

改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞增殖的最佳浓度

文军^{1,2}, 吴补领¹, 段建民², 李洪涛², 李斯翰², 李鑫² (南方医科大学南方医院口腔科//南方医科大学口腔医学院, 广东省广州市 510515; ²解放军广州军区广州总医院口腔科, 广东省广州市 510010)

文章亮点:

文章特点在于提出了含有较高浓度生长因子的改良富血小板血浆替代胎牛血清, 可用于乳牙牙髓干细胞体外扩增的方法, 并从中筛选出最佳的浓度, 发现改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞增殖的作用具有浓度特异性。

关键词:

干细胞; 培养; 富血小板血浆; 乳牙牙髓干细胞; 间质干细胞; 骨髓间充质干细胞; 胎牛血清; 血小板源性生长因子; 细胞增殖; 转化生长因子 β

主题词:

富血小板血浆; 牙, 乳; 牙髓; 血清白蛋白, 牛

基金资助:

广东省科技计划项目(2011B031800201)

摘要

背景: 课题组前期实验发现用液氮冻融激活的改良富血小板血浆可以促进骨髓间充质干细胞和牙髓干细胞的增殖, 且这种促增殖作用具有浓度特异性。

目的: 体外研究不同浓度的改良富血小板血浆对人乳牙牙髓干细胞增殖的影响。

方法: 利用全自动血细胞分离机制备血小板浓缩物, 反复冻融法激活, 获得改良富血小板血浆; 以 α -MEM作为基础培养基, 分别加入体积分数为 2%, 5%, 10%, 20% 4 种不同浓度改良富血小板血浆或者体积分数 10% 胎牛血清进行培养, 观察细胞增殖差异。

结果与结论: 不同浓度的改良富血小板血浆均能够促进乳牙牙髓干细胞增殖, 体积分数 2%改良富血小板血浆与体积分数 10%胎牛血清促进乳牙牙髓干细胞增殖作用接近。提示体积分数 2%改良富血小板血浆可以促进乳牙牙髓干细胞的增殖, 有可能代替胎牛血清用于乳牙牙髓干细胞的体外扩增。

文军, 吴补领, 段建民, 李洪涛, 李斯翰, 李鑫. 改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞增殖的最佳浓度[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4517-4523.

Optimal concentration of modified platelet-rich plasma to promote the proliferation of dental pulp stem cells from deciduous teeth

Wen Jun^{1,2}, Wu Bu-ling¹, Duan Jian-min², Li Hong-tao², Li Si-han², Li Xin² (¹Department of Stomatology, Nanfang Hospital//College of Stomatology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; ²Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous experiments have shown that modified platelet-rich plasma activated by liquid nitrogen freezing and thawing can promote the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells and dental pulp stem cells in a concentration-dependent manner.

OBJECTIVE: To investigate the effect of modified platelet-rich plasma at different concentrations on the proliferation of dental pulp stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

METHODS: Platelets were selected and harvested by automatic blood cell analyzer, and then activated by liquid nitrogen freezing and thawing. α -MEM served as basal medium. Different concentrations of modified platelet-rich plasma (2%, 5%, 10%, 20%) or 10% fetal bovine serum were added, respectively. The difference in cell proliferation was observed.

RESULTS AND CONCLUSION: Modified platelet-rich plasma at different concentrations could promote the proliferation of dental pulp stem cells from deciduous teeth. The effects of 2% modified platelet-rich plasma and 10% fetal bovine serum on promoting the proliferation of dental pulp stem cells from deciduous teeth were similar. These results indicated that 2% modified platelet-rich plasma could promote the proliferation of dental pulp stem cells from deciduous teeth, and substitute for fetal bovine serum in the amplification of dental pulp stem cells from deciduous teeth *in vitro*.

Subject headings: platelet-rich plasma; tooth, deciduous; dental pulp; serum albumin, bovine

文军, 男, 1983 年生, 湖南省湘乡市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事牙髓生物学方面的研究。

通讯作者: 吴补领, 博士, 教授, 主任医师, 南方医科大学口腔医学院院长, 南方医科大学南方医院口腔科//南方医科大学口腔医学院, 广东省广州市 510515

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

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.015
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)28-04517-07

稿件接受: 2014-06-02

Wen Jun, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Stomatology, Nanfang Hospital//College of Stomatology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wu Bu-ling, M.D., Professor, Chief physician, Department of Stomatology, Nanfang Hospital//College of Stomatology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Corresponding author: Duan Jian-min, M.D., Chief physician, Department of Stomatology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-06-02

Funding: the Guangdong Provincial Science and Technology Project, No. 2011B031800201

Wen J, Wu BL, Duan JM, Li HT, Li SH, Li X. Optimal concentration of modified platelet-rich plasma to promote the proliferation of dental pulp stem cells from deciduous teeth. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(28):4517-4523.

0 引言 Introduction

间充质干细胞是一种未分化细胞, 来源于发育早期的中胚层和外胚层, 具有自我复制, 以及在一定条件下向骨、软骨、脂肪和肌肉等组织细胞分化的能力, 被普遍认为是组织工程骨的理想种子细胞。到目前为止, 大部分的科研和临床应用都选择骨髓间充质干细胞。但是, 抽取骨髓是一种侵入性操作, 会给捐献者带来一定的痛苦。临床上造成骨缺损的常见疾病如牙周病、肿瘤等多发生在成年甚至老年人群, 而老年人的骨髓间充质干细胞增殖和分化能力均显著降低, 已不适合作为骨组织工程的种子细胞。因此, 选择其他来源的间充质干细胞显得尤为重要。

由于乳牙牙髓的组织量很小, 在临床应用的准备阶段, 需要将乳牙牙髓干细胞在体外进行大量扩增。胎牛血清是最常应用于细胞培养的物质, 它为细胞的增殖、迁移和分化等生物学行为提供营养、生长因子和激素等生物活性物质。然而, 胎牛血清的应用可能涉及到伦理、科学以及安全等问题。胎牛血清是从胎牛体内获取, 需要将怀孕的母牛处死, 目前的制取方法还会导致大量胎牛的死亡; 胎牛血清的成分不确定, 每一批次间各种成分的含量千差万别, 因此在科学研究中容易造成误差, 影响实验的可重复性; 胎牛血清作为一种外源性血清, 应用于临床可能引起免疫排斥反应, 甚至可能将牛的病毒、细菌等病原体传播至人。

富血小板血浆是自体全血经离心后得到的血小板浓缩物, 可释放大量细胞因子, 诱导和促进间充质干细胞增殖、迁移和分化。富血小板血浆应用前需用一定方法激活, 通过血小板的黏附、凝集或者破裂将生长因子从血小板 α 颗粒中释放出来。目前常用牛凝血酶、氯化钙或者反复冻融的方式对富血小板血浆进行激活。考虑到牛凝血酶作为异种蛋白应用于临床同样存在病毒传播和免疫抑制等一系列潜在风险, 而且高浓度凝血酶可影响细胞增殖, 甚至导致细胞死亡, 从而抑制组织的再生修复, 牛凝血酶还可以在人体诱导抗凝血因子V, VI和凝血酶抗体的产生, 当人再次接触它时可能引起危及生命的凝血性疾病。氯化钙中的钙离子对科研过程存在干扰。实验拟通过对富血小板血浆的制备和激活方式进行改良, 获取含有大量生长因子的改良富血小板血浆, 并进一步比较改良富血小板血浆和胎牛血清促进乳牙牙髓干细胞增殖的作用, 探讨改良富血小板血浆是否可替代胎牛血清用于乳牙牙髓干细胞的体外扩增。

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2013年6至12月在解放军广州军区广州总医院医学实验科完成。

材料:

人体组织:

血小板: 解放军广州军区广州总医院输血科采集4名男性志愿者的血小板。志愿者血型为AB型, 年龄18-35岁, 身体健康, 无家族遗传病史, 志愿者对实验知情同意, 实验符合医学伦理学标准。

牙齿: 取自1名7岁健康男童的2颗滞留下颌乳中切牙, 无牙体牙髓疾病, 获得家长知情同意。

乳牙牙髓干细胞培养使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
α -MEM培养液, 胎牛血清, 0.25%胰酶	Gibco, 美国
地塞米松, β -甘油磷酸钠, 胰岛素, 抗坏血酸, 吡啶美辛, 异丁基甲基黄嘌呤, 油红O, 茜素红S	Sigma, 美国
CCK-8试剂盒	同仁, 日本
I型胶原酶	Biosharp, 中国
中性蛋白酶	Roche, 瑞士
鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体, 鼠抗猪波形蛋白单克隆抗体	福建迈新
SP试剂盒	北京中杉
CO ₂ 恒温孵箱	Heraeus, 德国
酶标仪	Biocell, 美国
倒置显微镜	Olympus, 日本
全血细胞分析仪	深圳迈瑞

方法:

改良富血小板血浆的制备: 机采每名志愿者血小板各10 mL, 加入终浓度为2 U/mL的肝素; 将4份样本混合, 充分混匀后取少量用全血细胞分析仪计数, 加入PBS, 将血小板浓度调至约 $1 \times 10^{12} L^{-1}$, 吸管反复吹打使血小板重新悬浮成为改良富血小板血浆。

改良富血小板血浆的激活: 将改良富血小板血浆分装入冻存管内, 浸入液氮罐5 min, 迅速取出浸入37 °C水浴箱5 min, 反复3次, 使血小板充分冻融裂解; 3 000 r/min离心20 min, 去除血小板沉渣, 0.2 μ m过滤, 保存于-80 °C备用。

乳牙牙髓干细胞的收集和培养: 以体积分数75%乙醇充分消毒牙体周围组织, 拔除后立即放入预冷含高倍双抗 α -MEM培养基中保存备用, 低温保存状态下送实验室, 4 h内原代取材。沿乳牙釉牙骨质界用高速涡轮手机环绕牙颈部磨出一定深度凹槽(注意不能穿髓), 超净台中用体积

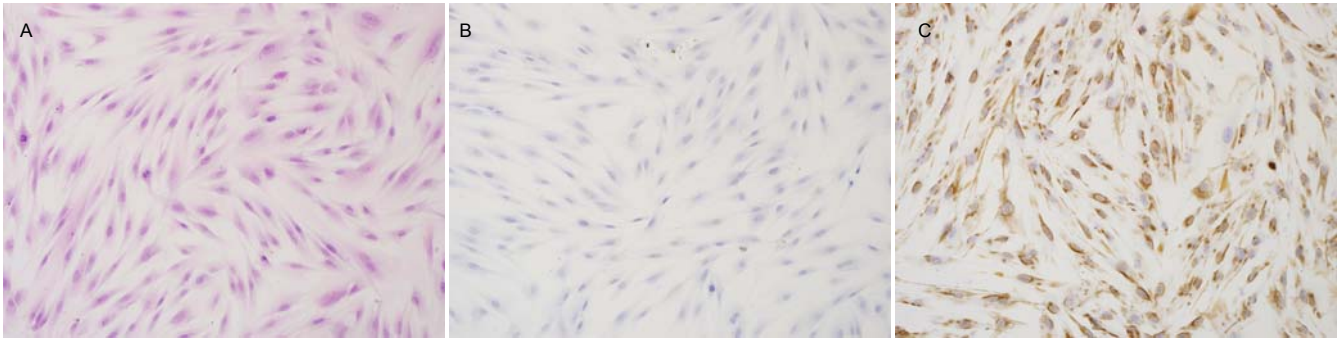


图1 第3代乳牙髓干细胞的形态(×200)

Figure 1 Morphology of the third passage of dental pulp stem cells from deciduous teeth (×200)

图注: 图中 A 为第3代乳牙髓干细胞经苏木精-伊红染色后显示的形态, B 为经免疫细胞化学染色乳牙髓干细胞不表达角蛋白, C 为经免疫细胞化学染色乳牙髓干细胞强表达波形丝蛋白。

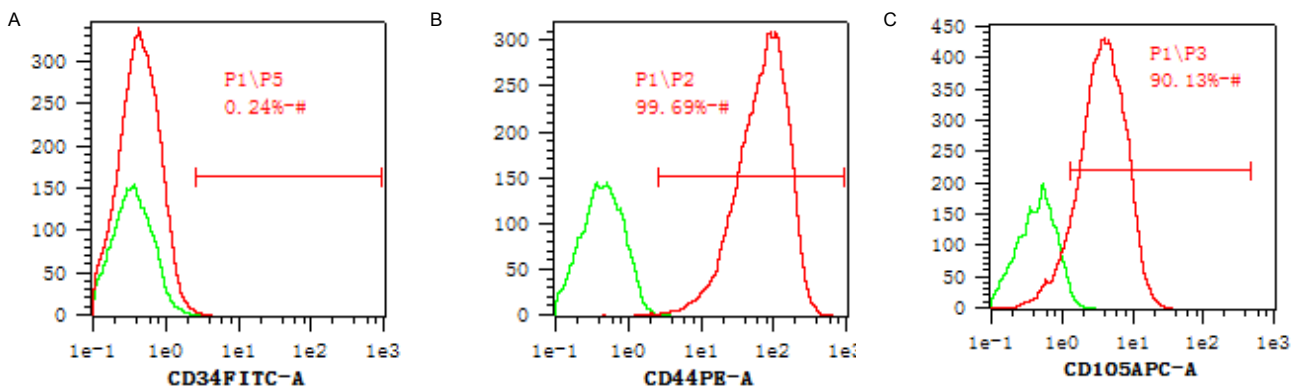


图3 流式细胞仪检测乳牙髓干细胞表面特异性标志物

Figure 3 Flow cytometry for detecting specific markers on the surface of dental pulp stem cells from deciduous teeth

图注: 图中 A 显示乳牙髓干细胞呈 CD34 阴性, B 显示乳牙髓干细胞呈 CD44 阳性, C 乳牙髓干细胞呈 CD105 阳性。

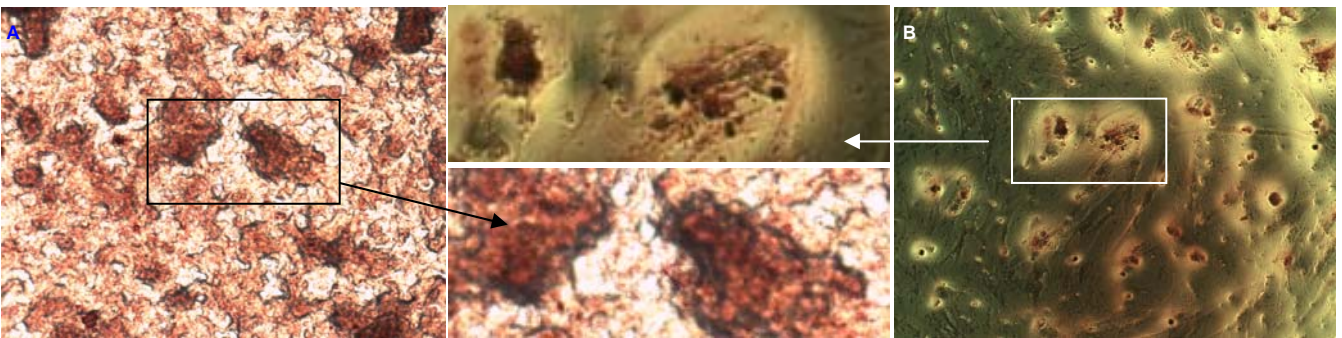


图4 乳牙髓干细胞的体外诱导分化

Figure 4 Induction and differentiation of dental pulp stem cells from deciduous teeth *in vitro*

图注: 图中 A 为乳牙髓干细胞经成骨诱导 30 d 后, 茜素红染色呈阳性(×10); B 为乳牙髓干细胞成脂诱导 21 d, 油红 O 染色呈阳性(×100)。

分数75%乙醇消毒, PBS反复冲洗, 沿凹槽将乳牙劈开, 拔髓针拔取牙髓组织, 剪碎; 3 g/L I 型胶原酶、4 g/L 中性蛋白酶按1:1比例混合, 于37 °C 水浴中消化牙髓组织1 h。消化液经1 000 r/min 速度离心5 min, 弃上清, 加入含体积分数20%胎牛血清的 α -MEM培养液混匀、吹打, 经200目滤网过滤, 细胞悬液接种于平底6孔塑料培养板, 37 °C、体积分数5% CO₂恒温孵箱中培养3 d, 半量换液, 之后每三四天半量换液, 细胞达到90%融合时传代至25 cm²塑料培养瓶中继续培养, 将培养的生长良好的第3, 4代细胞用

于实验。

乳牙髓干细胞的鉴定:

细胞形态学观察: 将第3代细胞胰酶消化后, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^7 L^{-1}$, 滴加于经多聚赖氨酸处理的盖玻片上(置于6孔板中), 加入适量培养液, 细胞爬满玻片后取出细胞爬片, 苏木精-伊红染色, 中性树脂封固, 显微镜下观察细胞形态。

免疫细胞化学技术检测细胞免疫表型: 取第3代细胞制备的细胞爬片, PBS洗涤3次, 体积分数4%甲醛固定2 h,

PBS洗涤3次, 每次5 min; 体积分数10%过氧化氢室温孵育10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性, PBS洗涤2次, 每次3 min; 体积分数3%正常羊血清封闭非特异性染色30 min, 吸除封闭剂, 不洗; 滴加鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体(1:100), 37 °C孵育2 h, PBS洗涤3次, 每次5 min; 滴加生物素化二抗, 37 °C孵育30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min; 辣根酶标记链霉卵白素37 °C孵育30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min。DAB显微镜下控制显色, 苏木精轻度复染, 常规脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封固; 阴性对照用PBS代替一抗。同样的方法检测波形蛋白的表达情况。

乳牙牙髓干细胞增殖能力测定: 取第3代生长良好的乳牙牙髓干细胞以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 、200 μL /孔接种于96孔板, 共接种4×8个孔, 每4孔1组, 在培养的1-7 d, 分别向每组孔加入10 μL CCK-8溶液, 将培养板在培养箱内孵育2 h, 用酶标仪测定于450 nm波长处吸光度值, 绘制细胞生长曲线。

流式细胞术检测乳牙牙髓干细胞细胞表面标志物: 取第4代生长良好的乳牙牙髓干细胞, 用流式细胞仪检测细胞表面CD34, CD44和CD105的表达情况。

乳牙牙髓干细胞的定向分化潜能:

成骨诱导: 取第3代细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于6孔板中培养, 常规换液。当细胞融合到70%时加矿化诱导液(终浓度含50 $\mu\text{g/L}$ 抗坏血酸, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠和0.01 mmol/L地塞米松)继续培养。每3 d换液, 30 d后终止培养, 甲醛固定15 min, 茜素红染色5 min, PBS冲洗, 干燥, 封固。倒置显微镜下观察。

成脂诱导: 取第3代细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于6孔板中培养, 常规换液。当细胞融合至90%时, 加成脂诱导液(终浓度含1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松, 10 $\mu\text{mol/L}$ 胰岛素, 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡哆美辛, 0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤)每3 d换液, 21 d后终止培养, 甲醛固定15 min, 油红O染色, 倒置显微镜下观察脂滴形成情况。

不同培养条件下乳牙牙髓干细胞的增殖能力比较: 取第4代乳牙牙髓干细胞, 以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 、200 μL /孔的密度接种于96孔板, 将乳牙牙髓干细胞分为2%, 5%, 10%, 20%改良富血小板血浆组和对照组, 每组4个复孔, 分别加入体积分数2%, 5%, 10%, 20%的改良富血小板血浆和体积分数10%胎牛血清进行培养。在培养的1-7 d, 分别向每组孔加入10 μL CCK-8溶液, 将培养板在体积分数5% CO_2 恒温孵育箱内孵育2 h, 用酶标仪测定于450 nm波长处吸光度, 绘制细胞生长曲线。

主要观察指标: 不同条件下乳牙牙髓干细胞的增殖能力。

统计学分析: 相同实验条件重复3次, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 18.0软件(美国SPSS公司)进行统计学分析, 采用析因设计的方差分析分析时间和分组的交互作用, 同一时间点组间均数的比较以及同一组内部各时间点的比

较采用单因素方差分析, 多重比较采用LSD方法, 显著性差异检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 改良富血小板血浆的性状 分离制备的改良富血小板血浆为淡黄色液体, 血小板计数为 $1.012 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$, 约为正常人体内血小板浓度的5倍。

2.2 乳牙牙髓干细胞的形态与鉴定 苏木精-伊红染色显示, 乳牙牙髓细胞多数呈长梭形, 成纤维细胞样形态, 少数呈多角形或卵圆形, 胞核体积较大, 深染, 胞浆着色较浅(图1A)。免疫细胞化学结果显示, 角蛋白染色阴性(图1B), 波形蛋白染色强阳性, 为胞核着色(图1C)。

随培养时间的延长, 乳牙牙髓干细胞数量增加, 并在第3天呈快速生长, 在第6天达增长平台(图2)。

第3代乳牙牙髓干细胞中, 有99.69%的细胞CD44阳性, 有90.13%的细胞CD105阳性, 抗体CD34为阴性(图3)。

2.3 乳牙牙髓干细胞体外诱导多向分化结果 第3代乳牙牙髓干细胞增长迅速, 第6天后细胞逐渐重叠生长, 第30天时形成明显结节, 茜素红染色后呈阳性(图4A)。

倒置显微镜下观察, 第3代细胞在成脂诱导液的作用下, 21 d可见透明高亮点, 并有部分融合, 油红O染色呈阳性(图4B)。

2.4 改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞生长的影响 表1所示为不同浓度改良富血小板血浆培养的乳牙牙髓干细胞在不同时间段的增殖活性。不同培养条件下乳牙牙髓干细胞的生长曲线见图5, 随着时间的延长, 各组细胞数量都增加, 说明各浓度的改良富血小板血浆都能够促进乳牙牙髓干细胞的增殖。

实验第2天, 体积分数2%改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞的促增殖效果与对照组差异无显著性意义($P > 0.05$), 而5%, 10%和20%改良富血小板血浆组无论与对照组或2%改良富血小板血浆组比, 促增殖效果较弱($P < 0.05$); 体积分数5%, 10%和20%改良富血小板血浆的促增殖效果相当($P > 0.05$)。

实验第5天, 体积分数2%和5%改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞的促增殖效果与对照组差异无显著性意义($P > 0.05$), 与对照组和2%改良富血小板血浆组相比, 10%和20%改良富血小板血浆促乳牙牙髓干细胞的增殖效果较弱, 但差异有显著性意义($P < 0.05$), 但是与5%改良富血小板血浆组相比, 10%和20%改良富血小板血浆组促乳牙牙髓干细胞的增殖能力的差异无显著性意义($P > 0.05$)。

实验第7天, 与对照组相比, 体积分数2%和5%改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞的促增殖效果差异无显著性意义($P > 0.05$), 但与对照组、2%和5%改良富血小板血浆组相比, 体积分数10%和20%改良富血小板血浆具有促增殖效果($P < 0.05$)。

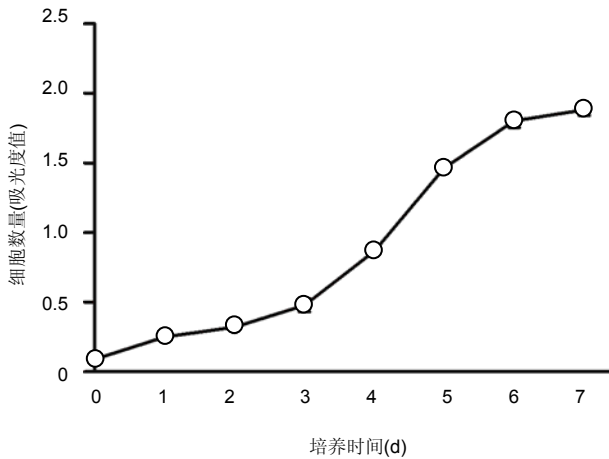


图2 第3代乳牙牙髓干细胞的生长曲线

Figure 2 Growth curve of the third passage of dental pulp stem cells from deciduous teeth

图注: 第3代乳牙牙髓干细胞在培养第3天进入指数增长期, 第6天进入平台期。

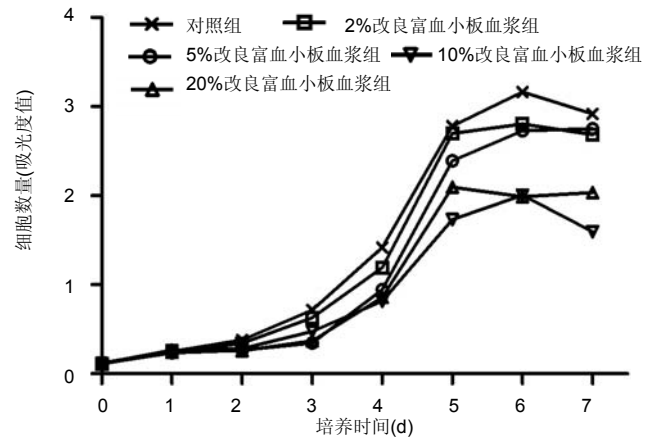


图5 不同培养条件下乳牙牙髓干细胞生长曲线

Figure 5 Growth curves of dental pulp stem cells from deciduous teeth under different culture conditions

图注: 各浓度的改良富血小板血浆都能够促进乳牙牙髓干细胞的增殖。

表1 不同浓度改良富血小板血浆培养的乳牙牙髓干细胞在不同时间段细胞增殖活性

Table 1 Proliferation activity of dental pulp stem cells from deciduous teeth cultured in different concentrations of modified platelet-rich plasma at different time points ($\bar{x} \pm s$, absorbance)

培养时间(d)	对照组	2%改良富血小板血浆组	5%改良富血小板血浆组	10%改良富血小板血浆组	20%改良富血小板血浆组	F	P
1	0.247±0.006	0.241±0.007	0.234±0.046	0.264±0.010	0.264±0.100	1.234	0.338
2	0.377±0.039 ^{cde}	0.342±0.013 ^{cde}	0.266±0.032 ^{ab}	0.283±0.038 ^{ab}	0.258±0.001 ^{ab}	12.747	0.000
3	0.715±0.153 ^{cde}	0.630±0.153 ^{ce}	0.345±0.028 ^{ab}	0.478±0.062 ^a	0.367±0.035 ^{ab}	9.952	0.000
4	1.417±0.118 ^{cde}	1.192±0.134 ^{de}	0.945±0.113 ^a	0.816±0.299 ^{ab}	0.857±0.038 ^{ab}	9.528	0.000
5	2.782±0.524 ^{de}	2.699±0.185 ^{de}	2.390±0.227 ^d	1.722±0.416 ^{abc}	2.096±0.236 ^{ab}	6.512	0.003
6	3.165±0.393 ^{de}	2.806±0.309 ^{de}	2.730±0.448 ^{de}	2.006±0.032 ^{abc}	1.990±0.179 ^{abc}	11.213	0.000
7	2.919±0.123 ^{de}	2.686±0.086 ^{de}	2.751±0.583 ^{de}	1.594±0.329 ^{abc}	2.035±0.338 ^{abc}	10.754	0.000
F	93.805	217.715	65.433	40.237	106.062		
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与2%改良富血小板血浆组相比, ^b $P < 0.05$; 与5%改良富血小板血浆组相比, ^c $P < 0.05$; 与10%改良富血小板血浆组相比, ^d $P < 0.05$; 与20%改良富血小板血浆组相比, ^e $P < 0.05$ 。

体积分数2%改良富血小板血浆在整个培养周期中与体积分数10%胎牛血清对乳牙牙髓干细胞的促增殖效果差异无显著性意义($P > 0.05$)。各浓度富血小板血浆相比较, 体积分数2%改良富血小板血浆对细胞的促增殖能力最强; 与体积分数10%胎牛血清比较, 体积分数5%改良富血小板血浆在第2至4天对细胞的促增殖能力较弱, 但是在第5-7天, 两者比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 与体积分数10%胎牛血清相比, 体积分数10%和20%改良富血小板血浆在整个细胞培养周期内对细胞的促增殖能力较弱($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

2003年Miura从脱落乳牙的牙髓中分离到具有高度增殖能力和多向分化能力的干细胞, 命名为乳牙牙髓干细胞。实验获取的乳牙牙髓细胞具有成纤维细胞样形态, 细胞增长曲线符合干细胞增殖的一般特征; 免疫细胞化学结果显

示角蛋白阴性, 而波形蛋白阳性, 说明细胞来源于间充质; 流式细胞术检测CD44, CD105阳性, CD34为阴性, 说明细胞表达间充质干细胞特异性表面标记物。由此可见, 实验获取了增殖能力强, 表达间充质干细胞特异性标记物的乳牙牙髓干细胞。

自体血小板是丰富的生长因子库。血小板的 α 颗粒中含有大量的生长因子, 包括血小板源性生长因子、转化生长因子 β 、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子和血管内皮生长因子等, 这些细胞因子在细胞的生物学行为中都发挥着重要作用。研究证明, 将血小板离心浓缩至正常人体内浓度的3-5倍, 制备成富血小板血浆, 经激活后可有效促进细胞的增殖。

由于个体差异, 来自不同供者的富血小板血浆所含有的生长因子浓度不尽相同。为减少批次间的差异, 临床工作中一般采用混杂血小板, 并由此获取大量的富血小板血浆。实验采用4份不同来源的机采血小板进行混合, 目的是

降低个体差异引起的偏倚。采用AB型志愿者的血小板, 尽量减少了改良富血小板血浆成分中的抗体成分, 可以有效降低血小板混杂后可能引起的凝集反应以及应用于临床可能引起的免疫排斥反应。

传统的富血小板血浆多采用两次离心法手工采集分离浓缩, 但是这种方法需要抽取供者较多静脉血; 获取的富血小板血浆混杂的其它血细胞成分较多; 由于分离过程复杂, 在制备过程中伴随着大量血小板的裂解激活, 影响最终血小板浓度的确定。实验采用机采血小板, 通过对多功能细胞分离机的设定, 可定量采集一定数量的血小板, 而其它血细胞成分则回输入体内; 这种方法进一步纯化血小板, 避免其它血细胞的混杂, 更有利于分析研究血小板及其裂解物的生物学作用; 更利于控制血小板的浓度, 使科研和临床更具有可靠性和重复性。

李洪涛等^[1]尝试用液氮冻融方法裂解血小板。采用反复冻融的方法可以促进血小板释放血小板源性生长因子AA和转化生长因子 β 1, 而且其释放血小板源性生长因子AA和转化生长因子 β 1的浓度与采用高浓度牛凝血酶(500-1 000 U/mL)激活血小板释放的血小板源性生长因子AA和转化生长因子 β 1质量浓度无显著性差异; 与牛凝血酶激活的富血小板血浆相比较, 液氮冻融激活的洗涤血小板在一定浓度下可以显著促进人牙髓细胞的增殖, 而且比牛凝血酶激活的富血小板血浆效果更好^[2]。由于冻融属于一种纯物理方法, 不包含其他生物或化学制剂, 加之操作简单、方便, 不失为一种安全、有效、便捷的血小板激活方式。作者即采用液氮反复冻融的方式激活血小板。

实验结果表明, 不同浓度的改良富血小板血浆均可促进乳牙牙髓干细胞的增殖, 这与改良富血小板血浆中含有大量的生长因子有关。流式细胞仪检测发现, 间充质干细胞表达高水平的血小板源性生长因子A、血小板源性生长因子B、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子 β II和胰岛素样生长因子1受体, 血小板中的各种生长因子可以作用于间充质干细胞, 调节细胞的增殖和分化。富血小板血浆的促增殖作用依赖于各种生长因子的协同作用^[19], 这些生长因子可以激活血小板源性生长因子受体/磷脂酰肌醇3-激酶/磷酸化蛋白激酶/核因子 κ B信号通路, 提高旁分泌水平, 促进细胞再生, 使细胞耐受不良环境的能力更强, 减缓细胞的凋亡^[10-13]。血小板源性生长因子在促进细胞增殖方面可能起了关键的作用, 用抗体选择性阻断血小板源性生长因子后, 富血小板血浆的促增殖作用被显著抑制^[14-15], 骨细胞的形成明显减少, 并且不能形成矿化结节; 对富血小板血浆中各种成分进行分析, 血小板源性生长因子和胰岛素样生长因子1促进牙髓细胞增殖, 酸性成纤维细胞生长因子、胰岛素样生长因子1和胰岛素样生长因子2促进细胞外基质合成, 转化生长因子 β 、血小板源性生长因子、酸性成纤维细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子可能调节牙髓细胞向成牙本质细胞分化^[16-17]。

实验发现, 不同浓度的改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞增殖的作用不尽相同, 其中以体积分数2%的改良富血小板血浆促进增殖能力最强, 在整个细胞培养周期, 体积分数2%改良富血小板血浆与体积分数10%胎牛血清促增殖作用差异无显著性意义, 体积分数5%改良富血小板血浆在培养的中后期, 对乳牙牙髓干细胞的促增殖作用与对照组差异无显著性意义, 而高浓度的改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞增殖的作用反而较弱, 这与作者所在课题组前期发现改良富血小板血浆对人牙髓细胞的促增殖作用相似。前期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, 体积分数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, 以体积分数10%浓度尤为明显。在一定浓度范围内, 牙髓干细胞的增殖能力与改良富血小板血浆呈浓度依赖性; 而高浓度的改良富血小板血浆则抑制牙髓干细胞的增殖^[18]。段建民等^[19]研究认为, 这种浓度特异性可能与其促进牙髓细胞产生的前列腺素E2有关, 即低浓度促进牙髓细胞产生的适量前列腺素E2促进了细胞的增殖, 而高浓度促进牙髓细胞产生的过量前列腺素E2抑制了细胞的增殖。此外, 高浓度改良富血小板血浆对牙髓细胞增殖的抑制还可能与其中的血浆成分有关, 血浆中可能存在对抗血小板生长因子作用的成分, 去除血浆后的洗涤血小板促进细胞增殖作用更强^[20-23]。李威等^[24]研究了不同浓度的富血小板血浆对犬牙髓成纤维细胞的促增殖作用, 认为随着富血小板血浆浓度的增加, 对牙髓成纤维细胞的增殖作用经历下面3个阶段: ①细胞的增殖与富血小板血浆的浓度呈正比。②富血小板血浆达到一定浓度, 细胞的增殖反应呈饱和状态, 细胞的增殖与富血小板血浆的浓度无关。③当富血小板血浆的浓度继续升高, 细胞的增殖与富血小板血浆的浓度呈负相关。即低浓度时刺激生长, 高浓度时抑制生长的双向反应。

综上所述, 实验通过多功能血细胞分离机采集多份AB型志愿者的血小板进行混杂, 应用液氮反复冻融的方法进行血小板的裂解激活, 制备出的改良富血小板血浆含有大量的生长因子。探索出的改良富血小板血浆制备激活方法简便高效, 易于标准化。本实验探讨了改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞增殖作用的影响, 发现不同浓度的改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞的增殖均有促进作用, 且以体积分数2%改良富血小板血浆对乳牙牙髓干细胞的促增殖作用最强, 在整个细胞培养周期中与体积分数10%胎牛血清的作用无显著性差异。由此可见, 改良富血小板血浆有可能替代胎牛血清用于乳牙牙髓干细胞的体外扩增, 从而增加组织工程产品应用于临床的安全性。

致谢: 感谢广州市妇女儿童医疗中心口腔科和解放军广州军区广州总医院输血科在收集乳牙标本和血液标本工作中给予的大力支持; 感谢解放军广州军区广州总医院医学实验科提供良好的

实验环境和技术指导。

作者贡献: 段建民进行实验设计, 实验实施为文军, 李斯翰, 李鑫, 实验评估为李洪涛, 文军成文, 段建民、吴补领审校, 段建民对文章负责。吴补领、段建民为并列通讯作者。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 参与实验者及其监护人对实验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 干预及治疗方案获解放军广州军区广州总医院伦理委员会批准。

学术术语: 血小板的 α 颗粒-是血小板内散在着的主要颗粒之一, 其内容物是中等电子密度, 有的颗粒中央还有电子密度较高的芯, 含有纤维蛋白原、血小板第4因子、组织蛋白酶A、组织蛋白酶D、酸性水解酶等。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 李洪涛, 段建民, 周谋, 等. 液氮冻融促进血小板源性生长因子AA与转化生长因子 β 1的释放[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6764-6767.
- [2] 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):314-317.
- [3] Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM, et al. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature*. 1984;309(5971): 804-806.
- [4] Poggi A, Vicenzi E, Cioce V, et al. Platelet contribution to cancer cell growth and migration: the role of platelet growth factors. *Haemostasis*. 1988;18(1):18-28.
- [5] Stoscheck CM, King LE Jr. Functional and structural characteristics of EGF and its receptor and their relationship to transforming proteins. *J Cell Biochem*. 1986;31(2):135-152.
- [6] Sporn MB, Roberts AB. Suppression of carcinogenesis by retinoids: interactions with peptide growth factors and their receptors as a key mechanism. *Princess Takamatsu Symp*. 1985;16:149-158.
- [7] Massagué J. Transforming growth factors. Isolation, characterization, and interaction with cellular receptors. *Prog Med Virol*. 1985;32:142-158.
- [8] Kraus MH, Pierce JH, Fleming TP, et al. Mechanisms by which genes encoding growth factors and growth factor receptors contribute to malignant transformation. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;551:320-336.
- [9] Stoika RS. Phylogenetic characteristics of the structure and function of polypeptide growth factors localized in the blood platelets of mammals. *Zh Evol Biokhim Fiziol*. 1989;25(3): 373-379.
- [10] Peng Y, Huang S, Wu Y, et al. Platelet rich plasma clot releasate preconditioning induced PI3K/AKT/NF κ B signaling enhances survival and regenerative function of rat bone marrow mesenchymal stem cells in hostile microenvironments. *Stem Cells Dev*. 2013;22(24):3236-3251.
- [11] Suzuki H, Iso Y. Clinical application of vascular regenerative therapy for peripheral artery disease. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:179730.
- [12] Huang YC, Leung VY, Lu WW, et al. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. *Spine J*. 2013;13(3): 352-362.
- [13] Das R, Jahr H, van Osch GJ, et al. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):159-168.
- [14] Li H, Usas A, Poddar M, et al. Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One*. 2013;8(6):e64923.
- [15] Anitua E, Prado R, Orive G. Safety and efficient ex vivo expansion of stem cells using platelet-rich plasma technology. *Ther Deliv*. 2013;4(9):1163-1177.
- [16] Nakashima M. The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells. *Arch Oral Biol*. 1992;37(3):231-236.
- [17] Ciarmela P, Islam MS, Reis FM, et al. Growth factors and myometrium: biological effects in uterine fibroid and possible clinical implications. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6): 772-790.
- [18] 段建民, 汪维健, 菊地宽高. 低浓度洗涤血小板促进人牙髓细胞增殖的作用机制探讨[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(5):675-678.
- [19] 段建民, 菊地宽高, 汪维建, 等. 血小板血浆对人牙髓细胞增殖的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(4):188-191.
- [20] Duan J, Kuang W, Tan J, et al. Differential effects of platelet rich plasma and washed platelets on the proliferation of mouse MSC cells. *Mol Biol Rep*. 2011;38(4):2485-2490.
- [21] Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7): 1121-1130.
- [22] Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1131-1137.
- [23] Yuan T, Guo SC, Han P, et al. Applications of leukocyte- and platelet-rich plasma (L-PRP) in trauma surgery. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1173-1184.
- [24] 李威, 闫福华, 卢友光, 等. 富血小板血浆对牙髓成纤维细胞附着、增殖的影响[J]. 口腔医学研究, 2004, 20(2):126-128.