

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.42.002 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

李洪涛¹, 段建民¹, 匡威¹, 菊地宽高², 片山直² 人洗涤血小板促进成骨细胞增殖与前列腺素E2的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7797-7803

人洗涤血小板促进成骨细胞增殖与前列腺素E2的作用*★○

李洪涛¹, 段建民¹, 匡威¹, 菊地宽高²○, 片山直²○

文章亮点: 实验结果提示, 在临床上使用富血小板血浆时要注意调整血小板的浓度, 富血小板血浆中血小板浓度过高不但不会提高治疗效果, 反而还有可能起到相反的作用。

关键词: 富血小板血浆; 洗涤血小板; 小鼠; 成骨细胞; 增殖; 前列腺素 E2; 组织工程

摘要

背景: 对于富血小板血浆促进组织再生的理想血小板浓度、哪些成分担当重要作用以及通过何种机制发挥作用等基础问题目前还不是很清楚。

目的: 观察洗涤血小板对小鼠成骨细胞株——MC3T3-E1 的增殖及其产生前列腺素 E2 作用的相关性。

方法: 将从健康成人男性志愿者身上采集并制备的洗涤血小板经反复液氮冻溶后作用于小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1, 分别加入体积分数 5%–15%的洗涤血小板、富血小板血浆、乏血小板血浆或其他样品(消炎痛、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 β 抑制剂 SB431542)培养。采用细胞和前列腺素 E2 测定试剂盒测定细胞增殖与前列腺素 E2 的生成量, 采用 RT-PCR 测定环氧酶 2 mRNA 的表达。

结果与结论: 体积分数 5%洗涤血小板作用于 MC3T3-E1 细胞 1 h 后开始表达环氧酶 2 mRNA、并诱导产生前列腺素 E2, 作用 3 h 时环氧酶 2 mRNA 的表达达到峰值, 而前列腺素 E2 的产生量在作用后 6 h 达到峰值(40.5 $\mu\text{g/L}$)。随着体积分数的升高, 洗涤血小板对 MC3T3-E1 细胞增殖的促进作用逐渐降低, 并且当其体积分数达到 15%时呈现对 MC3T3-E1 细胞增殖的显著抑制作用, 而洗涤血小板对 MC3T3-E1 细胞产生前列腺素 E2 的作用随着其浓度的倍比增加而显著增强。添加消炎痛会明显抑制 5%洗涤血小板对 MC3T3-E1 细胞增殖及前列腺素 E2 产生的促进作用, 而添加肿瘤坏死因子 α (100 $\mu\text{g/L}$)则会明显增大洗涤血小板对 MC3T3-E1 细胞产生前列腺素 E2 的促进作用。另外, SB431542(15 $\mu\text{mol/L}$)可明显抑制体积分数 5%的洗涤血小板对 MC3T3-E1 细胞增殖及前列腺素 E2 产生的促进作用。提示洗涤血小板促进 MC3T3-E1 增殖与其诱导该细胞生成前列腺素 E2 有密切的相关性。

¹解放军广州军区广州总医院口腔科, 广东省广州市 510010; ²日本明海大学齿学部机能保存修复学讲座, 日本

李洪涛★, 男, 1976 年生, 河南省洛阳市人, 汉族, 2011 年南方医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔颌面外科的基础与临床研究。
13924049866@139.com

通讯作者: 段建民, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 解放军广州军区广州总医院口腔科, 广东省广州市 510010

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344 (2012)42-7797-07

收稿日期: 2012-01-24
修回日期: 2012-02-16
(20111024005/W · W)

Human washed platelets promote the proliferation of osteoblasts and prostaglandin E2 production

Li Hong-tao¹, Duan Jian-min¹, Kuang Wei¹, Kikuchi Hirotaka², Katayama Tadashi²

Abstract

BACKGROUND: Platelet rich plasma can reactivate the bone tissue, while some basic problems are still unknown such as the ideal platelet concentration, the important elements and relevant mechanisms.

OBJECTIVE: To investigate the correlation of washed platelet between mouse osteoblast MC3T3-E1 cell proliferation and prostaglandin E2 production.

METHODS: Washed platelet was obtained from young healthy male volunteer and acted on MC3T3-E1 after repeatedly extracted from liquid nitrogen frozen. Cell quantification kit and prostaglandin E2 assay kit were applied to detect cell proliferation and PGE2 production. Reverse transcription-PCR was used to detect the cyclooxygenase-2 mRNA expression.

RESULTS AND CONCLUSION: After 5% washed platelet acted on MC3T3-E1 cells for 1 hour, cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production were promoted. Cyclooxygenase-2 mRNA expression reached a peak value at 3 hours; while prostaglandin E2 production reached a peak value at 6 hours (40.5 $\mu\text{g/L}$). The promotive effect of washed platelet on the proliferation of MC3T3-E1 cells was decreased with the concentration increased. Washed platelet at 15% inhibited the MC3T3-E1 cell proliferation. However, prostaglandin E2 production of MC3T3-E1 cells was promoted with the washed platelet concentration increased. Indomethacin significantly inhibited the effect of 50 $\mu\text{mol/L}$ washed platelet on MC3T3-E1 cell proliferation and prostaglandin E2 production. However, tumor necrosis factor- α (100 $\mu\text{g/L}$) could significantly promote the effect of washed platelet on prostaglandin E2 production of MC3T3-E1 cells. Moreover, SB431542 (15 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the promotive effect of 5% washed platelet on MC3T3-E1 cell proliferation and prostaglandin E2 production. These results suggest that washed platelet promoting MC3T3-E1 proliferation is closely related to prostaglandin E2 production

¹Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China;
²School of Dentistry, Meikai University, Saitama 350-0283, Japan

Li Hong-tao★, Master, Attending physician, Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China 13924049866@139.com

Corresponding author: Duan Jian-min, Doctor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Area Command of Chinese PLA, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Supported by: Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2011B031800201*

Received: 2012-01-24
Accepted: 2012-02-16

Li HT, Duan JM, Kikuchi H, Katayama T. Human washed platelets promote the proliferation of osteoblasts and prostaglandin E2 production. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(42): 7797-7803.

0 引言

血小板 α 颗粒中含有血小板来源生长因子、转化生长因子和血小板来源表皮生长因子等可以促进创伤愈合的多种生长因子^[1], 近些年将富血小板血浆用于骨及牙周组织再生的报告日益增多^[2-5], 但是, 目前有关富血小板血浆促进组织再生的基础研究尚滞后于其临床应用研究^[1,6], 特别是对于富血小板血浆促进组织再生的理想血小板浓度、哪些成分担当重要作用以及通过何种机制发挥作用等基础问题目前还不是很清楚^[7-10]。

另一方面, 在创伤或炎症状态, 前列腺素E2通过增加血管的通透性可以促进炎症细胞向创伤部位的游走, 进而直接或间接地参与了组织的愈合过程^[11-12], 另外, 前列腺素E2在骨组织的重建过程中还具有促进骨细胞分化、骨形成和诱导破骨细胞分化、骨吸收等双向调节作用^[13-17]。因此, 本实验通过观察洗涤血小板对小鼠成骨细胞株MC3T3-E1的增殖及其产生前列腺素E2的作用, 藉以探讨富血小板血浆促进骨组织再生的作用机制。

1 材料和方法

设计: 完全随机设计细胞学实验。

时间和地点: 2010年5至10月在解放军广州军区广州总医院医学实验科完成。

材料:

试剂及仪器	来源
38 g/L 枸橼酸钠	Sigma, 美国
α -MEM 培养液	Gibco, 美国
CCK-8 细胞测定试剂盒	同仁化学研究所, 日本
前列腺素 E2 测定试剂盒	Cayman Chemical Company, 美国
总 RNA 提取试剂盒	Sigma, 美国
倒置显微镜	Olympus, 日本

实验方法:

细胞培养: 小鼠成骨细胞株MC3T3-E1由日本明海大学齿学部机能保存修复学讲座提供, 使用含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养液, 在

36 °C、体积分数5%CO₂和100%湿度的细胞培养箱内培养。细胞传代和接种使用0.2 g/L胰蛋白酶(含0.2 g/L EDTA)消化和收集细胞。

人富血小板血浆及洗涤血小板的制备: 根据以往报告的方法从健康成人男性志愿者身上采集静脉血10 mL(注射器中含38 g/L枸橼酸钠1 mL), 充分混匀后移至塑料离心管中, 在170×g、10 °C条件下离心20 min, 离心后的上层血清(含血小板)即为富血小板血浆^[5]。然后将去除上清的离心沉淀物在1 700×g、20 °C条件下离心20 min, 离心后的上清液即为乏血小板血浆。将上述收集的离心液(包括从志愿者身上采集的全血)在临床全血细胞分析仪上测定血小板的数量。取一半富血小板血浆按1:10加入含60 mmol/L EDTA和pH 7.4的磷酸缓冲液, 然后在1 700×g、20 °C条件下离心10 min, 去除上清后再次用上述液体洗涤和离心沉淀血小板1次, 最后用 α -MEM培养液调整离心沉淀后的血小板数量(浓度与富血小板血浆相同)作为洗涤血小板。富血小板血浆、洗涤血小板和乏血小板血浆采用在液氮中反复冻融的方法促进血小板中生长因子的释放和活性化。

增殖细胞数的定量测定: 采用细胞测定试剂盒, 并按说明书上的方法进行测定。首先, 将计数调整的 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ MC3T3-E1细胞按100 μL /孔接种于96孔培养板内, 培养24 h后更换新鲜的添加体积分数10%FBS的 α -MEM培养液, 1 h后再分别加入实验用样品培养4 d。到时在培养板内加入10 μL /孔的WST-8, 1 h后用分光光度仪在450 nm波长条件下测定实验样本的吸光度值。

前列腺素E2的测定: 使用前列腺素E2测定试剂盒, 并按照说明书上的步骤进行测定。首先, 将计数调整的 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ MC3T3-E1细胞按500 μL /孔接种于24孔培养板内, 培养48 h后更换新鲜的添加体积分数10%FBS的 α -MEM培养液, 然后, 再分别加入体积分数5%–15%的洗涤血小板、富血小板血浆、乏血小板血浆或其他样品(消炎痛、肿瘤坏死因子 α 和SB431542)培养。分别于加样后1, 3, 6, 12, 24 h收集培养的上清液, 并做100倍稀释, 然后测定样品中的前

列腺素E2。

细胞内环氧酶2 mRNA表达的测定: 环氧酶2 mRNA表达的测定是在实时RT-PCR分析系统上采用底物表达分析软件(PE Biosystems)进行分析处理的。首先, 将计数调整的 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ MC3T3-E1细胞3 mL接种于直径为5 cm的细胞培养皿内, 培养72 h(细胞长满培养皿的底部)后更换新鲜的添加体积分数10%FBS的 α -MEM培养液, 然后加入体积分数5%的洗涤血小板(未加入的作为0对照), 并分别于加样后1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h采用总RNA提取试剂盒收集培养细胞内的总RNA, 然后使用RNA转录试剂盒将RNA转录为c-DNA。最后, 在实时RT-PCR分析系统上以18S ribosomal RNA合成的底物做对照, 对环氧酶2 mRNA表达的底物进行分析和数据处理。

主要观察指标: ①相同体积分数洗涤血小板、富血小板血浆和乏血小板血浆培养的MC3T3-E1细胞产生前列腺素E2的质量浓度。②不同体积分数洗涤血小板培养的MC3T3-E1细胞增殖及产生前列腺素E2的浓度。③洗涤血小板添加消炎痛、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 β 抑制剂SB431542后培养的MC3T3-E1细胞产生前列腺素E2的浓度。

统计学分析: 上述每组实验重复3次, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 并采用SPSS 13.0软件进行student-t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 体积分数5%洗涤血小板对MC3T3-E1细胞环氧酶2 mRNA表达的作用 见图1。

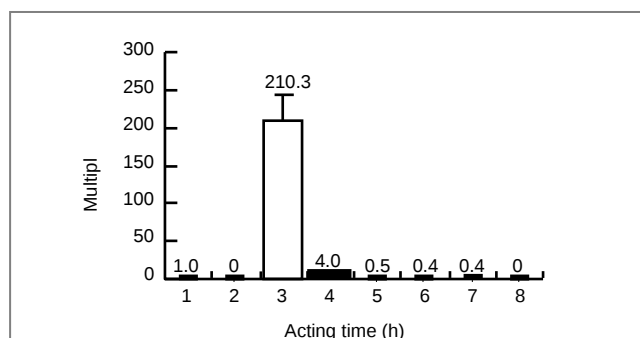


Figure 1 Effects of washed platelet on cyclooxygenase-2 gene expression in MC3T3 cells
图1 洗涤血小板对 MC3T3 细胞环氧酶 2 基因表达的作用

体积分数5%洗涤血小板作用MC3T3-E1细胞1 h后开始表达环氧酶2 mRNA, 并于3 h达到开始时的近210倍, 此后迅速减少。

2.2 体积分数5%洗涤血小板对MC3T3-E1细胞产生前列腺素E2的作用 体积分数5%洗涤血小板作用MC3T3-E1细胞后1 h开始诱导产生前列腺素E2, 此后随着时间的延长其前列腺素E2的产生量迅速增加, 并于6 h达到峰值(40.5 $\mu\text{g/L}$), 而6 h后的前列腺素E2产生量基本维持在该峰值水平, 见图2。

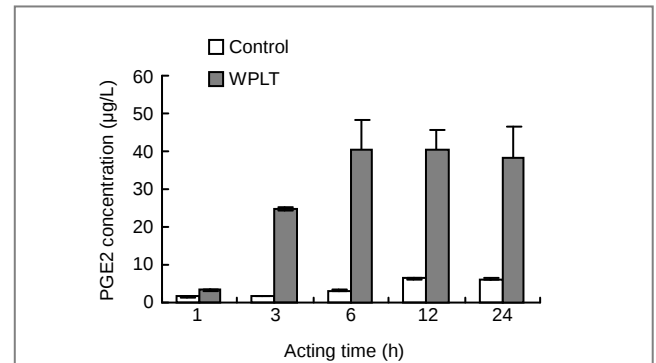


Figure 2 Effects of washed platelet (WPLT) on prostaglandin E2 (PGE2) production in MC3T3 cells
图2 洗涤血小板对 MC3T3 细胞产生前列腺素 E2 的作用

2.3 体积分数 5%的洗涤血小板、富血小板血浆和乏血小板血浆对 MC3T3-E1 细胞增殖及产生前列腺素 E2 的作用 体积分数 5%的洗涤血小板、富血小板血浆均明显促进了 MC3T3-E1 细胞的增殖及前列腺素 E2 的产生, 但洗涤血小板较富血小板血浆的作用更明显; 而乏血小板血浆明显抑制了 MC3T3-E1 细胞的增殖, 而且它对该细胞前列腺素 E2 的产生没有明显作用, 见图 3, 4。

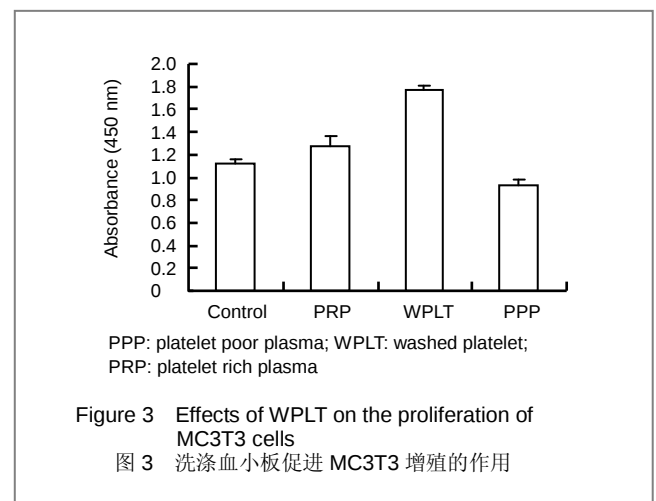


Figure 3 Effects of WPLT on the proliferation of MC3T3 cells
图3 洗涤血小板促进 MC3T3 增殖的作用

2.4 不同体积分数洗涤血小板对MC3T3-E1细胞增殖及产生前列腺素E2的作用 随着体积分数的升高, 洗涤血小板对MC3T3-E1细胞增殖的促进作用逐渐降低, 并且当其浓度达到体积分数15%时呈现对MC3T3-E1细胞增殖的显著抑制作用, 见图5, 而洗涤血小板对MC3T3-E1细胞产生前列腺素E2的作用随着其体积分

数的倍比增加而显著增强, 见图6。

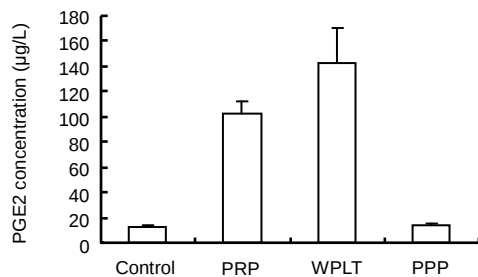


Figure 4 Effects of 5% platelet rich plasma (PRP), 5% washed platelet (WPLT) and 5% platelet poor plasma (PPP) on prostaglandin E2 (PGE2) production in MC3T3 cells

图 4 体积分数 5% 富血小板血浆、洗涤血小板及乏血小板浆对 MC3T3 细胞产生前列腺素 E2 的作用

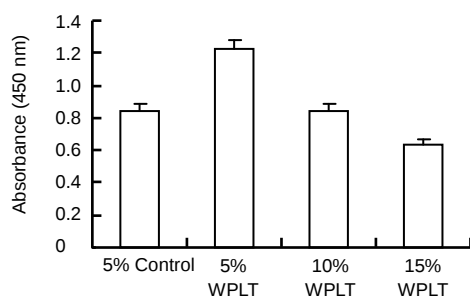


Figure 5 Effects of washed platelet (WPLT) on proliferation of MC3T3 cells with various concentrations

图 5 不同体积分数洗涤血小板对 MC3T3 细胞增殖的作用

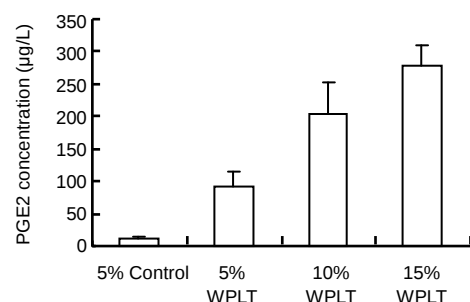


Figure 6 Effects of washed platelet (WPLT) on prostaglandin E2 (PEG2) production of MC3T3 cells with various concentrations

图 6 不同体积分数洗涤血小板对 MC3T3 细胞产生前列腺素 E2 的作用

2.5 消炎痛与肿瘤坏死因子 α 对体积分数5%的洗涤血小板促进MC3T3-E1细胞增殖及前列腺素E2产生作用的影响 添加消炎痛(2×10^{-5} mol/L)明显抑制了体积分数5%的洗涤血小板对MC3T3-E1细胞增殖及前列腺素

E2产生的促进作用, 见图7, 8, 而添加肿瘤坏死因子 α (100 μ g/L)则明显增大了洗涤血小板对MC3T3-E1细胞产生前列腺素E2的促进作用, 见图8。

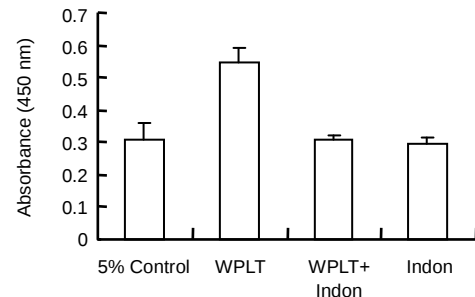


Figure 7 Effects of indomethacin (indon) on washed platelet (WPLT)-induced proliferation of MC3T3 cells

图 7 消炎痛对洗涤血小板促进 MC3T3 细胞增殖的影响

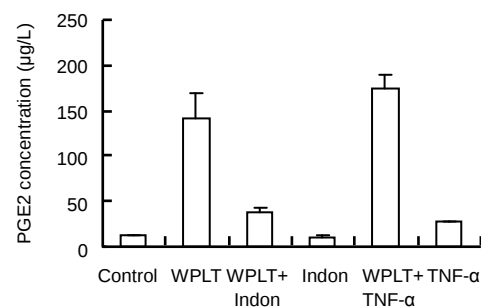


Figure 8 Effect of indomethacin (indon) and tumor necrosis factor α (TNF- α) on washed platelet (WPLT)-induced prostaglandin E2 (PGE2) production in MC3T3 cells

图 8 消炎痛与肿瘤坏死因子 α 对洗涤血小板促进 MC3T3 细胞前列腺素 E2 产生作用的影响

2.6 转化生长因子 β 抑制剂SB431542对体积分数5%的洗涤血小板促进MC3T3-E1细胞增殖及前列腺素E2产生的影响 见图9, 10。

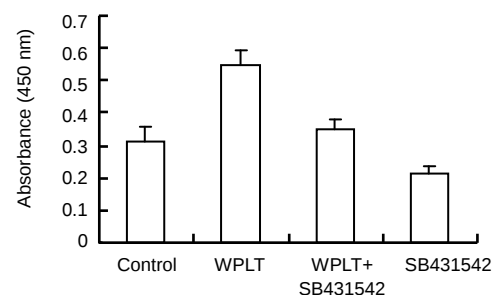


Figure 9 Effects of SB431542 on washed platelet (WPLT) promoted MC3T3 cells proliferation

图 9 SB431542 对洗涤血小板促进 MC3T3 细胞增殖的影响

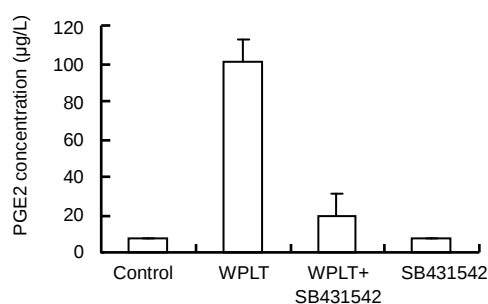


Figure 10 Effects of SB431542 on washed platelet (WPLT)-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) proliferation of MC3T3 cells
图 10 SB431542 对洗涤血小板促进 MC3T3 细胞前列腺素 E₂ 产生作用的影响

SB431542(15 µmol/L)明显抑制了体积分数5%的洗涤血小板对MC3T3-E1细胞增殖及前列腺素E₂产生的促进作用。

3 讨论

实验观察到体积分数5%洗涤血小板诱导了小鼠成骨细胞MC3T3-E1的前列腺素E₂合成调节基因——环氧化酶2 mRNA的表达以及前列腺素E₂的产生(图1, 2), 而洗涤血小板与富血小板血浆、乏血小板血浆促进前列腺素E₂的生成量与其促进MC3T3-E1增殖的效果成平行对应关系(图3, 4), 加之消炎痛(环氧化酶2 mRNA的抑制剂)在完全抑制了洗涤血小板诱导MC3T3-E1产生前列腺素E₂的同时, 也抑制了洗涤血小板促进的该细胞增殖(图7, 8), 所以, 上述结果表明洗涤血小板促进MC3T3-E1细胞增殖与其诱导该细胞环氧化酶2 mRNA的表达以及前列腺素E₂的产生有密切的相关性, 也就是说洗涤血小板有可能是通过诱导MC3T3-E1细胞产生的前列腺素E₂促进了该细胞的增殖。

自Markx等将富血小板血浆用于治疗颌面部创伤以来, 至今已有很多研究报告显示富血小板血浆在促进骨组织和牙周组织再生方面发挥着重要作用^[1-5], 但是, 目前也陆续有一些报告显示富血小板血浆的上述生物作用并不明显^[18-19]。此前, 作者发现富血小板血浆对人牙髓细胞增殖的促进作用较弱, 为了探明此原因, 作者将富血小板血浆细分为洗涤血小板和乏血小板血浆, 然后分别观察了富血小板血浆及其细化成分对牙髓细胞增殖的作用, 结果发现洗涤血小板明显促进了牙髓细胞的增殖, 而添加乏血小板血浆可以呈浓度依赖性地抑制洗

涤血小板的这种作用, 该结果提示血浆(乏血小板血浆)中可能存在对抗血小板中生长因子作用的物质^[20]。因此, 为了探明血小板来源的生长因子在骨组织再生中的作用机制, 本实验特别选择了洗涤血小板进行观察以排除血浆对实验结果的干扰。

前列腺素E₂是参与机体病理反应和修复过程的内源性调节因子, 其生成主要经过两个阶段, 首先是细胞膜上的磷脂在磷脂酶A₂的作用下生成花生四烯酸, 后者在环氧化酶2 mRNA调控下转化为前列腺素E₂^[14]。肿瘤坏死因子α、白细胞介素1等炎症性细胞因子可以通过诱导环氧化酶2 mRNA的表达来促进前列腺素E₂的生成^[13], 而血小板来源生长因子并不诱导COX-2 mRNA的表达, 但可以促进花生四烯酸的生成(为前列腺素E₂的合成提供原料), 不过在血小板来源生长因子作用前用白细胞介素1预处理1 h则可以倍比增加的生成量^[14]。

本实验结果显示洗涤血小板诱导前列腺素E₂生成的峰值时间(6 h)落后于环氧化酶2 mRNA表达的峰值时间(3 h)(图1, 2), 加上消炎痛(环氧化酶2 mRNA的抑制剂)基本完全抑制了洗涤血小板诱导的前列腺素E₂生成, 而添加肿瘤坏死因子α可以显著增加洗涤血小板诱导的前列腺素E₂生成量(图8), 该结果提示洗涤血小板主要是通过诱导的环氧化酶2 mRNA表达来调控前列腺素E₂生成的, 同时, 洗涤血小板也有可能促进了前列腺素E₂合成的前期物质——花生四烯酸的生成。作者分析出现上述结果可能与洗涤血小板中含有血小板来源生长因子、转化生长因子β和类胰岛素生长因子1等多种生长因子有关, 其中, 有些生长因子诱导环氧化酶2 mRNA的表达, 而如血小板来源生长因子等生长因子则促进了花生四烯酸的生成。

前列腺素E₂在机体所发挥的作用主要取决于其局部所产生的量^[21], 适量前列腺素E₂的有利于机体局部的创伤愈合组织再生, 而过量的前列腺素E₂则会造成对组织的伤害^[11, 13, 15, 22-23], 作者以往的实验结果显示10~100 µg/L的前列腺素E₂会促进人牙髓细胞增殖, 而超过这个质量浓度则会抑制细胞的增殖^[24]。本实验发现洗涤血小板促进MC3T3-E1细胞增殖具有浓度特异性, 即体积分数5%的洗涤血小板可以促进细胞增殖, 而超出这个浓度不但不会促进细胞增殖, 反而会抑制细胞的增殖(图5), 加上洗涤血小板诱导前列腺素E₂生成的量会随着其浓度的倍比升高而呈现出明显的增多趋势(由91.14 µg/L显著增加到200 µg/L以上, 图6), 从而提示洗涤血小板促进MC3T3-E1细胞增殖的浓度特异性可能与其诱导产生的前列腺素E₂量有关, 即适当浓度的洗

洗涤血小板诱导生成的适量前列腺素E2会促进牙髓细胞的增殖, 而高浓度的洗涤血小板诱导生成的过量前列腺素E2会抑制牙髓细胞的增殖。目前, 已有一些学者发现富血小板血浆在促进细胞增殖方面也具有浓度特异性, 即富血小板血浆中血小板的浓度过高不但没有促进反而是明显抑制了细胞的增殖^[25-26], 如果出现上述结果的原因与本实验结果所提示的原因相符的话, 那么, 就提醒临床上使用富血小板血浆应该控制血小板的浓度, 富血小板血浆中血小板的浓度过高不但不会提高治疗的效果, 反而还有可能起到相反的作用, 进而造成血小板的浪费。

转化生长因子 β 是血小板中含量最多的生长因子之一, 该因子对很多细胞具有双向调节作用, 即适量的转化生长因子 β 可以促进成骨细胞分化及硬组织的形成, 而过量的转化生长因子 β 可以抑制成骨细胞增殖, 并促进破骨细胞的生成^[27]。作者以往的研究发现转化生长因子 β 在洗涤血小板呈特异性地促进人牙髓细胞增殖方面发挥着重要作用, 即洗涤血小板主要是通过转化生长因子 β 诱导生成的前列腺素E2来促进牙髓细胞的增殖^[24]。本实验也发现SB431542(转化生长因子 β 抑制剂^[28]) 在抑制了洗涤血小板促进的MC3T3-E1细胞增殖外(见图9), 也抑制了洗涤血小板诱导的前列腺素E2生成(见图10), 从而提示转化生长因子 β 可能在洗涤血小板促进MC3T3-E1细胞增殖和前列腺素E2生成方面发挥着重要作用, 但是, 作者进一步的实验结果显示: 人转化生长因子 β 和基因重组转化生长因子 β 并未促进MC3T3-E1细胞增殖和诱导前列腺素E2的生成(结果未在本文显示), 所以, 推测洗涤血小板中可能存在另外一种同样可以被SB431542所拮抗的生长因子, 洗涤血小板可能是通过该种因子呈浓度特异性地促进了MC3T3-E1细胞增殖和前列腺素E2生成。

综上所述, 本实验结果表明洗涤血小板促进MC3T3-E1增殖与其诱导该细胞生成前列腺素E2有密切的相关性, 洗涤血小板促进MC3T3-E1增殖具有浓度特异性的原因可能与它细胞产生的前列腺素E2量有关, 即低浓度体积分数5%洗涤血小板诱导产生的适量前列腺素E2促进了MC3T3-E1细胞的增殖, 而高浓度洗涤血小板诱导产生的过量前列腺素E2则抑制了MC3T3-E1细胞的增殖。因此, 提示在临床上使用富血小板血浆进行治疗时要注意适当调整血小板的浓度, 富血小板血浆中血小板浓度过高不但不会提高治疗效果, 反而还有可能起到相反的作用。

4 参考文献

- [1] Ivan SB, Vinicius B, Carolina LR, et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion*, 2009;49(12):2680-2685.
- [2] Sammartino G, Tia M, Marenzi G, et al. Use of autologous platelet-rich plasma(PPP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63(6):766-770.
- [3] Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2004;75(12):1668-1677.
- [4] Lee CY, Rohrer MD, Prasad HS, et al. Sinus grafting with a natural fluorohydroxyapatite for immediate load: a study with histologic analysis and histomorphometry. *J Oral Implantol*. 2009;35(4):164-175.
- [5] Sammartino G, Tia M, Gentile E, et al. Platelet-rich plasma and resorbable membrane for prevention of periodontal defects after deeply impacted lower third molar extraction. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(11):2369-2373.
- [6] Cenni E, Ciapetti G, Pagani S, et al. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontol*. 2005;76(5):323-328.
- [7] Graziani F, Cei S, Ducci F, et al. In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results. *Minerva Stomatol*. 2005;54(1):15-22.
- [8] 須田 友代, 菊地 寛高, 高山 直士. マウスマクロファージ活性化に対する多血小板血漿および洗浄血小板の効果; 日本歯科保存学雑誌, 2005, 18(2):152-157.
- [9] 高山 直士, 田島 雅道, 菊地 寛高. 培養骨芽細胞の増殖に対する血漿の阻害的作用について; 日本口腔外科学会雑誌, 2005, 51(2):67-76.
- [10] Kawase T, Okuda K, Saito Y, et al. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor; *J Periodontol*. 2005;76(5): 760-767.
- [11] Kido J, Ishida H, Nagata T, et al. Effects of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and prostaglandin E2 on alkaline phosphatase activity in cultured dental pulp and gingival cells of bovine calf. *J Endodon*. 1991;17:161-164.
- [12] Seibert K, Zhang Y, Leahy K, et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91: 12013-12017.
- [13] Chang MC, Lin CP, Huang TF, et al. Thrombin-induced DNA synthesis of cultured human dental pulp cells is dependent on its proteolytic activity and modulated by prostaglandin E2. *J Endodon*. 1998;24(6): 709-713.
- [14] Ohnishi T, Suwa M, Oyama T, et al. Prostaglandin E2 predominantly induces production of hepatocyte growth factor/scatter factor in human dental pulp in acute inflammation. *J Dent Res*. 2000;79:748-755.

- [15] Lin SK, Kuo MY, Wang JS, et al. Differential regulation of interleukin-6 and inducible cyclooxygenase Gene expression by cytokines through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms in human dental pulp fibroblasts. *J Endodon.* 2002;28(3):197-201.
- [16] Nakao S, Ogata Y, Yamamoto Y, et al. Platelet-derived growth factor-induced arachidonic acid release for enhancement of prostaglandin E2 synthesis in human gingival fibroblasts pretreated with interleukin-1 β . *Journal of Cellular Biochemistry.* 2004;92(3):579-590.
- [17] Park YG, Kang SK, Kim WJ, et al. Effects of TGF- α , IL- β and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor of cyclooxygenase expression, prostaglandin E2 production and bone resorption in mouse calvarial bone cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:2270-2280.
- [18] Andres R, Phillip J, Steven E, et al. Influence of Platelet-rich Plasma Added to Xenogeneic Bone Grafts in Periimplant Defects: A Vital Fluorescence Study in Dogs. *Clinical Implant Dentistry and Related research.* 2005;7(2):61-69.
- [19] Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, et al. Platelet-rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation An experimental study in dogs. *J Orthopaedic Res.* 2004;22:653-658.
- [20] Duan JM, Kikuchi H, Wang WJ, et al. Yati Yasui Yazhoubingxue Zazhi. 2006;16(4):188-191
段建民, 菊地宽高, 汪维健, 等. 血小板血浆对人牙髓细胞增殖的影响[J]. 牙体牙髓牙周病杂志, 2006, 16(4):188-191.
- [21] Gijon MA, Leslie CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol.* 1999;65:330-336.
- [22] Hui AY, Dannenberg AJ, Sung JJ, et al. Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1 in hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2004; 41:251-258.
- [23] Lertchirakarn V, Birner R, Messer HH. Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J Endod.* 1998;24:409-413.
- [24] Duan JM, Kikuchi H, Suda T, et al. T. Effects of Platelet-rich plasma and Washed platelets on Prostaglandin E2 production by Human dental pulp cells. *The Japanese Journal of Conservative Dentistry.* 2006;49(3):426-434.
- [25] Graziani F, Cei S, Ducci F, et al. In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results. *Minerva Stomatol.* 2005;54(1-2):15
- [26] Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: An in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(4):420.
- [27] 新井嘉則, 宇田川信, 奥村茂樹, 等. 硬組織研究ハンドブック. 仙台: 出版社. 2005.
- [28] Sunil K, Halder R, Daniel B, et al. A Specific Inhibitor of TGF- Receptor Kinase, SB-431542, as a Potent Antitumor Agent for Human cancers. *Neoplasia.* 2005;7(5):509-521.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 广东省科技计划项目 (2011B031800201); 课题名称: 改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞与乳牙髓干细胞体外扩增及成骨分化作用的对比实验研究。

作者贡献: 实验设计为第一、四、五作者, 实施者为第一、二作者, 评估者为第二、三作者。

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。

伦理要求: 本研究所使用的静脉血采集自健康志愿者, 该志愿者完全知情同意将自己的血样用于本研究。小鼠成骨细胞株——MC3T3-E1 由日本明海大学齿学部机能保存修复学讲座提供, 实验细胞的使用得到了明海大学伦理委员会的认可。

文章概要:

文章要点: 本实验研究将富血小板血浆中的成分细分后用于细胞培养, 发现洗涤血小板 促进 MC3T3-E1 增殖与其诱导该细胞生成前列腺素 E2 有密切的相关性, 洗涤血小板促进 MC3T3-E1 增殖具有浓度特异性的原因可能与它细胞产生的前列腺素 E2 量有关。

关键信息: 结果提示在临床上使用血小板血浆时要注意调整血小板的浓度, 血小板血浆中血小板浓度过高不但不会提高治疗效果, 反而还有可能起到相反的作用。

研究的创新之处与不足: 实验创新性地选择了洗涤血小板进行观察以排除血浆对实验结果的干扰, 以探讨血小板来源的复合生长因子在骨组织再生中的作用机制。不足之处在于实验采用的静脉血与实验细胞并非同源, 另外体外实验与体内环境存在一定的差异。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。