

不同质量浓度釉基质蛋白培养人牙周膜细胞的生物活性

曲哲¹, 张静莹², 郭英¹, 马卫东¹, 马岚¹(¹大连市口腔医院种植科, 辽宁省大连市 116021; ²大连大学医学部, 辽宁省大连市 116622)

文章亮点:

1 自从1997年商品化的釉基质蛋白及相应釉基质衍生物被广泛应用于临床口腔以来,大量临床和基础实验证实釉基质蛋白是能够促进牙周组织和骨再生的细胞外基质蛋白,将其运用于牙周缺损治疗可达到接近生理性的牙周再生。

2 实验将不同质量浓度釉基质蛋白作用于体外培养的人牙周膜成纤维细胞,观察其对入牙周膜成纤维细胞增殖、分化和细胞迁移的影响,分析釉基质蛋白促进牙周组织生理性再生的机制,结果发现釉基质蛋白具有促进牙周膜细胞增殖、分化与迁移的能力。

关键词:

生物材料; 口腔生物材料; 釉基质蛋白; 牙周膜细胞; 细胞迁移; 碱性磷酸酶; 骨钙素

主题词:

牙周膜; 细胞外基质蛋白质类; 细胞运动

基金资助:

人力资源和社会保障部归国人员启动基金(2011508); 辽宁省教育厅高校科研项目(2008027); 大连市民生科技项目(2013E15SF169)

摘要

背景: 大量研究证实釉基质蛋白可促进成骨细胞和成牙骨质细胞的再生,将其运用于牙周缺损治疗可达到接近生理性的牙周再生。

目的: 观察不同质量浓度釉基质蛋白对人牙周膜细胞增殖、分化和迁移的影响。

方法: 取第3代人牙周膜细胞,以含不同质量浓度釉基质蛋白(0, 12.5, 25, 50, 100, 250 mg/L)的无血清DMEM培养基培养。培养24 h后,采用³H-胸腺嘧啶核苷掺入法检测细胞增殖,MTT法检测细胞活性;培养48 h后,检测细胞碱性磷酸酶活性及骨钙素分泌;待细胞融合为单层,去除细胞培养液,以移液管头将单层细胞制备出1 mm宽的细胞切口,持续24 h观察细胞融合情况。

结果与结论: 当釉基质蛋白质量浓度在0-100 mg/L范围内,随着其质量浓度的升高,细胞增殖、活性、碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌均逐渐升高,以100 mg/L升高最明显;当釉基质蛋白质量浓度增至250 mg/L时,细胞增殖、活性、碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌均有所下降,但仍高于0 mg/L组。100 mg/L组在初始观察6 h时,创缘周围的细胞开始向中心生长,待培养12 h时,创缘两侧细胞开始融合,培养20 h后创缘两侧细胞融合完全创缘完全关闭完全,创面愈合优于其他质量浓度组。结果表明釉基质蛋白具有促进牙周膜细胞增殖、分化与迁移的能力。

曲哲, 张静莹, 郭英, 马卫东, 马岚. 不同质量浓度釉基质蛋白培养人牙周膜细胞的生物活性[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3):399-404.

Influence of different concentrations of enamel matrix proteins on bioactivity of human periodontal ligament cells

Qu Zhe¹, Zhang Jing-ying², Guo Ying¹, Ma Wei-dong¹, Ma Lan¹ (¹Department of Dental Implantation, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China; ²Medicine Department, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Numerous studies have confirmed that enamel matrix proteins can promote the regeneration of osteoblasts and cementoblast, and then it can achieve approaching physiological periodontal regeneration in the treatment of periodontal defects.

OBJECTIVE: To observe the effects of different concentrations of enamel matrix proteins on proliferation, viability, differentiation and migration of human periodontal ligament cells.

METHODS: The human periodontal ligament cells at the third generation were gained, and then cultured in serum-free DMEM containing different concentrations of enamel matrix proteins (0, 12.5, 25, 50, 100, 250 mg/L). After 24 hours of culture, proliferation and viability of periodontal ligament cells were measured using [(3)H]-thymidine uptake and MTT assay. After 48 hours of culture, alkaline phosphatase activity and osteocalcin production were detected with commercial available test kits. When the cells grew as a monolayer, the cell culture fluid was removed, and then with a pipette head, a cell incision, 1 mm wideness, was prepared in a monolayer of

曲哲, 男, 1977年生, 吉林省长春市人, 2008年维也纳医科大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事种植体表面改性和骨组织工程研究。

通讯作者: 曲哲, 大连市口腔医院种植科, 辽宁省大连市 116021

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.03.013
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)03-00399-06

稿件接受: 2014-12-24

Qu Zhe, M.D., Associate professor, Department of Dental Implantation, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Corresponding author: Qu Zhe, Department of Dental Implantation, Dalian Stomatological Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-12-24

cells to further observe the cell fusion continuously within 24 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: The proliferation, viability and differentiation of periodontal ligament cells were gradually increased with the concentration increase of enamel matrix proteins (0–100 mg/L). When the concentration of enamel matrix proteins was 250 mg/L, these parameters began to decrease, but the levels were still higher than those in the 0 mg/L enamel matrix protein group. In the 100 mg/L group, the cells in the wound edge began to grow towards the center in the initial 6 hours, then became confluent at 12 hours, and until the 20th hour of culture, the cells in the two sides of the wound edge were completely fused to fully close the wound edge, indicating a better wound healing in the 100 mg/L group than the other groups. These findings suggest that enamel matrix proteins can stimulate proliferation, viability, differentiation and migration of periodontal ligament cells.

Subject headings: Periodontal Ligament; Extracellular Matrix Proteins; Cell Movement

Funding: the Start Fund for Returnees of Ministry of Human Resources and Social Security of China, No. 2011508; the Scientific Research Project in High Education of Liaoning Provincial Education Department, No. 2008027; the Science and Technology Project for People's Livelihood in Dalian, No. 2013E15SF169

Qu Z, Zhang JY, Guo Y, Ma WD, Ma L. Influence of different concentrations of enamel matrix proteins on bioactivity of human periodontal ligament cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(3):399-404.

0 引言 Introduction

在牙齿发育过程中, 伴随着牙冠发育即将完成时牙根逐渐开始发育, 内釉上皮细胞和外釉上皮细胞在颈环处增生, 向未来的根尖孔方向呈双层生长, 称为赫特维希上皮根鞘, 而由赫特维希上皮根鞘分泌的釉基质蛋白(enamel matrix protein, EMPs), 对牙骨质的形成和牙周附着的建立起着至关重要的作用^[1]。釉基质蛋白是一种可以调控牙齿矿化的细胞外基质蛋白, 其主要成分包括釉原蛋白、釉蛋白和釉丛蛋白等, 其中釉原蛋白约占90%, 是釉质基质蛋白中促进牙周再生的活性部分。成釉蛋白不仅仅与牙釉质矿化成熟过程密切相关, 而且是促进牙周组织再生的主要活性成分, 可以促进无细胞性牙骨质、牙周膜及牙槽骨的发育和再生^[2]。自从1997年商品化的釉基质蛋白及相应釉基质衍生物(商品名Emdogain[®], EMD)被广泛应用于口腔临床以来, 大量临床和基础实验证实釉基质蛋白是能够促进牙周组织和骨再生的细胞外基质蛋白^[3]。现今大量研究证实釉基质蛋白可促进成骨细胞和成牙骨质细胞的再生, 将其运用于牙周缺损治疗可达到接近生理性的牙周再生^[3]。

牙周膜细胞具有多向分化潜能, 是牙周组织再生的细胞基础, 大量临床和基础实验证明其可以分化成为成骨细胞和成牙骨质细胞, 因此被认为是牙周组织再生的关键细胞, 但对于釉基质蛋白促进牙周膜细胞再生和分化的机制还有待研究^[4]。本实验通过釉质基质蛋白作用于体外培养的人牙周膜成纤维细胞, 观察其对牙周膜成纤维细胞增殖、分化和细胞迁移的影响, 分析釉基质蛋白促进牙周组织生理性再生的机制, 为其在牙周组织工程构建中寻求理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2013年7至11月在大连市口腔医院实验中心完成。

材料: 牙周膜成纤维细胞从健康患者常规拔除阻生第

三磨牙的手术中获得。患者术前了解手术过程并签同意书, 实验研究通过大连市口腔医院伦理学委员会批准。

釉基质蛋白对人牙周膜细胞生物活性影响实验用主要试剂:

试剂	来源
釉基质蛋白及相应釉基质衍生物	商品名 Emdogain [®] , EMD, Malmoe, Scania, 瑞士
低糖 DMEM 培养基、胎牛血清	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
胶原酶、碱性磷酸酶试剂盒	Sigma, St. Louis, MO, 美国
MTT	Sigma, Deisenhofen, 德国
DAB 显色试剂盒	武汉博士德公司
BCA 检测试剂盒	PierceChemical Co., Rockford, 美国
OC 试剂盒	Biosource International, Camarillo, CA, USA

实验方法:

牙周膜成纤维细胞的获得和培养: 锐利刀片刮除牙根颈部1/3牙髓及牙周膜, 提取牙根其余部分牙周纤维组织培养于DMEM培养液中, 培养液含有体积分数10%胎牛血清、10 nmol地塞米松、50 mg/L维生素C和10 mmol β-磷酸甘油、50 mg/L链霉素和100 U/mL青霉素。每3 d更换1次培养基, 直到细胞融合为单层细胞。待细胞密集时常规消化传代, 过滤去除组织块。此后每2 d换液, 倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况, 待细胞融合达到80%左右后, 用含0.02% EDTA的0.25%胰酶消化, 传代培养。取第3代细胞用于实验研究。细胞为成纤维细胞形态, 经免疫细胞化学检测, 抗波形丝蛋白染色阳性, 抗角蛋白染色阴性, 证实其具有外胚间充质细胞特性。

实验分组: 将第3代人牙周膜成纤维细胞以一定的密度接种于96孔细胞培养板(或24孔培养板)中, 各孔内加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM 培养液至100 μL(或500 μL), 37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱内孵育4 h。待细胞完全黏附于培养皿底部, 更换含有不同质量浓度釉基质蛋白(12.5, 25, 50, 100, 250 mg/L)的无血清DMEM培养液100 μL(或500 μL)。每个浓度组设6个复孔, 以仅加入100 μL(或500 μL)无胎牛血清的DMEM培养液作为阴性对

照组。

细胞增殖检测: 将第3代人牙周膜成纤维细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于96孔细胞培养板中, 按实验分组干预。于37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱内培养24 h后, 每孔加入2.5 mCi/L [³H]-thymidine, 培育4 h。收获细胞并用闪烁计数器测定放射活性(Packard, Meriden, CT)^[5]。

MTT法检测细胞活性: 将第3代人牙周膜成纤维细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于96孔细胞培养板中, 按实验分组干预。于37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱内培养24 h后, 每孔加入5 g/L MTT 100 μL, 继续培养4 h后, 小心吸尽每孔内的液体, 每孔加入二甲基亚砜100 μL。振荡10 min后, 转移至酶联免疫检测仪, 于540 nm处读取各孔吸光度值(A), 以二甲基亚砜100 μL作为调零孔, 计算每组6个孔A值的均值, 进行统计学分析。

细胞碱性磷酸酶活性检测: 取第3代牙周膜成纤维细胞以 1×10^8 L⁻¹的细胞浓度接种于24孔细胞培养板中, 按实验分组干预。于37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱内培养48 h后, 移去培养液, 收获细胞。将细胞离心, 洗涤沉淀物, 加入200 μL细胞裂解液(含0.2% Triton X-100的PBS溶液), 4 °C下超声裂解细胞。用蛋白质检测BCA试剂盒测定细胞总蛋白含量。碱性磷酸酶活性测定是利用将无色的磷酸对硝基苯酯转换为着色的对硝基苯酚, 实验严格根据碱性磷酸酶测定试剂盒实验流程完成。颜色变化通过分光光度计在405 nm时测得, 量化细胞释放的酶, 并用同一个标准曲线进行比较。碱性磷酸酶水平被标准化处理为相对总蛋白含量^[7]。

细胞骨钙素分泌检测: 取第3代牙周膜成纤维细胞以 1×10^8 L⁻¹的细胞浓度接种于24孔细胞培养板中, 按实验分组干预。于37 °C、体积分数5%CO₂细胞培养箱内培养48 h后, 移去培养液备用。培养液中骨钙素分泌量通过商用骨钙素检测试剂盒完成, 实验采用酶联免疫测定法测得, 测量操作流程严格按照试剂盒说明书执行。该测量常用的灵敏度(0.4 μg/L)^[6]。

体外创伤模型的建立: 取第3代牙周膜成纤维细胞以 1×10^8 L⁻¹的细胞浓度接种于底面积2 mm²直径的4孔细胞培养皿中, 每48 h更换细胞培养液, 待细胞融合为单层时去除细胞培养液, 以移液管头将单层细胞制备出1 mm宽的细胞切口, 以PBS冲洗3次, 防止边缘细胞残留, 细胞放于具有细胞培养条件(37 °C、体积分数5%CO₂和体积分数95%空气的潮湿环境)的显微镜摄像系统中, 创伤区被每120 min拍摄一张照片^[7]。以含有不同质量浓度釉基质蛋白的无胎牛血清DMEM细胞培养液作为实验组, 以不含釉基质蛋白的无胎牛血清DMEM细胞培养液作为对照组。持续观察24 h待细胞完全融合, 重复3次。

主要观察指标: 不同质量浓度釉基质蛋白对人牙周膜细胞增生、分化和迁移的影响。

统计学分析: 全部实验重复3次, 得到相同结果。全部

数据采用平均值±标准误表述。对各实验数据用SPSS 14.0软件进行行单因素方差分析组间比较法, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 和0.01。

2 结果 Results

2.1 釉基质蛋白对人牙周膜细胞增殖的影响 通过³H-胸腺嘧啶核苷掺入法检测细胞DNA合成, 评估不同质量浓度釉基质蛋白对于牙周膜细胞增生的影响, 见图1。各实验组细胞DNA合成明显高于阴性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而且随着釉基质蛋白质量浓度从12.25 mg/L增加到100 mg/L, 细胞增殖明显提高; 釉基质蛋白质量浓度从100 mg/L到250 mg/L, 细胞增殖趋势有所降低。

2.2 釉基质蛋白对人牙周膜细胞活性的影响 通过MTT检测细胞活性及统计学处理, 不同质量浓度釉基质蛋白对牙周膜细胞活性的影响, 见图2。各实验组细胞的细胞活性明显高于阴性对照组($P < 0.01$), 而且随着釉基质蛋白质量浓度从12.25 mg/L增加到100 mg/L, 细胞活性明显提高; 釉基质蛋白质量浓度从100 mg/L到250 mg/L, 细胞活性增长趋势有所降低。

2.3 细胞碱性磷酸酶活性检测 通过检测细胞碱性磷酸酶活性及统计学处理, 评估不同质量浓度釉基质蛋白对牙周膜细胞碱性磷酸酶活性的影响, 见图3。除12.25 mg/L实验组外, 其余各实验组细胞活性明显高于阴性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而且随着釉基质蛋白质量浓度从12.25 mg/L增加到100 mg/L, 细胞碱性磷酸酶活性明显提高; 釉基质蛋白质量浓度从100 mg/L到250 mg/L, 细胞碱性磷酸酶活性趋势有所降低。

2.4 细胞骨钙素分泌 通过检测细胞骨钙素分泌及统计学处理, 评估不同质量浓度釉基质蛋白对人牙周膜细胞骨钙素分泌的影响, 见图4。各实验组细胞细胞活性明显高于阴性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而且随着釉基质蛋白质量浓度从12.25 mg/L增加到100 mg/L, 细胞骨钙素分泌明显提高; 釉基质蛋白质量浓度从100 mg/L到250 mg/L, 细胞骨钙素分泌趋势有所降低。

2.5 体外细胞创伤模型 在初始观察6 h时, 25, 50, 100 mg/L釉基质蛋白实验组创缘周围的细胞开始向中心生长(图5A), 而其他组没有细胞迁移生长; 在观察8 h后, 12.5 mg/L釉基质蛋白实验组和对照组创缘周围的细胞开始向中心生长, 250 mg/L釉基质蛋白实验组直到培养10 h后才有创缘周围的细胞开始向中心生长; 在培养8-14 h中, 细胞逐渐向创缘中心生长(图5B-D); 待培养12 h时, 100 mg/L釉基质蛋白实验组创缘两侧细胞开始融合(图5E), 而25, 50 mg/L釉基质蛋白实验组14 h后创缘两侧细胞开始融合, 12.5 mg/L釉基质蛋白实验组16 h后创缘两侧细胞开始融合, 对照组在培养18 h后创缘两侧细胞开始融合; 培养20 h后, 25, 50, 100 mg/L釉基质蛋白实验组创缘两侧细胞融合完全, 创缘完全关闭(图5F); 12.5 mg/L釉

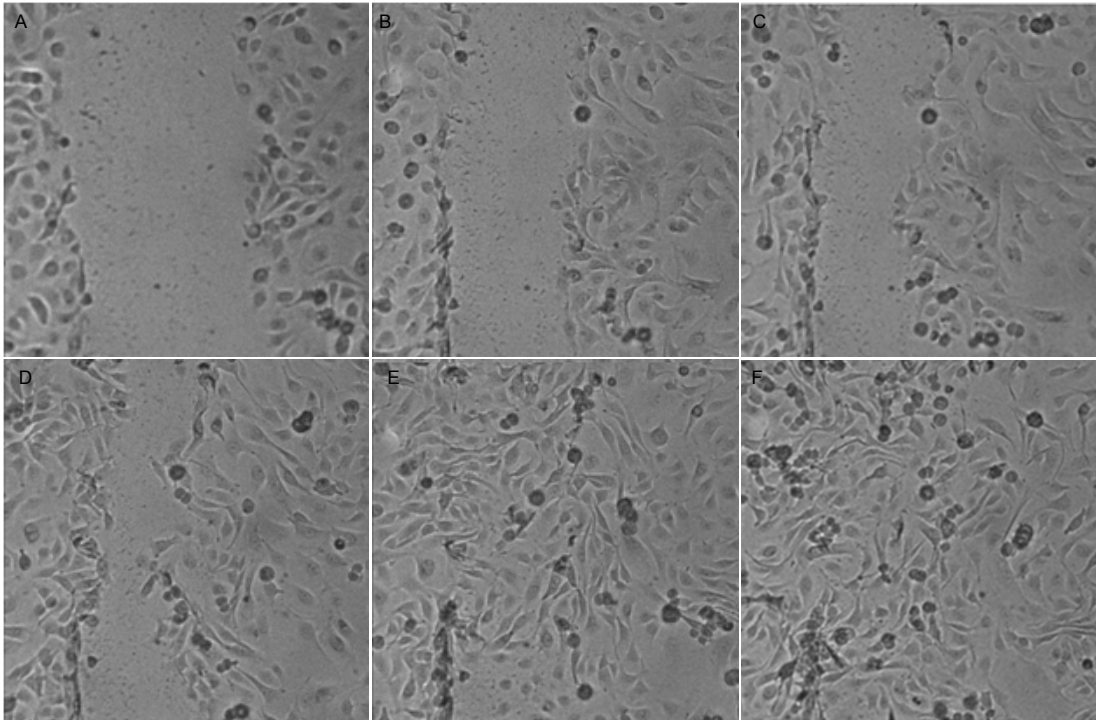


图5 体外创伤模型观察 100 mg/L 釉基质蛋白对人牙周膜细胞迁移的影响

Figure 5 Effect of 100 mg/L enamel matrix proteins on migration of human periodontal ligament cells based on an *in vitro* monolayer wound healing model

图注: 图中 A 为培养 6 h 后, 创伤周围细胞开始迁移; B-D 为培养 6-12 h 内, 创伤周围细胞开始迁移, 逐渐关闭窗口; E 为培养 12 h 后, 愈合开始; F 为培养 20 h 后, 创口关闭。

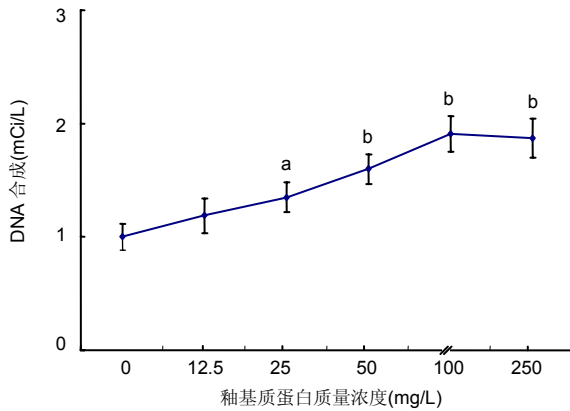


图1 不同质量浓度釉基质蛋白诱导 24 h 后对人牙周膜细胞增生的影响

Figure 1 Effect of different concentrations of enamel matrix proteins on proliferation of human periodontal ligament cells after a 24-hour stimulation

图注: 与 0 mg/L 比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

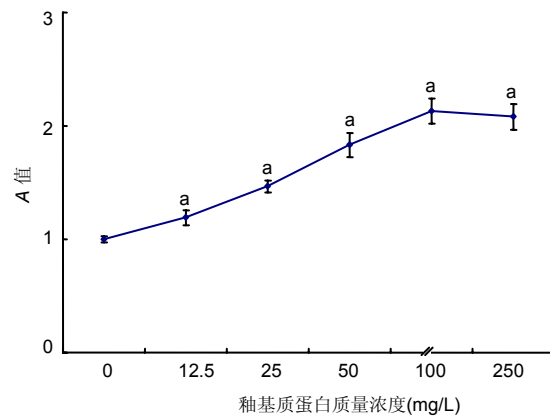


图2 不同质量浓度釉基质蛋白诱导 24 h 后对人牙周膜细胞细胞活性的影响

Figure 2 Effect of different concentrations of enamel matrix proteins on viability of periodontal ligament cells after a 24-hour stimulation

图注: 与 0 mg/L 比较, ^a $P < 0.01$ 。

基质蛋白实验组创缘两侧细胞融合完全, 直到24 h对照组和 250 mg/L 釉基质蛋白实验组仍未出现细胞融合完全。

3 讨论 Discussion

牙周病现今已经成为口腔最常见的疾病之一, 是侵犯牙龈、牙周韧带和牙槽骨的慢性感染性疾病。牙周病的早期预防和早期治疗极其重要, 即牙周病治疗的最终目的不仅在于消除致病因素, 从而终止疾病发展, 更在于恢复已

经破坏的牙槽骨、牙周膜和牙骨质的结构和功能, 重建牙周新附着。

釉基质蛋白是在牙根发育形成过程中由赫特维希上皮根鞘的内层成釉细胞合成和表达分泌的, 可以诱导牙乳头细胞分化成牙本质细胞, 形成根部的牙本质, 从而决定牙根的形态。Filippi等^[8]研究表明, 釉基质蛋白不仅可以诱导与根部牙本质紧密附着无细胞性牙骨质的形成, 还可以诱导牙周间充质干细胞分化, 而且可以促进牙周韧带细胞和

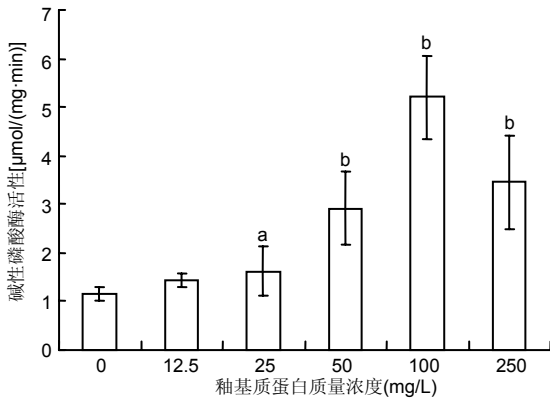


图3 不同质量浓度釉基质蛋白诱导48 h后对人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性的影响

Figure 3 Effect of different concentrations of enamel matrix proteins on alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells after a 48-hour stimulation

图注: 与0 mg/L比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

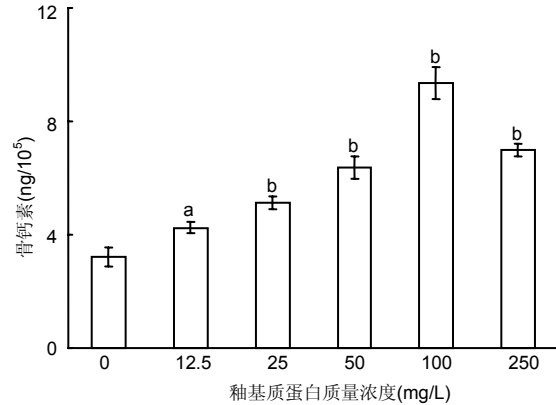


图4 不同质量浓度釉基质蛋白诱导48 h后对人牙周膜细胞骨钙素分泌的影响

Figure 4 Effect of different concentrations of enamel matrix proteins on osteocalcin production in human periodontal ligament cells after a 48-hour stimulation

图注: 与0 mg/L比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

牙槽骨细胞的再生, 这种再生类似正常组织的发育过程^[9]。大量体内研究证明釉基质蛋白可以促进牙周组织再生^[10], Miron等^[10]通过观察骨质疏松症动物的牙周缺损修复过程, 提出釉基质蛋白可以促进患有骨质疏松症患者牙周组织的再生; Ninomiya等^[11]通过观察1例阻生第二前磨牙自体移植的病例, 釉基质蛋白在牙移植过程中被应用于移植牙牙根周围, 移植3个月后X射线显示移植牙周围有新骨形成; 6个月后移植牙牙根继续发育, 并且牙根周围出现带状牙周膜样透光影, 因此推测釉基质蛋白具有促进移植牙牙根发育和防止骨粘连的作用, 可促进自体移植牙的牙周愈合。有临床研究使用釉基质蛋白治疗21例牙周病患者牙周骨下袋, 证明其可促进牙周组织再生, 即牙骨质、牙周膜和牙槽骨的再生, 降低探诊骨下袋深度, 重建牙周附着, 且牙周治疗之后改善的临床指标和疗效可维持10年以上, 使骨下袋患牙的保留成为可能^[12]。牙周病治疗的最终目的是重建牙周组织的三维关系, 获得牙槽骨、牙骨质和牙周膜的再生, 进而形成新附着^[13-16]。

釉基质蛋白对与牙周组织再生相关的牙周膜细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞和骨髓间充质干细胞有不同的作用, 进而可促进牙周组织再生^[17-19]。釉基质蛋白对体外培养人骨髓间充质干细胞的黏附性和伸展率无影响, 但可明显促进其增殖和分化, 可以增加人骨髓间充质干细胞DNA含量, 具有促进骨髓间充质干细胞早期DNA合成, 使细胞从G₀/G₁期进入S期的作用, 从而促进细胞增殖^[20-22]。釉基质蛋白可上调牙周膜成纤维细胞骨涎蛋白、骨桥蛋白、骨粘连蛋白的分泌, 而且随着时间的延长促进作用越来越明显, 并且能诱导细胞表达牙骨质附着蛋白, 并且在一定浓度下使牙周膜细胞向成骨细胞分化^[23-24]。

本实验通过观察不同质量浓度釉基质蛋白对人牙周膜细胞增殖和细胞活性的影响, 发现低质量浓度釉基质蛋白可以促进牙周膜细胞的增殖和细胞活性, 以100 mg/L质量

浓度为界, 当釉基质蛋白质量浓度高于100 mg/L时, 细胞增殖和细胞活性有所下降。釉基质蛋白可以促进牙周膜细胞的增殖、蛋白合成及矿化相关蛋白骨涎蛋白和骨桥蛋白的表达, 促进牙周组织的再生^[25-26]。碱性磷酸酶和骨钙素的表达是成骨细胞分化的主要标志^[27]。通过观察不同质量浓度釉基质蛋白对人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌的影响, 发现低质量浓度釉基质蛋白可以促进牙周膜细胞的碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌, 以100 mg/L质量浓度为界, 当釉基质蛋白质量浓度高于100 mg/L时, 细胞碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌有所下降。牙周膜细胞迁移到牙周创面参与牙周再生的机制尚不清楚, 牙周细胞体外创伤模型是体外构建模拟牙周创伤环境的实验模型, 近年来未被用于探讨牙周组织的愈合机制。利用牙周细胞体外创伤愈合模型, 对牙周组织细胞在创面愈合过程中的迁徙和增殖行为进行观察, 进而了解牙周愈合再生规律^[28-30]。本实验通过观察不同质量浓度釉基质蛋白(12.5, 25, 50, 100, 250 mg/L)对人牙周膜细胞迁移的影响, 发现100 mg/L釉基质蛋白实验组细胞在初始观察6 h时创缘周围的细胞开始向中心生长, 待培养12 h时创缘两侧细胞开始融合, 细胞培养20 h后创缘两侧细胞融合完全, 创缘完全关闭, 优于其他质量浓度实验组和对照组。

本实验为釉基质蛋白应用于牙周病治疗提供了一定的理论依据, 但其应用于牙周病学的临床机制还需深入的研究。

致谢: 感谢维也纳医科大学牙学院中心实验室对于本实验设计的指导和帮助。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第二、三作者, 实验评估为第五作者, 资料收集与成文为第一作者, 第四作者审核, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 牙周膜成纤维细胞从健康患者常规拔除阻生第三磨牙手术中获得。患者术前了解手术过程并签同意书, 实验研究通过大连市口腔医院伦理学委员会批准。

学术术语: 釉基质蛋白-是在牙齿发育过程中釉质形成时成釉细胞分泌的一种至关重要的蛋白质, 是一种可以调控牙齿矿化的细胞外基质蛋白, 其主要成分包括釉原蛋白、釉蛋白和釉丛蛋白等。其中釉原蛋白约占90%, 是釉基质蛋白中促进牙周再生的活性部分。成釉蛋白不仅仅与牙釉质矿化成熟过程密切相关, 而且是促进牙周组织再生的主要活性成分, 可以促进无细胞性牙骨质、牙周膜及牙槽骨的发育和再生, 进而形成牙周组织的新附着, 对于牙周骨缺损的治疗有显著效果。

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] 蒋少云, 束蓉. 釉基质蛋白促进牙周组织再生机制的研究进展[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2008, 17(9):535-538.
- [2] 邹慧儒, 秦宗长, 张兰成. 釉基质蛋白各组成成分及其作用[J]. 国际口腔医学杂志, 2013, 40(3):355-258.
- [3] Qu Z, Laky M, Ulm C, et al. Effect of Emdogain on proliferation and migration of different periodontal tissue-associated cells[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109(6):924-931.
- [4] DiPietro LA. Oral Stem Cells: The Fountain of Youth for Epithelialization and Wound Therapy? Adv Wound Care(New Rochelle). 2014;3(7):465-467.
- [5] Rodionova NV. The dynamics of proliferation and differentiation of osteogenic cells under supportive unloading. Tsitol Genet. 2011;45(2):22-27.
- [6] Rausch-fan X, Qu Z, Wieland M, et al. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. Dent Mater. 2008;24(1):102-110.
- [7] Bertl K, An N, Bruckmann C, et al. Effects of enamel matrix derivative on proliferation/viability, migration, and expression of angiogenic factor and adhesion molecules in endothelial cells in vitro. J Periodontol. 2009;80(10):1622-1630.
- [8] Filippi A, Pohl Y, von Arx T. Treatment of replacement resorption by intentional replantation, resection of the ankylosed sites, and Emdogain--results of a 6-year survey. Dent Traumatol. 2006;22(6):307-311.
- [9] 侯小丽, 吴织芬, 万玲, 等. 釉基质蛋白对骨髓基质细胞分泌TGF- β 1的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(4):194-196.
- [10] Miron RJ, Wei L, Yang S, et al. Effect of an Enamel Matrix Derivative on Periodontal Wound Healing/Regeneration in an Osteoporotic Model. J Periodontol. 2014;26(3):1-12.
- [11] Ninomiya M, Kamata N, Fujimoto R, et al. Application of enamel matrix derivative in autotransplantation of an impacted maxillary premolar: a case report. J Periodontol. 2002;73(3):346-351.
- [12] Döri F, Arweiler NB, Szántó E, et al. Ten-year results following treatment of intrabony defects with an enamel matrix protein derivative combined with either a natural bone mineral or a β -tricalcium phosphate. J Periodontol. 2013;84(6):749-757.
- [13] 项陈洋, 张凌琳, 李伟. 釉基质蛋白在口腔医学领域中的应用进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2012, 39(6):766-769.
- [14] Obregon-Whittle MV, Stunes AK, Almqvist S, et al. Enamel matrix derivative stimulates expression and secretion of resistin in mesenchymal cells. Eur J Oral Sci. 2011;119 Suppl 1:366-372.
- [15] Grandin HM, Gemperli AC, Dard M. Enamel matrix derivative: a review of cellular effects in vitro and a model of molecular arrangement and functioning. Tissue Eng Part B Rev. 2012;18(3):181-202.
- [16] Matsumoto N, Minakami M, Hatakeyama J, et al. Histologic Evaluation of the Effects of Emdogain Gel on Injured Root Apex in Rats. J Endod. 2014;40(12):1989-1994.
- [17] Ferreira MM, Filomena BM, Lina C, et al. The effect of Emdogain gel on periodontal regeneration in autogenous transplanted dog's teeth. Indian J Dent Res. 2014;25(5):589-593.
- [18] Izumi Y, Aoki A, Yamada Y, et al. Current and future periodontal tissue engineering. Periodontol 2000. 2011;56(1):166-187.
- [19] 宋忠臣, 束蓉, 宋爱梅, 等. 釉基质蛋白对人骨髓基质细胞生长和黏附的影响[J]. 上海口腔医学, 2006, 15(6):601-604.
- [20] 宋忠臣, 束蓉, 谢玉峰. 釉基质蛋白对人骨髓基质细胞增殖和矿化的影响[J]. 上海口腔医学, 2008, 24(6):831-834.
- [21] won YD, Choi HJ, Lee H, et al. Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). J Adv Prosthodont. 2014;6(5):406-414.
- [22] de Oliveira MT, Bentregani LG, Pasternak B, et al. Histometric study of resorption on replanted teeth with enamel matrix-derived protein. J Contemp Dent Pract. 2013;14(3):468-472.
- [23] Jabbari E. Osteogenic peptides in bone regeneration(R). Curr Pharm Des. 2013;19(19):3391-402.
- [24] Amin HD, Olsen I, Knowles JC, et al. Effects of enamel matrix proteins on multi-lineage differentiation of periodontal ligament cells in vitro. Acta Biomater. 2013;9(1):4796-4805.
- [25] Wada Y, Mizuno M, Nodasaka Y, et al. The effect of enamel matrix derivative on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblasts cultured on zirconia. Int J Oral Maxillofac Implants. 2012;27(4):849-858.
- [26] 张凤秋, 孟焕新, 韩劫, 等. 釉基质蛋白对人牙周膜细胞生物学影响的体外研究[J]. 北京大学学报:医学版, 2012, 44(1):6-10.
- [27] 刘兰宁, 刘宏伟, 金岩, 等. 釉基质蛋白对牙周膜成纤维细胞合成蛋白的影响[J]. 中国临床康复, 2005, 9(30):104-106.
- [28] 李玲, 王茜. 3种根尖倒充填材料对体外人牙周韧带细胞创伤模型创面愈合的影响[J]. 上海口腔医学, 2011, 20(1):41-45.
- [29] Yan XZ, Rathe F, Gilissen C, et al. The effect of enamel matrix derivative (Emdogain®) on gene expression profiles of human primary alveolar bone cells. J Tissue Eng Regen Med. 2014;8(6):463-472.
- [30] Miron RJ, Bosshardt DD, Zhang Y, et al. Gene array of primary human osteoblasts exposed to enamel matrix derivative in combination with a natural bone mineral. Clin Oral Investig. 2013;17(2):405-410.