

血小板衍生生长因子 β 对体外人牙周膜细胞增殖分化的影响*

林景广, 亓峰, 葛一鸣, 韩杰

Effect of platelet-derived growth factor beta on *in vitro* proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells

Lin Jing-guang, Qi Feng, Ge Yi-ming, Han Jie

Abstract

BACKGROUND: Periodontal supporting tissues destroy and attachment losses are the main reasons for tooth loss. Cytokine can promote periodontal tissue regeneration.

OBJECTIVE: To research the effect of platelet-derived growth factor- β (PDGF- β) in the human periodontal ligament cells proliferation.

METHODS: Human fibroblasts were cultured with tissue block method *in vitro*. The passaged cells were identified by Bosi protein, keratin immunohistochemistry for qualitative analysis. PDGF- β was added to induce periodontal ligament cells proliferation, and the absorbance value was measured by MTT method.

RESULTS AND CONCLUSION: The cell proliferation was accelerated after adding 10 $\mu\text{g/L}$ PDGF- β factor, the absorbance value of the experimental group was greater than that of the control group ($P < 0.05$). The findings demonstrated that PDGF- β can promote the proliferation of human periodontal ligament cells.

Lin JG, Qi F, Ge YM, Han J. Effect of platelet-derived growth factor beta on *in vitro* proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(2): 265-268. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 牙周支持组织破坏及附着丧失是导致失牙的最主要原因, 细胞因子能促进牙周组织再生形成新附着。

目的: 观察血小板衍生生长因子 β 在牙周膜成纤维细胞增殖过程中的作用。

方法: 体外利用组织块法培养人牙周膜成纤维细胞, 对传代后细胞进行组织来源鉴定, 通过波丝蛋白、角蛋白免疫组化染色进行定性分析, 并加入生物因子血小板衍生生长因子 β 对人牙周膜成纤维细胞进行增殖诱导, 采用MTT法测定吸光度值。

结果与结论: 加入质量浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 的血小板衍生生长因子 β 后, 细胞增殖加速, 在加入生长因子血小板衍生生长因子 β 后, 实验组的吸光度显著高于对照组, 说明血小板衍生生长因子 β 对牙周膜成纤维细胞的增殖具有明显的促进作用。

关键词: 牙周膜成纤维细胞; 血小板衍生生长因子 β ; 增殖; 慢性牙周炎; 分化

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.02.018

林景广, 亓峰, 葛一鸣, 韩杰. 血小板衍生生长因子 β 对体外人牙周膜细胞增殖分化的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(2):265-268. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Stomatology Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Lin Jing-guang, Chief physician, Professor, Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Stomatology Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China 379311389@qq.com; linjg138@sohu.com

Supported by: the Science and Technology Research Program of Education Department of Liaoning Province, No. 2008339*

Received: 2010-07-14 Accepted: 2010-08-28

0 引言

慢性牙周炎可造成牙周支持组织的破坏及附着丧失的形成, 是导致牙齿缺失的最主要原因^[1-2]。

对于慢性牙周炎患者的治疗不应仅局限于对其牙周炎症的控制, 更应注重通过对已经破坏的牙周组织形成新的附着^[3], 恢复患者的美观及咀嚼功能。探讨促进或阻碍被破坏牙周组织的修复因素及其作用机制是当前所关注的课题。

近年来, 随着组织工程学及其他相关科学的迅速发展, 发现碱性成纤维细胞生长因子、骨诱导形成蛋白、釉基质蛋白、胰岛素样生长因子、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等大量促进细胞增殖的生物因子, 并应用于临床治疗之中^[4-8], 这些细

胞因子的应用为牙周病的治疗起到了辅助性作用^[9]。

本实验旨在通过检测PDGF- β 对体外培养的人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cells, hPDLFs)的增殖效应及PDGF- β 对hPDLFs DNA合成和细胞周期的影响, 探讨PDGF- β 促进牙周组织再生的细胞生物学机制, 为PDGF- β 在牙周病学领域的应用提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 随机对照细胞学实验。

时间及地点: 于2009-03/2010-09在辽宁医学院实验中心和免疫组化中心完成。

对象: 19岁男性患者, 全身无系统性疾病, 全口无牙周病, 因正畸需要而拔除4颗健康双尖牙, 经患者知情同意后, 用于本次实验。

辽宁医学院附属第二医院暨附属口腔医院, 辽宁省锦州市 121000

林景广, 男, 1963年生, 辽宁省锦州市人, 汉族, 1986年中国医科大学毕业, 主任医师, 教授, 从事牙体牙髓及牙周方面的研究。379311389@qq.com; linjg138@sohu.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225
(2011)02-00265-04

收稿日期:2010-07-14
修回日期:2010-08-28
(20100714003/YJ-Z)

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养液、胎牛血清	美国 Gibco 公司
鼠抗人波形丝蛋白单克隆抗体、 鼠抗人角蛋白单克隆抗体	北京中杉金桥有限公司
MTT	河北博海生物有限公司
倒置相差显微镜	日本 OLYMPUS 公司

方法:

hPDLFs的培养: 将拔除的4颗健康双尖牙立即投入预冷的含体积分数15%胎牛血清双抗的DMEM培养液中, 刮取根中1/3处的牙周膜组织, 将组织块以均匀间距接种于25 mL培养瓶中^[10], 待4 h细胞贴壁后, 加入5 mL含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液放入孵箱。细胞覆盖平底80%后按1: 2传代培养, 传至3代后, 制成 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的细胞悬液并制备细胞爬片, 并分别采用鼠抗人波形丝蛋白单克隆抗体、鼠抗人角蛋白单克隆抗体进行波形蛋白, 角蛋白免疫组化染色, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法^[11], DAB显色, 倒置相差显微镜下观察染色结果。

分组与干预: 取生长良好的第3代hPDLFs, 以含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液调整细胞浓度至 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 4块96孔板每孔接种细胞悬液200 μL, 标准环境下培养24 h后, 更换含体积分数1%胎牛血清的DMEM培养液培养24 h, 使细胞相对同步化^[12-13]。按照1: 2的浓度将细胞完全随机分组法选择实验组与对照组, 实验组加入质量浓度为10 μg/L的PDGF-β, 对照组每孔加入含体积分数1%胎牛血清的DMEM 200 μL。

MTT检测: 分别于培养后第1, 3, 5, 7天完全随机分组法取出1块培养板, MTT法检测细胞增殖^[12], 测定吸光度值为490 nm。

主要观察指标: 波形蛋白、角蛋白的表达及对加入PDGF-β后对hPDLFs增殖的影响。

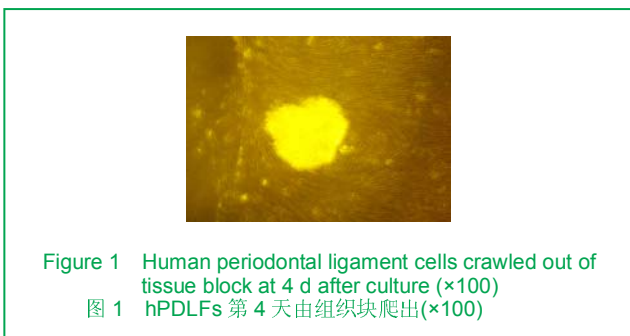
设计、实施、评估者: 实验的设计及干预实施为第一作者, 评估为第二、三作者, 均经过正规培训采用盲法评估。

统计学分析: 应用美国SPSS公司SPSS 12.0统计软件进行组间t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 hPDLFs的原代细胞培养与形态学表现 原代hPDLFs第4天从组织块中游离, 以组织块为中心呈日光状放射生长, 镜下观察细胞胞体丰满, 胞浆突2~4个, 胞浆均匀, 呈长梭形。细胞核呈圆形或卵圆形, 单核。有时也可见少量呈扁平状的多角形上皮细胞, 由于长梭形的成纤维细胞生长速度很快, 取材时混杂的上皮细胞生长缓慢, 形成生长速度上的明显差异。细胞传代后,

上皮细胞消失, hPDLFs得以纯化。



2.2 hPDLFs 的组织来源鉴定 细胞为梭形, 细胞核为圆形或卵圆形, 位于细胞的中心。波形蛋白染色阳性, 细胞胞浆棕黄色染色, 细胞核染成蓝色(见图 2a); 角蛋白染色阴性, 细胞胞浆阴性, 细胞核染成蓝色(见图 2b), 以上免疫组化染色特点均符合中胚层来源的成纤维细胞样细胞的特征^[14-16]。



2.3 MTT法检测PDGF-β对hPDLFs增殖影响 在加入生长因子PDGF-β后, 实验组的吸光度显著高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 说明PDGF-β可以加速hPDLFs的增殖, 且增殖作用显著, 见表1。

Group	Time after intervention (d)			
	1	3	5	7
Control	0.358±0.031	0.463±0.033	0.665±0.036	0.853±0.028
Experimental	0.383±0.029 ^a	0.982±0.028 ^b	1.322±0.038 ^b	1.573±0.041 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. control group

3 讨论

随着分子生物学技术的飞速发展和对牙周病学诊断和治疗技术的逐步深入, 牙髓、牙周病的治疗在口腔内科学中是一个重要的课题, 而如何促进牙髓、牙体硬组织以及牙周组织的生理性修复和再生是该课题的中心环节。而牙周组织的再生已成为牙周病治疗的重点和难点^[17]。牙周组织的修复和重建, 有赖于残余牙周膜中

牙周韧带细胞在多种生物介质调控下, 完成分裂、趋化、分化和细胞外基质生物合成等一系列关键的细胞活动^[18]。有研究发现, 一些生物因子有助于牙周组织的重建, 其中PDGF对于碱性磷酸酶阳性和阴性的细胞均表现出强大的趋化作用, 并能刺激DNA以及胶原和非胶原蛋白的合成^[19], 从而促进组织的再生。

牙周膜细胞(periodontal ligament cell, PDL-C)是牙周组织再生的前提细胞, 为一种复杂的细胞群, 包括成纤维细胞、成牙骨质细胞、成骨细胞和间充质细胞等, 这是形成新的牙周组织的基础。牙周组织的再生修复首先要有一定数量的健康的牙周膜细胞, 而生长因子恰能增强这些细胞的增殖活性。Graves等^[20]认为牙周组织再生过程中都有一种递质表达, 把此种递质称为生长因子, 结果发现这种物质能刺激细胞的一系列活动, 包括促进趋化性、细胞的增殖分化及细胞外基质蛋白的表达; 而通过加入外源性生长因子的实验, 结果表明这些因子刺激了牙周膜细胞的增殖, 加速了牙周组织新生。这些因子包括PDGF、胰岛素样生长因子、转化生长因子 β 、碱性成纤维生长因子、骨形态发生蛋白等。

Gestrelus等^[21]用含各类生长因子的釉质基质诱导剂在体外研究对PDL-C增殖影响发现: ①能促进PDL-C的增殖。②增加PDL-C的蛋白产生量。③促进PDL-C矿化小结形成。④但对牙周膜细胞的迁移和附着无显著影响。

PDGF能显著增强人PDL-C分裂活性; 诱导纤维连接蛋白、I, III, V型胶原及组织金属蛋白酶抑制剂因子的合成; 刺激成骨细胞活性, 抑制胶原酶和纤维蛋白酶原激活因子。PDGF为成纤维细胞和成骨细胞潜在的丝裂和趋化因子, 能刺激其DNA、胶原蛋白及非胶原蛋白的合成, 加速骨细胞代谢, 促进牙骨质新生^[22]。

本实验采用MTT比色法观察PDGF- β 对hPDLFs的增殖效果。MTT法是利用活细胞线粒体中的脱氢酶使MTT分子还原为不溶性蓝紫色结晶体, 形成量与细胞数量和活性呈正相关的关系, 通过比色测定即可反映出活细胞数量和活性。本实验结果表明, 加入质量浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 的PDGF- β 后, 细胞增殖加速, 在加入生长因子PDGF- β 后, 实验组的吸光度显著高于对照组, 说明PDGF- β 对hPDLFs的增殖具有明显的促进作用。对于牙周组织的再生治疗, 关键在于刺激剩余牙周膜细胞的增殖, 使其活性提高。本实验表明PDGF- β 具有明显的促增殖的作用。PDGF- β 对hPDLFs代谢方面的报道已有不少, 冯超^[23]体外培养hPDLFs用不同浓度的PDGF- β 作用, 用MTT法测定细胞增殖, 结果发现PDGF- β 可促进hPDLFs增殖。吉建新等^[13]发现PDGF- β 对hPDLFs促增殖效应在1~50 $\mu\text{g/L}$, 在5 d范围内呈浓度-时间依赖关系, 最佳效应时间为3 d, 最佳质量浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 。Tsuyoshi-Fuiita等^[24]用³H-TdR掺入法测定PDGF- β 对HPDLFsDNA合成的影响, 从而测定其它增殖效应, 结果发现10 $\mu\text{g/L}$ 的PDGF- β

比对照组能明显促进hPDLFs增殖。

本实验通过组织块法成功地培养了hPDLFs。组织块法是培养牙龈成纤维细胞的经典方法^[25], 其操作简单, 污染率低, 对组织损伤小, 故本实验采用组织块法进行人牙龈成纤维细胞的原代培养。并通过波丝蛋白角蛋白免疫组化染色对细胞进行组织来源的鉴定, 鉴定结果表明其来源于中胚层的成纤维细胞样细胞。因此, 认为PDGF- β 对hPDLFs的增殖及趋化具有一定的潜在促进作用^[16, 26]。

本实验采用PDGF- β 对传代后的第3代细胞进行诱导, 通过MTT法对细胞不同时期的增殖情况进行测定。发现在加入最适质量浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 的PDGF- β 因子后, 细胞增殖开始加速, 实验组的增殖速度高于对照组, 因此说明PDGF- β 作为成骨细胞和成纤维细胞潜在的分裂繁殖和趋化因子对体外培养的hPDLFs具有促进增殖及趋化的作用。

慢性牙周炎治疗研究的热点是恢复牙周组织原有的结构和功能, 使已丧失的牙周膜、牙骨质和牙槽骨达到协调一致的再生。应用外源性生长因子已成为一种有前景的牙周治疗的手段。通过体外牙周膜细胞模型的构建, 发现在体外环境下PDGF- β 对hPDLFs的增殖具有显著的促进作用。但也有学者认为PDGF在作用于hPDLFs增殖的过程中起双向调节作用^[27], 在刺激增殖的同时还抑制hPDLFs的生长^[28], 并认为任何一种生物因子都不是独立作用于细胞, 而是与其他因子共同协调, 形成一个有机整体, 共同完成对牙周组织的修复作用^[29-30]。生长因子作为牙周组织再生修复的重要调节因子, 它对牙周组织再生修复的作用是比较肯定的。但是牙周组织再生修复是一个复杂的过程, 是受多种因素影响的, 本实验也仅仅是在体外的环境下完成, 当各种生物因子作用于人体复杂的环境中, 其调节机制是否发生改变还尚不十分清楚, 但本实验证明了PDGF- β 的存在对hPDLFs的增殖具有诱导, 为牙周组织再生的研究指明了一个方向。

4 参考文献

- [1] Nogueira-Filho GR, Rosa BT, David-Neto JR. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the treatment of severe cases of periodontitis. *Undersea Hyperb Med.* 2010;37(2):107-114.
- [2] Kadi G. Patients are trading in their Porsches for Priuses: stay ahead of the rapidly changing patient buying habits. *Alpha Omegan.* 2010;103(1):22-23.
- [3] Kao RT, Lee S, Harpenau L. Clinical challenges in diagnosing and monitoring periodontal inflammation. *J Calif Dent Assoc.* 2010;38(4):263-270.
- [4] Zhang XP, Yang L, Shi HS, et al. An N-, C-terminally truncated basic fibroblast growth factor and LPD (liposome-polycation-DNA) complexes elicits a protective immune response against murine colon carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(3):276-281
- [5] Wongpanit P, Ueda H, Tabata Y, et al. In vitro and in vivo release of basic fibroblast growth factor using a silk fibroin scaffold as delivery carrier. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2010;21(11):1403-1419.
- [6] Akasaka Y, Ono I, Kamiya T, et al. The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. *J Pathol.* 2010;221(3):285-299.

[7] Jeong A, Lee HJ, Jeong SJ, et al. Compound K inhibits basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis via regulation of p38 mitogen activated protein kinase and AKT in human umbilical vein endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(6): 945-950.

[8] Jotwani R, Moonga BS, Gupta S, et al. Nuclear factor-kappaB p50 subunits in chronic periodontitis and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192(1):278-285.

[9] Elçin YM, Inanç B, Elçin AE. Human embryonic stem cell differentiation on periodontal ligament fibroblasts. *Methods Mol Biol.* 2010;584:269-281.

[10] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: World Publishing Corporation. 2004. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社. 2004.

[11] Thomopoulos S, Das R, Sakiyama-Elbert S, et al. bFGF and PDGF-BB for tendon repair: controlled release and biologic activity by tendon fibroblasts in vitro. *Ann Biomed Eng.* 2010; 38(2):225-234.

[12] Li L, Asteriou T, Bernert B, et al. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. *Biochem J.* 2007;404(2):327-336.

[13] Ji JX, Liao WJ, Qiu ZH, et al. Redai Yixue Zazhi. 2005;5(2): 124-127. 吉建新, 廖伟娟, 邱志辉, 等. 血小板衍生生长因子-BB和转化生长因子-β对体外人牙周膜细胞增殖的影响[J]. 热带医学杂志, 2005, 5(2):124-127.

[14] Fini M, Motta A, Torricelli P, et al. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials.* 2005;26(17):3527-3536.

[15] Li C, Vepari C, Jin HJ, et al. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(16):3115-3124.

[16] Altman GH, Horan RL, Lu HH, et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials.* 2002; 23(20):4131-4141.

[17] Altman GH, Horan RL, Martin I, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J.* 2002;16(2):270-272.

[18] Altman GH, Lu HH, Horan RL, et al. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J Biomech Eng.* 2002;124(6):742-749.

[19] Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng.* 2004; 32(1):112-122.

[20] Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr Opin Periodontol.* 1994: 178-186.

[21] Gestreluis S, Andersson C, Lidström D, et al. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol.* 1997;24(9 Pt 2):685-692.

[22] Page RC. Periodontal therapy: prospects for the future. *J Periodontol.* 1993;64(8 Suppl):744-753.

[23] Feng C. Zhonghua Linchuangyixue Zazhi. 2004;5(9):24-25. 冯超. 血小板衍生生长因子与离体人牙周膜细胞增殖[J]. 中华临床医学杂志, 2004, 5(9):24-25.

[24] Fujita T, Shiba H, Van Dyke TE, et al. Differential effects of growth factors and cytokines on the synthesis of SPARC, DNA, fibronectin and alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int.* 2004;28(4):281-286.

[25] Meinel L, Karageorgiou V, Hofmann S, et al. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2004;71(1):25-34.

[26] Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, et al. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials.* 2005;26(21):4442-4452.

[27] Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, et al. Clinical application of marrow mesenchymal stem cells for hard tissue repair. *Yonsei Med J.* 2004;45 Suppl:61-67.

[28] Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, et al. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials.* 2006;27(25):4434-4442.

[29] Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials.* 2007;28(6):1152-1162.

[30] Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering.* Science. 1993; 260(5110): 920-926.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 辽宁教育厅科学技术研究项目(2008339), 项目名称: 血小板衍生生长因子β对体外人牙周膜细胞增殖分化的影响。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 通过健康牙周膜利用组织块法, 体外建立了牙周膜成纤维细胞的模型, 并利用血小板衍生生长因子β作为生物因子, 促进其增殖, 初步了解了血小板衍生生长因子对牙周膜中成纤维细胞的增殖的影响。

课题评估的“金标准”: MTT法是国内检验细胞增殖的常见方法, 本文以MTT法对实验及对照两组进行增殖的检验, 其结果可信度显著提高。

设计或课题的倚倚与不足: 本实验仅测定了一种生长因子与牙周膜细胞的关系, 但在牙周膜的重建过程中, 生长因子并非独立作用于牙周膜细胞, 而是多个生长因子间互相协调、互成体系, 共同完成牙周膜的重建, 所以, 应该测定多种细胞生长因子与牙周膜细胞增殖的关系及影响。

提供临床借鉴的价值: 为临床牙周病患者的生物因子治疗提供理论依据和实验基础, 并可以指导临床用药, 对牙周病的治疗提出了新的思路。

医学英语单词例句: 本刊英文部

occupy

vt. 占用, 占领, 从事, 使忙碌, 专心

英英解释:

- ① be present in; be inside of
同义词: inhabit
- ② keep busy with
同义词: busy
- ③ live (in a certain place)
同义词: reside, lodge in
- ④ occupy the whole of

同义词: fill

⑤ be on the mind of

同义词: concern, interest, worry

⑥ require (time or space)

同义词: take, use up

⑦ march aggressively into another's territory by military force for the purposes of conquest and occupation

同义词: invade

⑧ engage or engross wholly

同义词: absorb, engross, engage

本刊例句:

Three distinct types of cells were observed among the cultured cells of sinoatrial nodes: spindle, spider and polygon. The spindle cells **occupied** the greatest proportion of the cultured cells.