱导茜素红染色结果

2.3 RT-PCR 结果 诱导矿化 21 d 后, RT-PCR 检测 ALP mRNA 表达水平显示, 经 PRF 析出液孵育后的 hDPCs 的 ALP 表达水平是对照组的 1.5 倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见图 3。

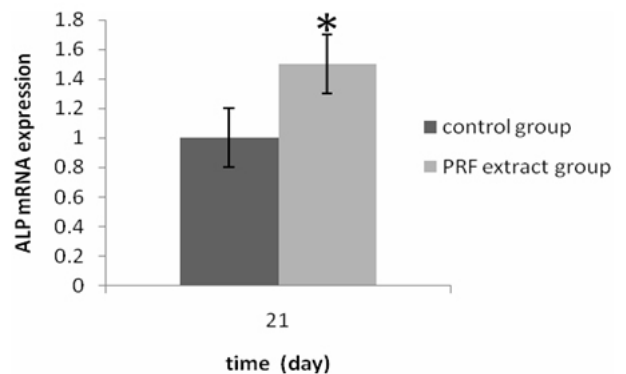


图 3 PRF 凝胶析出液对 hDPCs 的 ALP mRNA 表达水平的影响

3 讨论

牙髓细胞的成分包括成牙本质细胞、成纤维细胞、

防御细胞和储备细胞。成纤维细胞是牙髓的主体细胞,又称为牙髓细胞。成纤维细胞可产生明胶状基质和胶原纤维,未成熟的成纤维细胞可分化为成牙本质细胞^[5]。本研究采用组织块培养法原代培养牙髓细胞,所得到的细胞以长梭形的成纤维细胞为主。牙髓干细胞可从牙髓细胞中筛选分离获得,然而干细胞移植需要复杂的分离过程及昂贵的细胞处理费用,并存在一定的致癌风险。因而本研究采用来源相对广泛、分离培养过程简单的牙髓细胞作为种子细胞。

PRF 被誉为第二代血小板浓缩物^[6],其特有的三维结构可以为组织再生提供支架,并且在降解的过程中可缓慢释放多种生长因子促进组织修复和再生^[7]。本研究通过茜素红染色和 RT-PCR 评估 PRF 凝胶析出液对 hDPCs 体外矿化的影响。茜素红染色结果表明,矿化诱导 21 d 后,经 PRF 凝胶析出液孵育后的 hDPCs 可观察到钙结节生成,而未经 PRF 凝胶析出液孵育的 hDPCs 无钙结节生成。ALP 是参与骨等矿化组织形成、代谢和再生的一种功能性标志酶^[8]。牙乳头外胚间充质细胞向成牙本质细胞分化的过程中可分泌矿化前基质,后者在 ALP 等矿化因子作用下才最终形成牙本质。较高的 ALP 是牙髓细胞分化的前提条件,其活性的增高是 hDPCs 早期成牙本质/成骨向分化的标志^[9]。本研究 RT-PCR 结果显示,经 PRF 析出液孵育后 hDPCs 的 ALP mRNA 表达水平是对照组的 1.5 倍。

综上所述,PRF 凝胶析出液可促进人牙髓细胞矿化,提示其具有成为牙髓再生的支架材料所必需的生物学活性。

参考文献:

- [1] Yildirim S, Fu SY, Kim K, et al. Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative

medicine[J]. *Int J Oral Sci*, 2011, 3(3): 107-116.

- [2] Ji B, Sheng L, Chen G, et al. The Combination use of platelet-rich fibrin and treated dentin matrix for tooth root regeneration by cell homing[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2015, 21(1-2): 26-34.
- [3] Chen Y, Niu Z, Xue Y, et al. Improvement in the repair of defects in maxillofacial soft tissue in irradiated minipigs by a mixture of adipose-derived stem cells and platelet-rich fibrin[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2014, 52(8): 740-745.
- [4] Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, et al. Une opportunité en parodontologie: le PRF[J]. *Implantodontie*, 2001, 42(55): e62.
- [5] Couble M-L, Farges J-C, Bleicher F, et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures[J]. *Calcif Tissue Int*, 2000, 66(2): 129-138.
- [6] Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006, 101(3): e37-44.
- [7] Dohan Ehrenfest DM, De Peppo GM, Doglioli P, et al. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies[J]. *Growth Factors*, 2009, 27(1): 63-69.
- [8] Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(17): 3238-3248.
- [9] Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP)[J]. *Archives of oral biology*, 2011, 56(7): 709-721.

收稿日期:2015-04-13;修回日期:2015-05-03

读者·作者·编者

●关于对常用统计学符号及统计学方法的要求

统计学符号按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定一律采取斜体排印。常用符号及计量要求:1. 算术平均数用英文小写 \bar{x} (中位数用 M);2. 标准差用英文小写 s ;3. 标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$;4. t 检验用英文小写 t ;5. F 检验用英文大写 F ;6. 卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;7. 相关系数用英文小写 r ;8. 概率用英文大写 P (P 值前应给出具体数值的检验值,如 t 值、 χ^2 值、 q 值等), P 值应给出实际数值,不宜用大于或小于表示,而用等于表示。

(本刊编辑部)