

左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料与牙周膜细胞的生物相容性

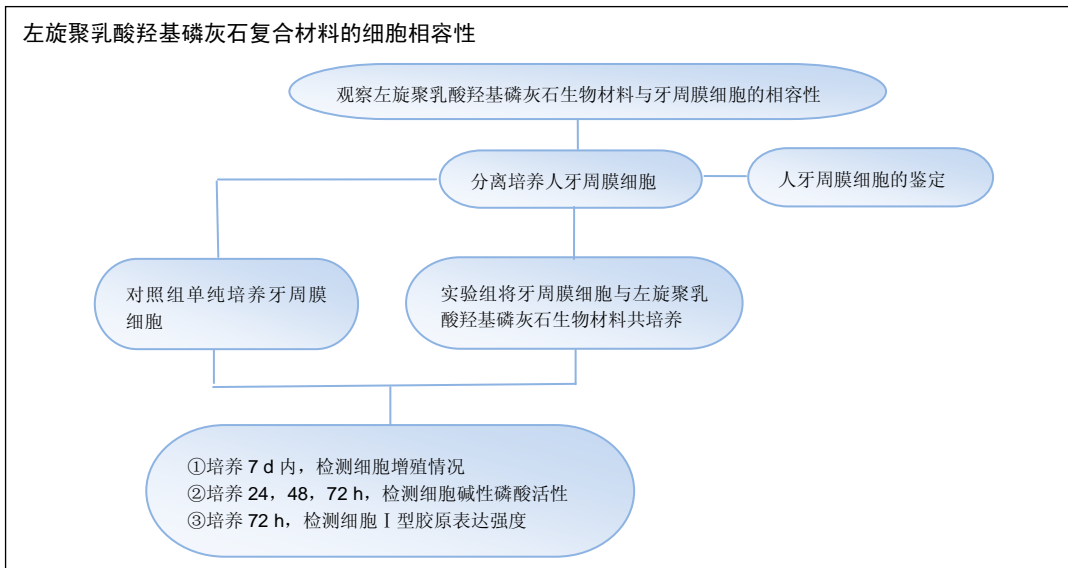
赵宁, 张现军, 李伟, 董新新(许昌市中心医院口腔科, 河南省许昌市 461000)

引用本文: 赵宁, 张现军, 李伟, 董新新. 左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料与牙周膜细胞的生物相容性[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(12):1732-1737.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.12.009

ORCID: 0000-0003-1432-3081(赵宁)

文章快速阅读:



赵宁, 女, 1976 年生, 河南省临颍县人, 副主任医师, 主要从事口腔颌面外科研究。

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)12-01732-06

稿件接受: 2015-12-30

http://www.crter.org

文题释义:

羟基磷灰石: 又称羟基磷灰石, 碱式磷酸钙, 是钙磷灰石的自然矿物化, 是脊椎动物骨骼和牙齿的主要无机组成成分, 人的牙釉质中羟基磷灰石的含量约 96%, 骨中约占 69%。羟基磷灰石具有优良的生物相容性和生物活性, 可作为一种骨骼或牙齿的诱导因子, 在口腔保健领域中对牙齿具有较好的再矿化、脱敏美白作用。但羟基磷灰石材料质地较脆, 机械性能较差, 在塑型方面存在一定的限制且降解速度较慢。

聚乳酸: 聚乳酸由乳酸单体聚合而成, 有 3 种结构形式, 左旋聚乳酸、右旋聚乳酸及两种结构的混合物。左旋聚乳酸是一种半结晶体, 有一定的硬度, 降解速度要快于右旋聚乳酸。但聚乳酸材料本身具有一定的缺陷, 其机械强度较低且降解产物呈酸性, 易引起体内炎症反应。

摘要

背景: 将羟基磷灰石与左旋聚乳酸复合, 可以很好地改善羟基磷灰石质地脆、机械性能差等不足。

目的: 进一步观察左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料与牙周膜细胞的相容性。

方法: 将细胞浓度为 $5 \times 10^9 L^{-1}$ 的第 4 代人牙周膜细胞与左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料复合培养, 设为实验组, 设置单纯牙周膜细胞培养作为对照组。培养 7 d 内检测两组细胞增殖情况; 培养 24, 48, 72 h, 检测细胞碱性磷酸活性; 培养 72 h, 检测细胞 I 型胶原表达强度。

结果与结论: ①细胞增殖检测结果: 两组培养 1-7 d 的吸光度值比较差异无显著性意义。②细胞碱性磷酸活性检测结果: 两组组内培养 48, 72 h 的碱性磷酸酶活性均高于培养 24 h ($P < 0.05$), 但两组间不同时间点碱性磷酸酶活性比较差异均无显著性意义。③细胞 I 型胶原表达检测结果: 两组 I 型胶原表达强度比较差异无显著性意义。④结果表明, 左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料具有良好的细胞相容性。

关键词:

生物材料; 材料相容性; 左旋聚乳酸; 羟基磷灰石; 支架材料; 牙周组织; 种子细胞; 人牙周膜细胞; 生物相容性

主题词:

硬羟基磷灰石; 牙周组织; 组织工程

Zhao Ning, Associate chief physician, Department of Stomatology, Xuchang Central Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China

Biocompatibility of poly-L-lactic acid/hydroxyapatite biomaterial with periodontal ligament cells

Zhao Ning, Zhang Xian-jun, Li Wei, Dong Xin-xin (Department of Stomatology, Xuchang Central Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Hydroxyapatite/poly-L-lactic acid composite can well improve the brittleness and mechanical properties of the hydroxyapatite.

OBJECTIVE: To study the biocompatibility of hydroxyapatite/poly-L-lactic acid composite biomaterials with periodontal ligament cells.

METHODS: Passage 4 human periodontal ligament cells at a density of $5 \times 10^9/L$ were cultured with hydroxyapatite/poly-L-lactic acid composite as experimental group, and human periodontal ligament cells cultured alone as control group. Cell proliferation was detected within 7 days of culture; alkaline phosphatase activity was detected at 24, 48 and 72 hours of culture; and type I collagen expression was detected at 72 hours of culture.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no significant difference in the absorbance value of cells between the two groups at 1-7 days of culture. The alkaline phosphatase activity of cells at 48 and 72 hours was significantly higher than that at 24 hours ($P < 0.05$) in the two groups, but there was no difference between the two groups. The expression of type I collagen had no difference between the two groups. These findings indicate that the hydroxyapatite/poly-L-lactic acid composite biomaterial has good cell compatibility.

Subject headings: Durapatite; Periodontium; Tissue Engineering

Cite this article: Zhao N, Zhang XJ, Li W, Dong XX. Biocompatibility of poly-L-lactic acid/hydroxyapatite biomaterial with periodontal ligament cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(12):1732-1737.

0 引言 Introduction

牙周病常伴随牙周组织受损情况^[1], 传统治疗方式大多无法获得理想的效果, 而通过组织工程学方式则可以很好地进行牙周组织再生。在牙周组织工程学构建过程中, 需要用到种子细胞和支架材料^[2]。牙周膜细胞是牙周膜的主要功能细胞, 其中包含未分化的间充质干细胞, 可以向牙骨质、牙槽骨等分化。所以牙周膜细胞与牙周组织健康有直接的关系, 尤其在牙周膜和牙槽骨的改建过程中起重要作用。人牙周膜细胞生物学性能稳定且具有一定的分化潜能, 可作为一种理想的种子细胞。天然聚合物材料如胶原、透明质酸是组织工程较好的候选材料, 能引起细胞的黏附和趋化反应, 具有良好的生物相容性, 已被广泛应用于修复神经、皮肤、软骨和骨缺损等。聚乳酸是目前应用较广泛的组织工程骨支架材料, 组织相容性好, 对机体无毒副作用, 在体内的降解产物是乳酸, 通过三羧酸循环从体内代谢排出^[3]。聚乳酸由乳酸单体聚合而成, 有3种结构形式, 左旋聚乳酸、右旋聚乳酸及两种结构的混合物。左旋聚乳酸是一种半结晶体, 有一定的硬度, 降解速度要快于右旋聚乳酸。但聚乳酸材料本身具有一定的缺陷, 其机械强度较低且降解产物呈酸性, 易引起体内炎症反应。

羟基磷灰石是脊椎动物骨骼和牙齿的主要无机成

分, 具有优良的生物相容性, 在生物医学领域具有广泛的用途, 脊椎动物的牙釉质是由高度有序羟基磷灰石晶体组成的。羟基磷灰石具有良好的生物活性和生物相容性, 已被用于填充骨缺损, 或者被覆于金属表面, 以提高移植物与宿主之间的骨整合^[4]。但羟基磷灰石存在机械性能不理想、韧性差的问题。将羟基磷灰石与左旋聚乳酸进行复合, 可有效改善聚乳酸的性能, 获得理想的支架材料。研究报道, 电纺左旋聚乳酸和左旋聚乳酸羟基磷灰石纳米纤维材料生物相容性良好, 但左旋聚乳酸羟基磷灰石较单纯左旋聚乳酸能够更好地促进细胞增殖^[5]。本次实验对人牙周膜细胞机械能体外分离与培养, 并与左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料进行复合培养, 观察细胞增殖情况及碱性磷酸酶活性变化等, 以探讨左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料的生物相容性及其应用于牙周组织再生的可能性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2015年8至10月在许昌市中心医院实验室完成。

1.3 材料 从许昌市中心医院牙科获得因正畸拔除的废弃健康双尖牙, 供者年龄10-15岁。左旋聚乳酸羟基

磷灰石生物材料由四川大学生物材料工程研究中心提供。

1.4 实验方法

人牙周膜细胞的分离与培养: 将双尖牙放入含青霉素、链霉素的 α -MEM培养液(北京欣兴唐生物科技有限公司)中, 在超净工作台上刮取牙根中1/3牙周膜, 并添加含胎牛血清(广州市安杰生物技术有限公司)的 α -MEM培养液, 置于二氧化碳培养箱中进行原代培养。观察细胞情况, 待从组织块中游离出较多的细胞之后, 添加胰蛋白酶(上海玉博生物科技有限公司)进行消化并进行传代培养, 观察细胞生长情况, 取4-6代细胞进行后续实验。

人牙周膜细胞的鉴定: 将第4代人牙周膜细胞接种在盖玻片上, 置于培养板中, 添加含胎牛血清的 α -MEM培养液, 置于二氧化碳培养箱中进行培养。48 h之后取出盖玻片, 利用预冷PBS进行洗涤, 吹干之后利用丙酮溶液进行固定、吹干。利用抗角蛋白和抗人波形蛋白试剂盒(上海抚生生物科技发展有限公司)进行细胞鉴定, 严格按照试剂盒说明书操作。利用碱性磷酸酶染色试剂盒(上海源培生物科技股份有限公司)进行细胞固定和碱性磷酸酶染色, 苏木精复染后树脂封固, 于光镜(南京凯基生物科技发展有限公司)下观察胞质着色情况。

左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料与牙周膜细胞共培养: 将左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料修剪成与24孔培养板单孔直径相同的大小, 消毒后添加 α -MEM培养液。胰酶消化第4代人牙周膜细胞后, 制备单细胞悬液, 细胞浓度为 $5 \times 10^9 L^{-1}$, 均匀接种于左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料上, 100 μ L/块, 设为实验组, 以单纯添加相同人牙周膜细胞的为对照组。

1.5 主要观察指标

细胞增殖检测: 连续共培养7 d, 每天进行MTT法检测, 利用酶标仪(北京构斯特科技发展有限公司)检测两组在490 nm波长的平均吸光度(A)。

碱性磷酸酶活性检测: 共培养24, 48, 72 h后, 去掉细胞上清, 利用碱性磷酸酶试剂盒进行碱性磷酸酶活

性检测, 以酶联免疫检测仪检测两组在490 nm波长下的吸光度值(A)。

I型胶原表达检测: 共培养后72 h, 收集两组细胞, 磷酸盐缓冲液洗涤, 多聚甲醛固定, 添加胎牛血清蛋白封闭液, 滴加I型胶原抗体, 置于冰箱内过夜, 室温下复温后, 滴加二抗生物素化兔抗大鼠IgG, 反应后添加SABC复合物, 作用后添加DAB显色, 逐级脱水, 二甲苯透明, 封固后置于光镜下进行观察, 胶原表达强度值为阳性表达颗粒占整个胞浆的比例。

1.6 统计学分析 对研究过程中获得的数据进行收集和统计学处理, 利用SPSS 19.0软件完成数据处理。计量资料均予以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并予以 t 检验。计算 P 值, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人牙周膜细胞培养结果 原代培养3 d, 可观察到细胞从组织块中游出, 见图1A; 培养7 d, 人牙周膜细胞呈长梭形, 细胞核呈现出圆形或卵圆形, 胞质丰满、核仁明显, 见图1B; 经传代培养, P2细胞呈条梭形, 见图1C。

2.2 人牙周膜细胞鉴定结果 经免疫组织化学染色和观察, 发现细胞波形蛋白呈阳性表达, 抗角蛋白染色阴性, 碱性磷酸酶染色阳性, 提示实验所得细胞为人牙周膜细胞, 见图2。

2.3 人牙周膜细胞在左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料上的增殖情况 培养1-7 d, 两组吸光度值比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。两组人牙周膜细胞生长曲线基本一致, 见图3。

2.4 复合培养对人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性的影响 培养24, 48, 72 h, 两组细胞碱性磷酸酶活性比较差异无显著性意义(P 均 > 0.05), 见表2。

2.5 复合培养对人牙周膜细胞I型胶原表达的影响 对照组和实验组的I型胶原表达强度分别为(40.12 \pm 1.12)%和(40.11 \pm 1.05)%, 组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图4。

表1 人牙周膜细胞在左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料上的增殖 ($\bar{x} \pm s$, A)

Table 1 Proliferation of human periodontal ligament cells cultured on the poly-L-lactic acid/hydroxyapatite biomaterial at different time

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
对照组	0.161 \pm 0.011	0.285 \pm 0.015	0.512 \pm 0.025	0.514 \pm 0.047	0.516 \pm 0.058	0.685 \pm 0.062	1.014 \pm 0.085
观察组	0.160 \pm 0.010	0.284 \pm 0.013	0.488 \pm 0.023	0.510 \pm 0.043	0.510 \pm 0.057	0.681 \pm 0.059	1.012 \pm 0.082
P	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

表 2 两组不同培养时间碱性磷酸酶活性水平 ($\bar{x} \pm s, A$)
Table 2 Alkaline phosphatase activity in the two groups at different time

组别	培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h
对照组	0.285±0.015	0.451±0.028	0.841±0.034
实验组	0.384±0.016	0.455±0.027	0.839±0.041
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05	> 0.05

3 讨论 Discussion

临床多种牙科疾病会出现牙周组织损伤情况, 导致牙齿松动和脱落等^[6]。临床治疗过程中, 需要采取有效措施实现牙周组织的再生。随着临床医学的不断发展, 组织工程学原理和技术开始被应用于牙周组织再生之中^[7-10]。在牙周组织工程学中, 需要使用一定的种子细胞和支架材料^[11]。

牙周组织中的牙周膜细胞是十分重要的细胞之一, 具有一定的分化潜能且生物学性能稳定, 在牙周组织再生过程中发挥重要的作用, 是一种理想的种子细胞^[12-15]。波形蛋白是一种常用的牙周膜细胞标志物^[16], 在本次实验过程中, 对于分离培养的细胞进行免疫组织化学染色和观察, 发现波形蛋白呈阳性表达, 即表明实验所得细胞为人牙周膜细胞, 可用于之后的实验分析。

在组织工程支架方面, 羟基磷灰石是一种常用的支架材料, 具有良好的生物活性, 被广泛应用于不同类型骨缺损的修复治疗之中^[17-20]。但羟基磷灰石材料质地较脆, 机械性能较差, 在塑型方面存在一定的限制且降解速度较慢。

聚乳酸也是一种应用十分广泛的支架材料, 具有良好的组织相容性好, 在进入体内之后, 可以随着时间的推移逐渐发生降解, 分解为乳酸, 经人体代谢排出体外^[21-22]。聚乳酸由乳酸单体聚合而成, 其中左旋聚乳酸是一种重要的类型, 属于半结晶体, 具备一定的机械强度^[23]。因此, 将羟基磷灰石与左旋聚乳酸进行复合, 可以很好地改善羟基磷灰石的性能, 获得更加理想的支架材料^[24-27]。

此次实验过程中, 即选择羟基磷灰石与左旋聚乳酸复合材料为支架材料, 人牙周膜细胞为种子细胞, 进行牙周组织工程构建。实验过程中, 成功在体外环境下分离并培养人牙周膜细胞。为了对羟基磷灰石与左旋聚乳酸复合材料的生物相容性及其在牙周组织工程方面的应用可能性进行分析, 在实验过程中, 对人牙周膜细胞与左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料进行复合培养, 设为

实验组, 并以无生物材料孔, 仅含有相同人牙周膜细胞作为对照组, 利用 MTT 法对复合生物材料的细胞毒性进行了检测。通过检测发现, 1-7 d 两组的吸光度值经比较差异均无显著性意义, 两组人牙周膜细胞生长曲线基本一致。

上述结果表明, 左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料与牙周膜细胞进行复合培养之后不会对细胞活性产生影响, 左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料具有良好的生物相容性。实验过程中选择将人牙周膜细胞和相应的生物支架材料进行直接接触复合培养, 以更好地对材料的骨诱导分化能力进行评估^[28-32]。

在人体牙齿等硬组织的形成和再生过程中, 碱性磷酸酶是一种重要酶, 是前体细胞向骨化亚群细胞及骨组织进行转化的前提^[33]。牙周膜细胞可分泌碱性磷酸酶, 其碱性磷酸酶活性水平与牙骨质细胞分化之间存在十分密切的联系^[34-37]。

通过对细胞碱性磷酸酶活性水平的检测, 也可以较好地了解到所使用生物支架材料的骨诱导能力^[38]。本次实验过程中, 人牙周膜细胞与左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料进行复合培养, 对细胞碱性磷酸酶活性水平无影响。I 型胶原的主要功能是作为生物矿化过程中的支架, 同时赋予组织张力, 为牙周组织的主要支持结构。对照组和实验组的 I 型胶原表达强度分别为(40.12±1.12)%和(40.11±1.05)%, 无统计学差异。上述结果表明, 左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料具有骨诱导活性, 可以促进牙周膜细胞的分化。

作者贡献: 第一作者负责设计和实施, 第二、三作者负责实施及文章的修改。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 本次研究相关方案均提交本院医学伦理部门审核并经批准, 符合相关伦理学要求。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 本刊实行双盲外审制度, 文章经国内小同行外审专家审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

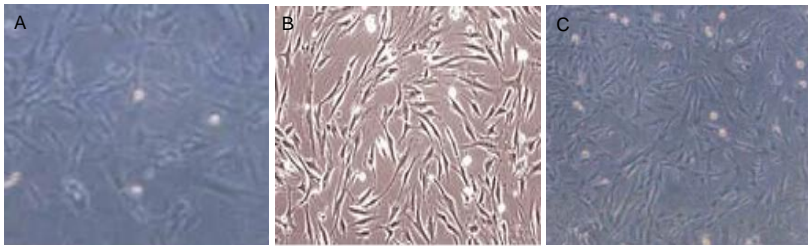


图1 人牙周膜细胞培养结果(x200)

Figure 1 Human periodontal ligament cell culture (x200)

图注: 图中 A 为原代培养 3 d, 细胞从组织块中游离; B 为原代培养 7 d, 细胞呈长梭形; C 为传代培养, P2 细胞呈梭形。

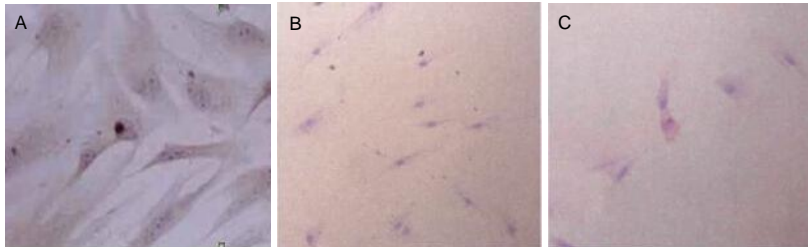


图2 人牙周膜细胞的鉴定(免疫组织化学染色, x200)

Figure 2 Identification of human periodontal ligament cells (immunohistochemical staining, x200)

图注: 图中 A 显示波形蛋白呈阳性表达; B 显示抗角蛋白染色阴性; C 显示碱性磷酸酶染色阳性。

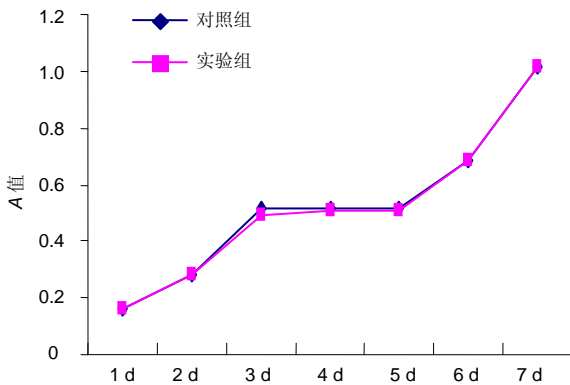


图3 人牙周膜细胞在左旋聚乳酸羟基磷灰石生物材料上的生长曲线

Figure 3 Growth curve of human periodontal ligament cells on the poly-L-lactic acid/hydroxyapatite biomaterial

图注: 两组人牙周膜细胞生长曲线基本一致。

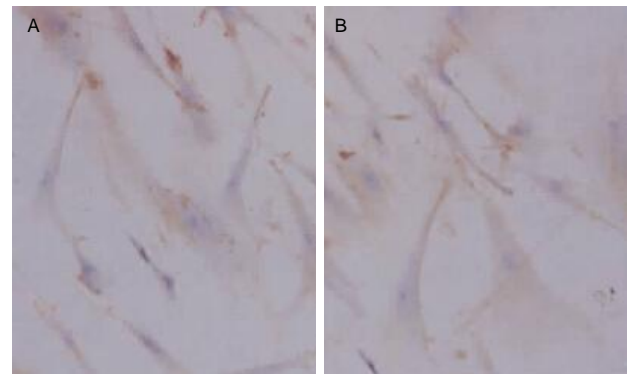


图4 实验组与对照组牙周膜细胞 I 型胶原表达(免疫细胞化学染色, x200)

Figure 4 Expression of type I collagen in the two groups (immunocytochemical staining, x200)

图注: 图中 A 为对照组, B 为实验组, 两组 I 型胶原表达无差异。

4 参考文献 References

- [1] 王琳,冯海兰,梅芳,等.人牙周膜细胞在左旋聚乳酸/羟基磷灰石生物材料上的生长观察[J].解剖学报, 2008,39(4): 573-577.
- [2] 贺慧霞,刘洪臣,王东胜,等.矿化液促进犬牙周膜细胞异位成骨实验[J].中华老年口腔医学杂志,2008,6(3):159-163.
- [3] 刘泉,莫安春.钇-羟基磷灰石纳米微粒对人牙周膜细胞生物学行为的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志, 2008,18(3): 139-143.
- [4] Wu C,Zhou Y,Lin C,et al.Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering.Acta Biomaterialia.2012;8(10):3805-3815.
- [5] 王琳,邓旭亮,梅芳,等.电纺左旋聚乳酸和左旋聚乳酸羟基磷灰石纳米纤维细胞相容性的比较研究[J].口腔颌面修复学杂志,2007,8(2):83-86.
- [6] Xiang L, Ma L, He Y, et al. Transfection with follicular dendritic cell secreted protein to affect phenotype expression of human periodontal ligament cells. J Cell Biochem. 2014; 115(5): 940-948.
- [7] Ji K, Liu Y, Lu W, et al. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. J Periodontal Researc. 2013; 48(1):105-116.
- [8] Ji K, Liu Y, Lu W, et al. Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. J Periodontal Res. 2013; 48(1):105-116.
- [9] 石铁,王泓杰,高秀秋,等.纳米羟基磷灰石及其复合材料对牙周膜细胞的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(3):553-556.
- [10] 王方,谢诚,吴国锋,等.组织工程牙周膜细胞片的体内实验研究[J].实用口腔医学杂志,2011,27(2):177-180.
- [11] 孙卫斌,吴亚菲,丁一,等.纳米羟基磷灰石对人牙周膜细胞的增殖效应[J].南京医科大学学报(英文版), 2004,18(6): 288-292.
- [12] 鲁红,吴织芬,田宇,等.一种新型纳米羟基磷灰石材料应用于牙周组织工程的可行性研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2005,15(1):6-9.

- [13] Kuo TF,Huang AT,Chang HH,et al.Regeneration of dentin-pulp complex-with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *J Biomed Mater Res A*.2008;86A(4):1062-1068.
- [14] Chen K,Xiong H,Huang Y,et al.Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs).*Arch Oral Biol*.2013;58(8):997-1006.
- [15] Martinez C,Rath S,VanGulden S,et al.Periodontal ligament cells cultured under steady-flow environments demonstrate potential for use in heart valve tissue engineering.*Tissue Eng Part A*.2013;19(3/4):458-466.
- [16] 孙卫斌,吴亚菲,丁一,等.纳米羟基磷灰石对人牙周膜细胞增殖活性的影响[J].东南大学学报(自然科学版), 2004, 34(6):802-805.
- [17] 毛钊,毛曦,储成林,等.人牙周膜细胞接种于纳米-羟基磷灰石上的形态学研究[J].东南国防医药, 2008,10(3): 161-163.
- [18] 鲁红,吴织芬,田宇,等.应用细胞-支架构建方式的组织工程方法促进牙周组织再生的实验研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2005,15(1):14-18.
- [19] Kim YT,Park JC,Choi SH,et al.The dynamic healing profile of human periodontal ligament stem cells: Histological and immunohistochemical analysis using an ectopic transplantation model.*J Periodontol Res*. 2012;47(4):514-524.
- [20] Ripamonti U,Parak R,Petit JC,et al.Induction of cementogenesis and periodontal ligament regeneration by recombinant human transforming growth factor-beta3 in Matrigel with rectus abdominis responding cells.*J Periodontol Res*.2009;44(1):81-87.
- [21] 毛钊,尹英,毛曦,等.老年人牙周膜细胞附着于纳米-羟基磷灰石上的形态学观察[J].医学研究生学报, 2009,22(8):815-818
- [22] Liu W,Konermann A,Guo T,et al.Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions.*BBA Gen Subjects*. 2014; 1840(3):1125-1134.
- [23] Chandrasekaran S,Ramachandran A,Eapen A,et al.Stimulation of periodontal ligament stem cells by dentin matrix protein 1 activates mitogen-activated protein kinase and osteoblast differentiation.*J Periodontol*.2013;84(3):389-395.
- [24] 鲁红,吴织芬.纳米羟基磷灰石材料复合碱性成纤维细胞因子促进牙周组织再生的实验研究[C].//2011第九次全国牙周病学学术会议论文集,2011:124-124.
- [25] 鲁红,吴织芬,田宇,等.人牙周膜细胞体外三维立体培养模型的建立[J].牙体牙髓牙周病学杂志, 2002,12(3): 132-134.
- [26] 鲁红,吴织芬,田宇,等.异体脱矿松质骨基质和纳米羟基磷灰石材料应用于牙周组织工程中的可行性探讨[J].中国临床康复,2002,6(17):2538-2539.
- [27] Moshaverinia A,Xu X,Chen C,et al.Application of stem cells derived from the periodontal ligament or gingival tissue sources for tendon tissue regeneration. *Biomaterials*.2014;35(9):2642-2650.
- [28] Yang Z,Jin F,Zhang et al.Tissue engineering of cementum/periodontal-ligament complex using a novel three-dimensional pellet cultivation system for human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*.2009;15(4):571-581.
- [29] Sumita Y,Ikeda M,Ikeda H,et al.Engineering bone formation from human dental pulp- and periodontal ligament-derived cells.*Ann Biomed Eng*. 2011;39(1): 26-34.
- [30] 孙卫斌,刘天佳,吴亚菲,等.纳米羟基磷灰石诱导人牙周膜细胞骨化分化的研究[C].//四川省口腔医学会成立大会暨第八次四川省口腔医学学术会议论文集,2005:35-38.
- [31] Du L,Yang P,Ge S,et al.Stromal cell-derived factor-1 significantly induces proliferation, migration, and collagen type i expression in a human periodontal ligament stem cell subpopulation.*J Periodontol*. 2012; 83(3):379-388.
- [32] Saminathan A,Vinoth KJ,Low HH,et al.Engineering three-dimensional constructs of the periodontal ligament in hyaluronan-gelatin hydrogel films and a mechanically active environment.*J Periodontol Res*. 2013;48(6):790-801.
- [33] 孙卫斌,吴亚菲,丁一,等.纳米羟基磷灰石诱导人牙周膜细胞碱性磷酸酶表达的研究[J].中华口腔医学杂志, 2006, 41(6):348-349.
- [34] 鲁红,田宇,吴织芬,等.珊瑚转化羟基磷灰石应用于牙周组织工程的细胞相容性和细胞毒性[J].中国组织工程研究, 2012,16(16):2955-2958.
- [35] Kuo TF,Huang AT,Chang HH,et al.Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine.*J Biomed Mater Res Part A*. 2008;86(4):1062-1068.
- [36] Bai Y,Matsuzaka K,Hashimoto S,et al.Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells.*Bone*.2011;48(6):1417-1426.
- [37] 鲁红,吴织芬,田宇,等.细胞-支架构建方式的牙周组织工程实验研究[J].中华口腔医学杂志, 2004,39(3): 189-192.
- [38] Akman AC,Tigli RS,Gumusderelioglu M,et al. bFGF-loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering.*J Biomed Mater Res A*. 2010;92A(3):953-962.