

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.49.007

[http://www.crter.org]

李斯翰^{1,2}, 段建民², 李洪涛², 文军² (1南方医科大学研究生学院, 广东省广州市 510000; 2解放军广州军区广州总医院口腔科, 广东省广州市 510000)

改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞增殖与免疫原性的作用**

李斯翰^{1,2}, 段建民², 李洪涛², 文军² (1南方医科大学研究生学院, 广东省广州市 510000; 2解放军广州军区广州总医院口腔科, 广东省广州市 510000)

文章亮点:

1 实验特点在于采用液氮反复冻融的方法激活血浆中血小板颗粒裂解释放生长因子, 相比较加入外源性物质(氯化钙、人或牛凝血酶)的激活方式, 可以减少外源性物质所带来的潜在感染风险。

2 从组织工程的安全性考虑, 采用自体来源生长因子对间充质干细胞进行体外培养可以最大限度减少外源性血清的使用, 为体外培养细胞提供了更为安全且接近机体的培养环境。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 富血小板血浆; 骨髓血; 增殖; 免疫原性; 生长因子; 细胞移植; 省级基金; 干细胞图片文章

主题词:

间质干细胞; 骨髓; 富血小板血浆; 细胞移植

基金资助:

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

摘要

背景: 课题组前期实验发现改良富血小板血浆对人牙髓细胞增殖的促进作用具有浓度依赖性, 以 10%浓度尤为明显。

目的: 观察不同浓度改良富血小板血浆对人骨髓间充质干细胞体外生长增殖的作用效果, 以及最佳浓度改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞免疫原性的影响。

方法: 使用健康志愿者捐献骨髓血培养的第三四代人骨髓间充质干细胞, 行流式细胞术及成脂、矿化诱导分化鉴定。将由同一志愿者采集的静脉血制备的改良富血小板血浆作用于人骨髓间充质干细胞, 以 CCK-8 法测定细胞增殖变化, 绘制生长曲线。选取最适合人骨髓间充质干细胞增殖的改良富血小板血浆浓度, 以体积分数 10%FBS 培养基为对照, 通过流式细胞术测定连续培养 3 代的人骨髓间充质干细胞表面 Stro-1 的表达率。

结果与结论: 5%-10%的改良富血小板血浆在培养第 6, 8 天均显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖, 其中以 10%浓度组尤为显著在培养第 10 天仍显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖且细胞表面 Stro-1 的表达率连续 3 代均高于对照组。说明改良富血小板血浆对人骨髓间充质干细胞增殖的促进作用具有浓度依赖性, 10%改良富血小板血浆可以较好地保持人骨髓间充质干细胞的免疫原性。

Improved platelet-rich plasma effects on the proliferation and immunogenicity of human bone marrow mesenchymal stem cells

Li Si-han^{1,2}, Duan Jian-min², Li Hong-tao², Wen Jun² (1Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; 2Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous experiments have shown that improved platelet-rich plasma can promote the proliferation of human dental pulp cells in a concentration-dependent manner, particularly when the concentration is 10%.

OBJECTIVE: To investigate the effect of platelet-rich plasma at different concentrations on the proliferation and immunogenicity of human bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Human bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors were cultured and passaged for 3-4 passages, identified by flow cytometry and differentiation inductions. Platelet-rich plasma samples which were manufactured from the venous blood of the same donor were used for culturing human bone marrow mesenchymal stem cells. The proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells was measured by cell counting kit-8 method and the growth curves were drawn. The most suitable concentration of platelet-rich plasma was selected to culture human bone marrow mesenchymal stem cells for three generations and the Stro-1 expression rate on the surface of human bone marrow mesenchymal stem cells was determined through flow cytometry.

RESULTS AND CONCLUSION: Platelet-rich plasma at the concentration of 5%-10% evidently promoted the

李斯翰★, 女, 1987年生, 广东省汕头市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事牙体牙髓专业研究。
516044406@qq.com

通讯作者: 段建民, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 解放军广州军区广州总医院口腔科, 广东省广州市 510000
duanjianmin3@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)49-08505-07

修回日期: 2013-09-25
(201305023/D - W)

Li Si-han★, Studying for master's degree, Graduate School, Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
516044406@qq.com

Corresponding author: Duan Jian-min, M.D., Chief physician, Master's supervisor, Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
duanjianmin3@126.com

Accepted: 2013-09-25

proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on the 6th and 8th days. The most effective concentration to promote the proliferation was 10%. Platelet-rich plasma at the concentration of 10% still promoted the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on the 10th day, and maintained a better immunogenicity of human bone marrow mesenchymal stem cells compared to the control group. These findings indicate that platelet-rich plasma can promote the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a concentration-dependent manner, and 10% platelet-rich plasma is better to maintain the immunogenicity of human bone marrow mesenchymal stem cells.

Subject headings: mesenchymal stem cells; bone marrow; platelet-rich plasma; cell transplantation

Funding: the Science and Technology Plan Project of Guangdong Province, No. 2011B031800201*

Li SH, Duan JM, Li HT, Wen J. Improved platelet-rich plasma effects on the proliferation and immunogenicity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(49):8505-8511.

0 引言 Introduction

因人体血小板中含有大量的生长因子,故富血小板血浆已被广泛应用于软、硬组织再生的基础研究领域,以及创伤修复、牙周组织再生和牙种植体骨愈合等临床治疗领域^[1-2]。前期实验研究观察了液氮反复冻融激活的富血小板血浆(简称改良富血小板血浆)对体外培养的人牙髓细胞具有促进增殖和矿化的作用,且其促进作用具有浓度依赖性^[3]。

实验进一步观察改良富血小板血浆对人骨髓间充质干细胞生长增殖的作用效果,明确改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞的作用是否仍具有浓度依赖性以及细胞特异性。并选取最佳的富血小板血浆浓度连续培养骨髓间充质干细胞,通过检测细胞表面Stro-1表达,初步探讨改良富血小板血浆培养对细胞免疫原性的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 完全随机设计的细胞学实验。

时间及地点: 实验于2012年9月至2013年2月在解放军广州军区广州总医院医学实验科完成。

材料:

骨髓血来源: 男性志愿者,27岁,平素身体健康,无全身系统性疾病,无家族遗传病史,血常规检查正常。志愿者对实验知情同意,实验符合医学伦理学标准。

改良富血小板血浆对细胞免疫原性影响实验用主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
α-MEN 培养液	Gibco, 美国
CCK-8	同仁, 日本
Stro-1 抗体	R&D system, 美国
CO ₂ 孵箱、低温离心机	Heraeus, 德国
全血细胞分析仪	深圳迈瑞
酶标仪	Biocell, 美国
倒置显微镜	Olympus, 日本

实验方法:

改良富血小板血浆的制备: 按本科曾报道的方法从提供骨髓的志愿者肘静脉采集静脉血制备富血小板血浆^[4]。全血细胞分析仪进行血小板计数后,按终浓度 2 U/mL 加入肝素钠抗凝。将富血小板血浆分装入冻存管内,液氮反复冻融 3 次,将激活后的富血小板血浆 3 500×g 离心 25 min,然后吸取上清液过滤用于实验。

人骨髓间充质干细胞的培养: 无菌条件下抽取健康志愿者骨髓血 5 mL(预先于注射器中加入肝素并调整终浓度至 3 000 U/mL),密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞,于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 孵箱孵育 48 h 后换液,待细胞汇合至瓶底 80%时传代,连续 3 代传代纯化培养^[5]。将培养的第三、四代细胞用于实验。

人骨髓间充质干细胞的鉴定: 以 1×10⁵/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,待细胞进入对数生长期后弃原培养液,PBS 洗 3 遍,分别换为成脂诱导液(含体积分数 10% 胎牛血清,10⁻⁸ mol/L 地塞米松,10⁻⁴ mol/L 吲哚美辛,10 mg/L 胰岛素,50 mmol/L IBMX 的 α-MEN)和成骨诱导液(含体积分数 10% 胎牛血清,10⁻⁸ mol/L 地塞米松,10 mmol/L β-甘油磷酸钠,50 μg/L L-抗坏血酸的 α-MEN)^[6],无矿化、成脂诱导成分的含体积分数为 10% 胎牛血清的 α-MEN 作为空白对照,每 3 d 换液 1 次,于诱导第 14, 21 天分别进行油红 O 染色和茜素红染色^[7-8]。

将浓度为 10⁹ L⁻¹ 的人骨髓间充质干细胞悬液 1 mL 送至广州军区总医院血液科细胞中心行流式细胞术检测细胞表面抗原 CD44、CD105、CD34^[9]。

CCK-8 法测定人骨髓间充质干细胞生长曲线: 取生长良好的人骨髓间充质干细胞,消化、计数,稀释成浓度为 1×10⁷ L⁻¹ 的细胞悬液,按 100 μL/孔接种至 96 孔板。细胞培养箱内培养 24 h 后吸弃培养液,PBS 洗 3 遍后分别加入含 2%,5%,10%,20%富血小板血浆的 α-MEN 培养液,含体积分数 10% 胎牛血清的 α-MEN 培养液作为对照,每组 28 孔,隔日换液。隔天每组取 4 孔,CCK-8 法测定孵育 2 h 后于 450 nm 波长处 A 值^[10]。连续 10 d 以时间为横轴,A 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

流式细胞术测定人骨髓间充质干细胞表面 Stro-1 表达率: 取第 3 代人骨髓间充质干细胞,接种于 75 mm² 培养瓶

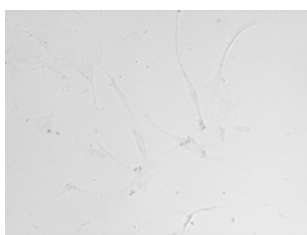
中, 分别加入含 10% 富血小板血浆的 α -MEN 培养液, 含体积分数 10% 胎牛血清的 α -MEN 培养液作为对照, 每 3 d 换液 1 次, 细胞融合至 80% 时消化, 计数, 传代, 分别取 2×10^5 个细胞, PBS 洗涤并重悬, 加入 Stro-1 抗体, 4°C 避光标记 30 min, PBS 洗涤 2 次后重悬, 加入 FITC 标记二抗, 4°C 避光标记 30 min, PBS 洗涤两次, 加入 40 g/L 多聚甲醛重悬, 以至少 5 000 个细胞用于流式细胞仪检测。

统计学分析: 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同时段细胞增殖活性 (CCK-8 A 值) 经 Levene 检验方差齐性 (6, 8 d), 采用 Welch 法行方差分析, 组间比较采用 Dunnett's T3 法, 方差齐性 (10 d) 采用 One-Way ANOVA, 组间比较采用 Bonferroni 法; Stro-1 表达率采用四格表资料卡方检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 改良富血小板血浆血小板计数 全血中血小板浓度为 $187 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 改良富血小板血浆血小板浓度为 $1\,001 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 为全血浓度的 5.35 倍。

2.2 人骨髓间充质干细胞生长和纯化情况 人骨髓间充质干细胞培养 48 h 后可见少量细胞贴壁, 细胞呈梭形, 培养 10 d 后细胞增生为成纤维样细胞, 有少许不规则突触, 呈团簇状生长。约 2 周后细胞达到 80% 左右融合, 连续培养至第 3 代时细胞形态较均一, 呈长梭形, 胞核居中, 见图 1。



注: 细胞形态较均一, 呈长梭形, 胞核居中。

图 1 男性健康志愿者 P3 代骨髓间充质干细胞形态 ($\times 100$)

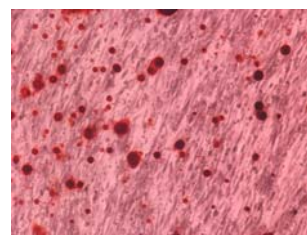
Figure 1 Morphology of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells from healthy male donors ($\times 100$)

2.3 人骨髓间充质干细胞鉴定结果

成骨诱导和染色: 换成骨诱导液 1 周后可见局部细胞密度明显增高, 2 周后镜下可见圆形、椭圆形反光物质, 并逐渐增大。3 周后茜素红染色可见红色矿化结节, 见图 2。

流式细胞术鉴定: 人骨髓间充质干细胞 CD44⁺ 表达率为 97.68%, CD105⁺ 表达率为 97.07%, 而 CD34 表达为

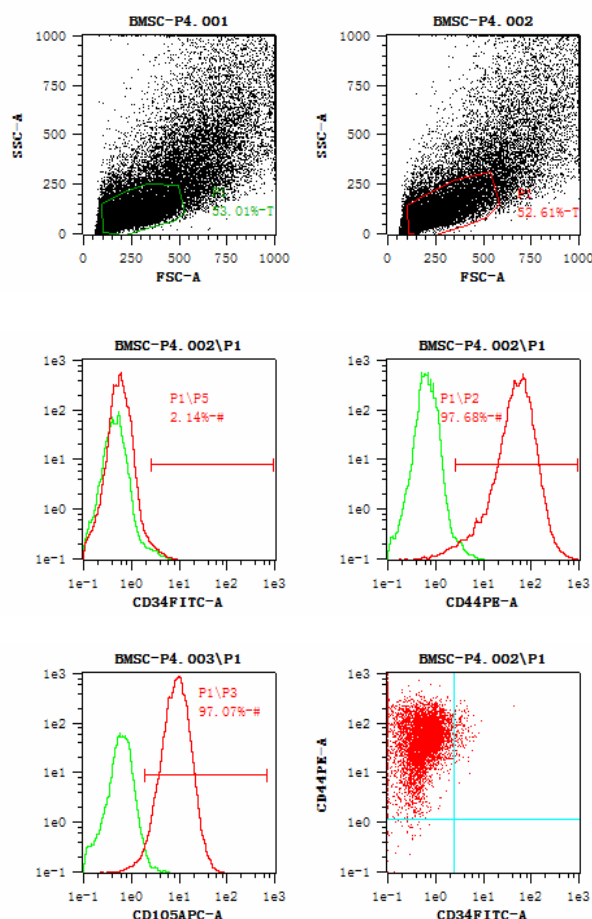
阴性, 见图 3。



注: 可见红色矿化结节, 诱导成骨分化成功。

图 2 男性健康志愿者骨髓间充质干细胞成骨诱导 3 周后分化结果 (矿化结节茜素红染色, $\times 100$)

Figure 2 Osteogenesis differentiation results of bone marrow mesenchymal stem cells from healthy male donors after 3 wk induction (Alizarin red staining of mineralized nodules, $\times 100$)



注: CD44⁺ 表达率为 97.68%, CD105⁺ 表达率为 97.07%, 而 CD34 表达为阴性, 符合人骨髓间充质干细胞的表达。

图 3 男性健康志愿者骨髓间充质干细胞流式细胞鉴定

Figure 3 Identification of human bone marrow mesenchymal stem cells from healthy male donors by flow cytometry

成脂诱导和染色: 换成脂诱导液1周后可见细胞形态较之前饱满, 镜下可见胞浆内有串珠状圆形小泡。2周后油红染色可见胞浆内含有橙红色融合脂滴, 见图4。



注: 可见胞浆内含有橙红色融合脂滴, 诱导成脂分化成功。

图4 男性健康志愿者骨髓间充质干细胞成脂诱导分化2周后结果(油红O染色, $\times 100$)

Figure 4 Adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells from healthy male donors after 2 wk induction (Oil red O staining, $\times 100$)

2.4 改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞生长的影响 5%-10%的改良富血小板血浆在培养第6, 8天均显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖, 其中以10%浓度组尤为显著, 与其他浓度相比, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。10%的富血小板血浆在培养第10天仍显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖, 见表1, 图5-7。不同浓度改良富血小板血浆培养的骨髓间充质干细胞生长曲线见图8。

表1 不同浓度改良富血小板血浆培养的骨髓间充质干细胞在不同时间段细胞增殖活性

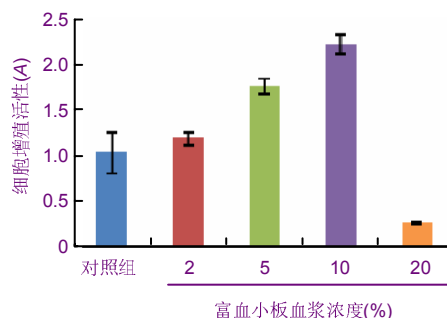
Table 1 Proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different concentrations of platelet-rich plasma at different time ($\bar{x} \pm s$, absorbance)

组别	第6天	第8天	第10天
对照组	1.041 $\pm$ 0.226 ^{cde}	1.748 $\pm$ 0.167 ^d	2.502 $\pm$ 0.260 ^{de}
2%富血小板血浆	1.191 $\pm$ 0.643 ^{cde}	1.483 $\pm$ 0.167 ^{cd}	2.052 $\pm$ 0.152 ^{cd}
5%富血小板血浆	1.177 $\pm$ 0.085 ^f	2.227 $\pm$ 0.015 ^{bd}	2.684 $\pm$ 0.157 ^{bd}
10%富血小板血浆	2.227 $\pm$ 0.103 ^f	2.911 $\pm$ 0.102 ^f	3.094 $\pm$ 0.113 ^{abe}
20%富血小板血浆	0.263 $\pm$ 0.009 ^f	1.395 $\pm$ 0.160 ^d	2.009 $\pm$ 0.254 ^{acd}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与2%富血小板血浆比较, ^b $P < 0.05$; 与5%富血小板血浆比较, ^c $P < 0.05$; 与10%富血小板血浆比较, ^d $P < 0.05$; 与20%富血小板血浆比较, ^e $P < 0.05$; 各组间比较, ^f $P < 0.05$ 。

注: 不同浓度富血小板血浆均可促进骨髓间充质干细胞增殖, 10%的富血小板血浆在培养第10天增殖效率最高。

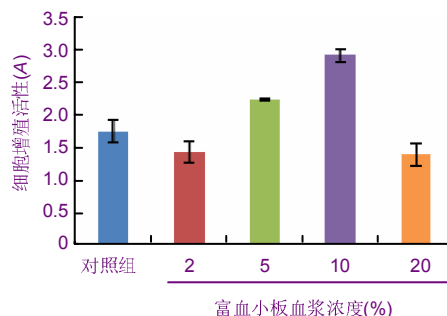
2.5 流式细胞术鉴定人骨髓间充质干细胞表面Stro-1表达 在含10%富血小板血浆的 α -MEN培养液连续3代培养后, 测定细胞表面Stro-1表达显著高于对照组($P=0.000$), 见表2-4, 图9。



注: 2%, 5%, 10%浓度富血小板血浆均可促进骨髓间充质干细胞增殖, 10%增殖率最高。

图5 不同浓度富血小板血浆培养骨髓间充质干细胞第6天细胞增殖活性

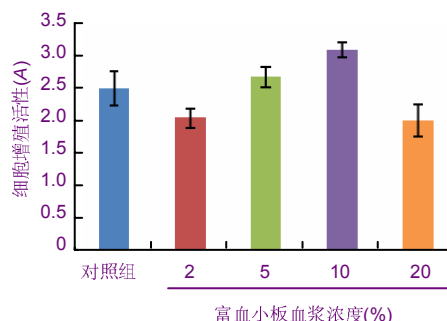
Figure 5 Proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different concentrations of platelet-rich plasma for 6 d



注: 5%, 10%浓度富血小板血浆均可促进骨髓间充质干细胞增殖, 10%增殖率最高。

图6 不同浓度富血小板血浆培养骨髓间充质干细胞第8天细胞增殖活性

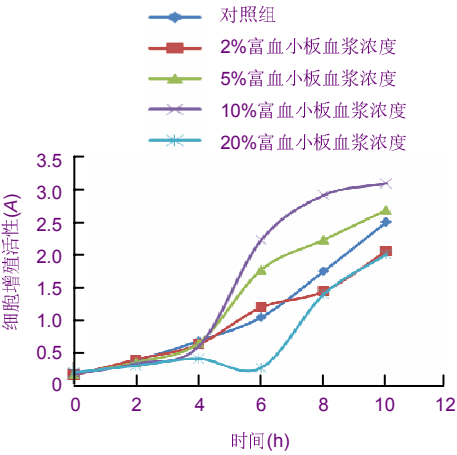
Figure 6 Proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different concentrations of platelet-rich plasma for 8 d



注: 10%浓度富血小板血浆可使骨髓间充质干细胞增殖达高峰。

图7 不同浓度富血小板血浆培养骨髓间充质干细胞第10天细胞增殖活性

Figure 7 Proliferative activity of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different concentrations of platelet-rich plasma for 10 d



注: 5%, 10%浓度富血小板血浆均可促进骨髓间充质干细胞不同增殖, 10%的富血小板血浆在培养第 10 天增殖效率最高。

图 8 不同组分培养基培养骨髓间充质干细胞生长曲线

Figure 8 Growth curves of bone marrow mesenchymal stem cells cultured in different concentrations of platelet rich plasma

表 2 不同组分培养基培养第 3 代(P3)骨髓间充质干细胞后细胞表面 Stro-1 表达率

Table 2 The Stro-1 expression rate on the surface of passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells after culturing in different concentrations of platelet-rich plasma

组别	阳性(n/%)	阴性(n/%)	检测细胞总数(个)
10%胎牛血清	385/25.9	1 099/74.1	1 484
10%富血小板血浆	616/44.4	772/55.6	1 388
总计	1 001/34.9	1 871/65.1	2 630

注: 10%富血小板血浆培养是我骨髓间充质干细胞表面 Stro-1 表达显著高于 10%胎牛血清对照培养。

表 3 不同组分培养基培养第 4 代(P4)骨髓间充质干细胞 后的细胞表面 Stro-1 表

Table 3 The Stro-1 expression rate on the surface of passage 4 bone marrow mesenchymal stem cells after culturing in different concentrations of platelet-rich plasma

组别	阳性(n/%)	阴性(n/%)	检测细胞总数(个)
10%胎牛血清	198/31.4	433/68.6	631
10%富血小板血浆	486/41.3	690/58.7	1 176
总计	684/37.9	1 123/62.1	1 807

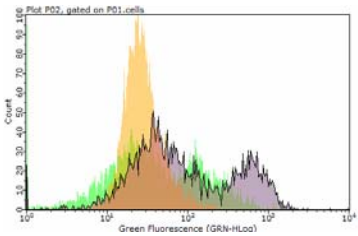
注: 10%富血小板血浆培养是我骨髓间充质干细胞表面 Stro-1 表达显著高于 10%胎牛血清对照培养。

表 4 不同组分培养基培养第 5 代(P5)骨髓间充质干细胞后的细胞表面 Stro-1 表达率

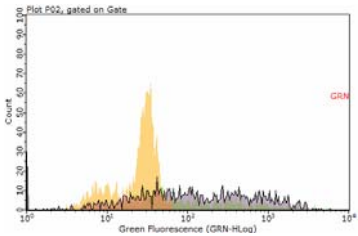
Table 4 The Stro-1 expression rate on the surface of passage 5 bone marrow mesenchymal stem cells after culturing in different concentrations of platelet-rich plasma

组别	阳性(n/%)	阴性(n/%)	检测细胞总数(个)
10%胎牛血清	413/43.7	533/56.3	946
10%富血小板血浆	907/53.9	777/46.1	1 684
总计	1 320/50.2	1310/49.8	2 630

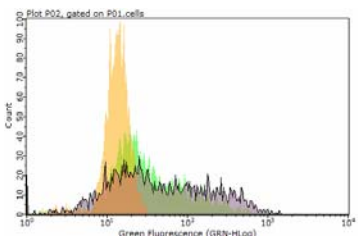
注: 10%富血小板血浆培养是我骨髓间充质干细胞表面 Stro-1 表达显著高于 10%胎牛血清对照培养。



A: P3 代骨髓间充质干细胞



B: P4 代骨髓间充质干细胞



C: P5 代骨髓间充质干细胞

注: 细胞表面 Stro-1 表达的流式细胞术检测结果, 黄色波峰为空白对照组, 绿色波峰为 10%FBS 组, 紫色波峰为 10%富血小板血浆组。

图 9 不同组分培养基连续 3 代培养骨髓间充质干细胞流式细胞术结果

Figure 9 Flow cytometry results of bone marrow mesenchymal stem cells which cultured in different concentrations of platelet-rich plasma for three consecutive generations

3 讨论 Discussion

实验采用密度梯度离心法分离骨髓间充质干细胞, 并连续3代培养分离纯化细胞群落。根据干细胞具有多向分化潜能, 分别用成骨诱导液和成脂诱导液培养该细胞, 一定时间后发现了明显的矿化结节和脂滴形成, 说明该细胞具有多向分化能力。虽然目前还没有哪一种干细胞表面标记物具有组织特异性, 但是, 通常可以根据细胞具有的几种表面标记物推断其来源和类型。本实验经流式细胞术鉴定, 细胞表面抗原CD44⁺表达率为97.68%, CD105⁺表达率为97.07%, 而CD34表达为阴性, 符合间充质干细胞表面标志物一般表型。所得细胞为人骨髓间充质干细胞, 可用于进一步实验研究。

本实验采用的改良富血小板血浆是通过液氮反复冻融的方式, 促进血小板中生长因子的释放。相比较加入外源性物质(氯化钙、人或牛凝血酶)的激活方式, 采用液氮反复冻融可以减少外源性物质所带来的潜在感染风险, 避免传染性疾病(如HIV、乙肝、梅毒等)以及免疫反应的发生^[11]。另外, 从组织工程的安全性考虑, 为了减少胎牛血清和小牛血清等外源性血清的使用, 以最大限度地避免骨髓间充质干细胞在组织工程和临床应用中可能存在的人畜共患疾病传播风险^[12], 本实验尝试使用自体来源改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞进行体外培养、扩增和分化诱导等。

富血小板血浆经凝血酶或反复冻融裂解, 可以释放血小板 α 颗粒中的多种生长因子, 如血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子和转化生长因子 β 等^[13], 富血小板血浆中不仅富含上述生长因子, 而且保持了生长因子间的天然生理学浓度比例。这些生长因子发挥联合或协同作用, 可以调控成骨细胞及其前体细胞骨髓间充质干细胞的趋化、增殖和分化, 进而影响骨组织的形成和再生^[14-15]。以往作者的实验研究发现改良富血小板血浆对人牙髓细胞增殖的促进作用具有浓度依赖性, 1%-10%的改良富血小板血浆明显提高了人牙髓细胞的增殖活性, 以10%浓度尤为明显。本实验结果表明5%-10%的改良富血小板血浆在培养第6, 8天均显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖, 10%的富血小板血浆在培养第10天显著促进了骨髓间充质干细胞的增殖, 并且其对细胞的增殖促进作用具有浓度依赖性, 过高浓度改良富血小板血浆反而导致了对细胞增殖的抑制。近期的研究表明大量浓聚生长因子(如富血小板血浆)注入到牙周及下颌骨损伤中可能是一种具备潜力的生物工程治疗方法^[16]。然而富血小板血浆应用于临床治疗的研究及实践中, 尚有最佳使用浓度, 应用于治疗的最佳时机等问题需要解决^[17], 本实验为其进一步临床应用, 提供了其作用的原理及最佳的使用浓度的理论依据。

骨髓间充质干细胞为非均质性的细胞群体, 其表面标记物Stro-1具有相对的特异性^[18], Stro-1⁺细胞亚群为数量较少的更原始、均一性更佳的骨髓间充质干细胞, 已被证实比Stro-1⁻的骨髓间充质干细胞具有更强的免疫抑制效应、造血支持和动物模型中的归巢能力^[19]。本实验对细胞表面Stro-1表达的检测显示10%浓度富血小板血浆组Stro-1⁺表达率显著高于对照组, 这提示了在体外培养中加入适当浓度富血小板血浆, 能够在一定程度上调节细胞的均一性, 通过更原始的Stro-1⁺细胞亚群的高表达, 促进细胞的增殖和增强其分化潜能。

现阶段, 牙周和口腔颌面部骨折的缺损重建修复依然是一个临床难题, 这些骨质缺损有很少的潜力能够自行修复愈合。最近的骨组织工程学研究集中在通过手术方法于可降解支架材料上加入组织诱导因子和/或特定种类活细胞群, 来促进骨组织修复^[20-21]。骨髓间充质干细胞由于其具有免疫抑制作用, 多向分化能力、易于获取并于体外大量扩增的特性, 故被认为是一种良好的植入种子细胞。本实验采用合适浓度改良富血小板血浆体外培养的骨髓间充质干细胞可获得比普通培养方式具有更强的免疫抑制效应, 更好的细胞原性及均一性的细胞群落, 将更有利于其在自体、异体骨移植、支架材料植入等的实验研究及临床上的应用, 同时还可以避免使用动物血清进行体外细胞培养和扩增可能带来的人畜共患疾病的感染风险。

综上所述, 体积比为5%-10%的改良富血小板血浆对体外培养的人骨髓间充质干细胞的增殖具有促进作用, 其中以10%浓度为佳, 该浓度改良富血小板血浆可以促进人骨髓间充质干细胞群落中Stro-1⁺细胞亚群的增殖, 从而增强细胞群落的免疫抑制效应、均一性和原始性。该结果为将自体的改良富血小板血浆用于组织工程中的骨髓间充质干细胞(来源于自体)体外增殖扩展提供了理论支持, 但是, 有关改良富血小板血浆对骨髓间充质干细胞增殖的促进作用呈现浓度特异性的原因, 以及在体应用改良富血小板血浆进行骨组织再生的最适浓度等问题目前还不清楚, 需要进一步的实验研究加以阐明。

致谢: 感谢解放军广州军区总医院医学实验科提供实验场地及仪器。

作者贡献: 实验设计为段建民、李洪涛, 实验实施为李斯翰, 实验评估为段建民。李斯翰成文, 段建民审校, 段建民对文章负责。

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: 骨髓间充质干细胞及富血小板血浆来源于健康志愿者, 静脉血采集自同一志愿者, 该志愿者完全知情同意将自己的骨髓血及外周血血样用于本研究。

学术术语: 富血小板血浆-全血经离心后得到的血小板浓缩物, 富血小板血浆中含有大量生长因子及蛋白质, 经凝血酶或反复冻融裂解, 可以释放血小板 α 颗粒中的多种生长因子, 这些生长因子发挥联合或协同作用, 可以调控成骨细胞及其前体细胞骨髓间充质干细胞的趋化、增殖和分化, 进而影响骨组织的形成和再生。

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。

4 参考文献 References

- [1] Albanese A, Licata ME, Polizzi B, et al. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing*. 2013;10(1):23.
- [2] Chi NH, Yang MC, Chung TW, et al. Cardiac repair achieved by bone marrow mesenchymal stem cells/silk fibroin/hyaluronic acid patches in a rat of myocardial infarction model. *Biomaterials*. 2012;33(22):5541-5551.
- [3] 李洪涛, 段建民, 片山直. 富血小板血浆与洗涤血小板对人牙髓细胞矿化的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(7):1206-1210.
- [4] 李洪涛, 段建民, 张宏斌, 等. 液氮冻融洗涤血小板对人牙髓细胞增殖的影响[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2010, 20(6):314-316.
- [5] Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. *Tsitologiya, Tsitologiya*. 2013;55(2): 101-110.
- [6] Ng F, Boucher S, Koh S, et al. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*. 2008;112(2):295-307.
- [7] Li CH, Sun L, Zhang YJ, et al. Expression of Galectins in umbilical cord mesenchymal stem cells. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2013;45(3):452-457.
- [8] Zhao SN, Liu WF, Zhang ZT. Effect of platelet-rich plasma on cell proliferation and osteogenic activity of pulp stem cells. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2013;48(3):177-182.
- [9] Liu T, Huang Y, Guo L, et al. CD44⁺/CD105⁺ human amniotic fluid mesenchymal stem cells survive and proliferate in the ovary long-term in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Int J Med Sci*. 2012;9(7):592-602.
- [10] Luo W, Fan J, Ye C. Proliferation and chondrogenic differentiation of precartilaginous stem cells in self-assembling peptide nanofiber scaffolds *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2012;26(12):1505-1511.
- [11] Sánchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(1):93-103.
- [12] Zhang ZY, Huang AW, Fan JJ, et al. The potential use of allogeneic platelet-rich plasma for large bone defect treatment: immunogenicity and defect healing efficacy. *Cell Transplant*. 2013;22(1):175-187.
- [13] Plachokova AS, van den Dolder J, van den Beucken JJ, et al. Bone regenerative properties of rat, goat and human platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(8): 861-869.
- [14] Nagata MJ, Melo LG, Messori MR, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol*. 2009;36(9):775-783.
- [15] Huang S, Jia S, Liu G, et al. Osteogenic differentiation of muscle satellite cells induced by platelet-rich plasma encapsulated in three-dimensional alginate scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114(5 Suppl): S32-40.
- [16] Torres J, Tamimi F, Martinez PP, et al. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009;36(8):677-687.
- [17] Lee DH. Platelet-rich plasma: is it ready for prime time?: Commentary on an article by Stefano Gumina, MD, PhD, et al.: "Use of platelet-leukocyte membrane in arthroscopic repair of large rotator cuff tears. A prospective randomized study". *J Bone Joint Surg Am*. 2012;94(15):e1141-1142.
- [18] Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55-62.
- [19] 李芳, 郭青, 张翼鹭, 等. 间充质干细胞和Stro-1⁺亚群免疫抑制的比较及IDO1、IDO2在其中的作用[J]. *天津医科大学学报*, 2012, 18(2):185-191.
- [20] Ko EK, Jeong SI, Rim NG, et al. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and in vivo bone formation in composite nanofiber meshes. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(12):2105-2119.
- [21] Jiang X, Zhao J, Wang S, et al. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. *Biomaterials*. 2009;30(27):4522-4532.