

改良型富血小板纤维蛋白复合双相磷酸钙可促进兔骨髓间充质干细胞的活性

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2360>

王玉姣¹, 刘丹², 孙嵩³, 孙勇¹

2095-4344.2360

投稿日期: 2020-01-13

送审日期: 2020-01-15

采用日期: 2020-03-07

在线日期: 2020-08-20

中图分类号:

R459.9; R-332; R318

文章编号:

2095-4344(2021)04-00504-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

双相磷酸钙前期促细胞增殖作用较弱,但其支架作用良好,改良型富血小板纤维蛋白于前期促进细胞增殖作用明显,二者联合使用时对细胞的增殖分化均有良好促进作用

CCK-8法检测细胞增殖活性,甲基罗丹明-鬼笔环肽荧光染色观察细胞黏附情况,定量检测细胞内碱性磷酸酶活性及矿化结节形成情况



文题释义:

改良型富血小板纤维蛋白: 2014年由Ghanaati等学者提出的新一代自体血液制品,通过调整富血小板纤维蛋白离心参数而得到,其三维网状结构更加疏松,利于氧气与营养物质的输送,所含白细胞、血小板及血小板激活时所释放的利于软硬组织的再生修复的生长因子的量更多。

双相磷酸钙: 是一种常用的人工骨替代材料,由羟基磷灰石和 β -磷酸三钙按照一定比例混合高温烧制而成,其结构与生物骨组织中的磷灰石结构类似,其中的羟基磷灰石能支持大块骨替代材料并维持相应的组织再生空间, β -磷酸三钙则能够增加新生血管和板层骨,既有良好的生物稳定性及降解性能,又具有较好的生物相容性和骨引导性。

摘要

背景: 将生长因子加入支架材料能促进体外培养干细胞的增殖及成骨分化,促进骨组织再生。改良型富血小板纤维蛋白中含有多种生长因子,能够促进多种细胞的增殖活性及相关功能蛋白的表达。

目的: 观察改良型富血小板纤维蛋白、双相磷酸钙单独或联合使用对骨髓间充质干细胞生长状况的影响。

方法: 将第3代兔骨髓间充质干细胞分4组培养,分别加入基础培养基(空白组)、改良型富血小板纤维蛋白条件培养基(A-PRF组)、双相磷酸钙(BCP组)、改良型富血小板纤维蛋白条件培养基与双相磷酸钙(A-PRF+BCP组)。CCK-8法检测细胞增殖活性,甲基罗丹明-鬼笔环肽荧光染色观察细胞黏附情况,定量检测细胞内碱性磷酸酶活性及矿化结节形成情况。

结果与结论: ①A-PRF+BCP组培养3, 5, 7, 11, 14 d的细胞增殖吸光度值高于其他3组, A-PRF组培养1, 3, 5 d的细胞增殖吸光度值高于BCP组、空白组, BCP组培养7, 11, 14 d的细胞增殖吸光度值高于A-PRF组、空白组; ②甲基罗丹明-鬼笔环肽荧光染色显示, BCP组、A-PRF+BCP组骨髓间充质干细胞黏附在双相磷酸钙材料表面,并且A-PRF+BCP组细胞与微丝数量明显多于BCP组; ③培养1, 21, 28 d的矿化结节合成情况为: A-PRF+BCP组>BCP组>A-PRF组>空白组; ④培养5, 7, 9 d的细胞碱性磷酸酶含量为: A-PRF+BCP组>BCP组>A-PRF组>空白组,组间两两比较差异有显著性意义($P < 0.05$); ⑤结果表明,双相磷酸钙前期促细胞增殖作用较弱,但其支架作用良好,改良型富血小板纤维蛋白于前期促进细胞增殖作用明显,二者联合使用时对细胞的增殖分化均有良好促进作用。

关键词: 骨; 材料; 双相磷酸钙; 细胞增殖; 干细胞; 矿化; 骨再生

Biphasic calcium phosphate loaded with advanced platelet rich fibrin can promote the activity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

Wang Yujiao¹, Liu Dan², Sun Song³, Sun Yong¹

¹School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Community Health Service Center of Longquanyi, Chengdu 610015, Sichuan Province, China; ³Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Wang Yujiao, Master candidate, Physician, School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Sun Yong, Chief physician, Professor, Master's supervisor, School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

¹西南医科大学口腔医学院, 四川省泸州市 646000; ²龙泉驿社区卫生服务中心, 四川省成都市 610015; ³成都市第一人民医院, 四川省成都市 610000

第一作者: 王玉姣, 女, 1992年生, 回族, 四川省阿坝州九寨沟县人, 西南医科大学口腔医学院在读硕士, 医师, 主要从事口腔种植修复的基础与临床研究。

通讯作者: 孙勇, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 西南医科大学口腔医院, 四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0003-1192-1844> (王玉姣)

引用本文: 王玉姣, 刘丹, 孙嵩, 孙勇. 改良型富血小板纤维蛋白复合双相磷酸钙可促进兔骨髓间充质干细胞的活性 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(4):504-509.



Abstract

BACKGROUND: Adding growth factor to scaffold material can promote the proliferation and osteogenic differentiation of cultured stem cells *in vitro* and promote bone tissue regeneration. Advanced platelet rich fibrin (A-PRF) contains a variety of growth factors, which can promote the proliferation activity of a variety of cells and the expression of related functional proteins.

OBJECTIVE: To observe the effects of the sole and combined usage regarding A-PRF and biphasic calcium phosphate (BCP) on the growth of bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: The third generation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells was cultured in four groups, including basic medium (blank group), A-PRF condition medium (A-PRF group), BCP (BCP group), A-PRF condition medium and BCP (A-PRF+BCP group). Cell proliferation activity was detected by CCK-8 assay. Cell adhesion was observed based on methylrhodamine-phalloidin fluorescence staining. Intracellular alkaline phosphatase expression and mineralized nodules were quantitatively measured.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The absorbance value of proliferation of the A-PRF+BCP group was higher than that of the other three groups at 3, 5, 7, 11 and 14 days after culture. The absorbance value of proliferation of cells cultured in the A-PRF group was higher than that of the BCP group and the blank group at 1, 3 and 5 days after culture. The absorbance value of proliferation of BCP group was higher than that of the A-PRF group and the blank group at 7, 11 and 14 days after culture. (2) Methylrhodamine-phalloidin fluorescence staining showed that bone marrow mesenchymal stem cells in the BCP group and the A-PRF+BCP group adhered to the surface of BCP and the number of cells and microfilaments in the A-PRF+BCP group was higher than that in BCP group. (3) The synthesis of mineralized nodules was A-PRF+BCP group > BCP group > A-PRF group > blank group at 1, 21 and 28 days after surgery. (4) The expression of alkaline phosphatase was A-PRF+BCP group > BCP group > A-PRF group > blank group at 5, 7 and 9 days. There was significant difference between the two groups ($P < 0.05$). (5) The results showed that BCP exerted a weak influence on promoting cell proliferation in the early stage, but its effect of scaffold was apparent. A-PRF had a significant effect on promoting cell proliferation with considerable influence on promoting cell proliferation and differentiation when combined BCP.

Key words: bone; material; biphasic calcium phosphate; cell proliferation; stem cell; mineralization; bone regeneration

How to cite this article: WANG YJ, LIU D, SUN S, SUN Y. Biphasic calcium phosphate loaded with advanced platelet rich fibrin can promote the activity of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(4):504-509.

0 引言 Introduction

1965 年 BRANEMARK 教授提出种植体骨整合的理论^[1], 为口腔种植学研究发展奠定生物学基础。近年来口腔种植适应证范围随着骨增量技术的迅速发展而扩大^[2], 其中组织工程学方法引导性骨再生技术是目前口腔临床广泛使用的骨增量技术之一^[3], 合适的人工骨替代材料与生物膜是引导性骨再生技术研究的重点^[4], 其引导新生骨形成的临床效果已获大量研究的肯定^[5]。组织工程的基本要素为种子细胞、支架材料、生长因子。其中双相磷酸钙由羟基磷灰石和 β -磷酸三钙人工合成, 兼具两者特性, 根据两者不同的混合比例可致双相磷酸钙孔隙率、孔径发生变化, 具备多样的生物学特性, 文献报道常用作成骨细胞和骨髓间充质干细胞的支架材料^[6-7]。血小板制品因含有大量促进细胞增殖分化、组织再生的生长因子而被广泛用于组织工程领域, 至今血小板浓缩制品主要有第一代富血小板血浆^[8]、第二代富血小板纤维蛋白^[9]、第三代改良型富血小板纤维蛋白^[10]。其中富血小板血浆制备复杂, 并且因牛凝血酶的加入会导致患者出现致命性过敏反应, 使得其临床运用受到限制^[11]。富血小板纤维蛋白在 2000 年由 CHOUKROUN 等^[12]报道, 其克服了富血小板血浆制备复杂及致敏性的缺点, 其含有的丰富生长因子能够促进骨髓间充质干细胞、成纤维细胞等多种软硬组织再生细胞的增殖活性、分化及蛋白表达^[13]。但也有研究发现富血小板纤维蛋白对细胞增殖存在一定不良反应^[14], 且关于离心力和离心时间对富血小板纤维蛋白三维空间结构及其中网络细胞数量及成分影响的对比研究仍不完善。2014 年, GHANAATI 等^[15]通过适当地降低离心速度和延长离心时间获得了改良型富血小板纤维蛋白, 其细胞分布、生长因子含量、纤维蛋白微观结构及机械性能等均优于传统富血小板纤维蛋白^[16]。实验通过观察双相磷酸钙与改良型富血小板纤维蛋白联合或单独使用对骨髓间充质干细胞增殖分化的作用, 探究使用双相磷酸钙与改良型富血小板纤维蛋白构建组织工程骨的可能性, 并为骨髓间充质干细胞联合改良型富血小板纤维蛋白与

双相磷酸钙应用于组织工程研究提供一定的理论参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于 2018 年 10 月至 2019 年 6 月在西南医科大学口腔医学院口腔修复再生实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 4 周龄清洁级新西兰兔 4 只, 体质量 (0.61±0.13) kg, 来源于西南医科大学动物房, 实验动物许可证号: SCXK(川)2018-17, 动物实验获西南医科大学动物实验伦理委员会批准, 实验操作符合善待动物的相关规定。

1.3.2 仪器与试剂 二氧化碳细胞孵育箱 (MCO-18AIC, 三洋电机株式会社, 日本); 生物洁净安全柜 (HS-1800H-U; 苏州安泰空气技术有限公司; 中国); 流式细胞分析仪 (Facscelesta, BD, 美国); DMEM 低糖培养基 (Hyclone, 美国); 双相磷酸钙 (四川大学生物材料工程研究中心, 中国); CCK-8 试剂盒 (Dojindo, 日本); 甲基罗丹明-鬼笔环肽、茜素红 S 染液 (Solarbio, 中国北京); 碱性磷酸酶测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国) BCA 试剂盒 (Beyotime, 中国上海); 倒置荧光相差显微镜 (IX71, Olympus, 日本); 单克隆抗体 CD29、CD90、CD34、CD45 (Santa Cruz, 美国); PBS (Solarbio, 中国北京); 青霉素-链霉素溶液 (Beyotime, 中国上海); TritonX-100 (Solarbio, 中国北京)。

1.4 方法

1.4.1 兔骨髓间充质干细胞的体外分离、培养 空气栓塞法处死新西兰兔后立即取股骨, 清除附着软组织, PBS+10% 双抗冲洗, 剪去股骨头, 5 mL 基础培养基冲洗髓腔, 收集的细胞悬液置于培养皿, 在体积分数 5%CO₂、37 °C 孵箱中培养。每 48 h 换液纯化, 全程无菌操作。每日于倒置相差显微镜下观察, 取第 3 代兔骨髓间充质干细胞供实验用。

1.4.2 兔骨髓间充质干细胞的鉴定

骨髓间充质干细胞成骨分化能力的鉴定: 按相关研究的

方法配制成骨诱导培养基^[17]。取第3代生长良好的兔骨髓间充质干细胞,培养24 h后换成骨诱导培养基培养,每48 h换液1次,于培养的第21天取出培养皿,进行茜素红矿化结节染色,镜下观察。

骨髓间充质干细胞表面标志的鉴定:取第3代骨髓间充质干细胞,制成 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的单细胞悬液,加入流式细胞仪专用试管,加抗体孵育15 min,对骨髓间充质干细胞阳性表面标记物CD29、CD90及阴性表面标记物CD34、CD45进行鉴定^[18-19]。

1.4.3 条件培养基与双相磷酸钙的预备 处死前各抽取兔耳中央动脉血7 mL,2 000 r/min离心24 min,取中间层改良型富血小板纤维蛋白凝胶,置于含5 mL新鲜无糖DMEM培养基离心管中37℃孵育7 d,1 000 r/min离心5 min,取上清液用0.22 μm 细菌滤器过滤,得到改良型富血小板纤维蛋白条件培养基,置于4℃保存备用。取成品双相磷酸钙圆片,使用DMEM培养基在体积分数5%CO₂、37℃条件下完成浸润,灭菌备用。

1.4.4 实验分组设计 将第3代兔骨髓间充质干细胞接种于96孔板内,细胞浓度为 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$,每孔集中100 μL ,分4组培养,分别加入基础培养基(空白组)、改良型富血小板纤维蛋白条件培养基(A-PRF组)、双相磷酸钙(BCP组)、改良型富血小板纤维蛋白条件培养基与双相磷酸钙(A-PRF+BCP组),每组设置3个复孔。

1.4.5 细胞增殖 在原分组基础上添加对照组,仅含新鲜培养基。将第3代骨髓间充质干细胞在体积分数5%CO₂、37℃条件下培养24 h,细胞贴壁后按分组条件培养。于细胞培养的1,3,5,7,11,14 d吸去原培养液,加50 μL CCK-8溶液至每孔后培养2 h,酶标仪测定450 nm各组吸光度值。

1.4.6 细胞黏附 利用甲基罗丹明-鬼笔环肽荧光染色观察改良型富血小板纤维蛋白对双相磷酸钙表面细胞黏附的影响。按实验分组设计培养骨髓间充质干细胞,A-PRF组于细胞培养的24 h行甲基罗丹明-鬼笔环肽荧光染色,A-PRF+BCP组与BCP组于培养的第7天行甲基罗丹明-鬼笔环肽荧光染色,激光共聚焦显微镜下观察细胞骨架的形态。

1.4.7 碱性磷酸酶定量检测 按实验分组设计培养骨髓间充质干细胞,于细胞培养的5,7,9 d吸去原培养液,加入50 μL 1%TritonX-100裂解细胞,培养30 min后收集细胞裂解液,取部分裂解液,按BCA试剂盒说明操作于酶标仪562 nm处测定吸光度值,并据此计算蛋白浓度。取部分裂解液按碱性磷酸酶试剂盒说明操作,酶标仪520 nm处测定吸光度值,按说明书提供的方法计算碱性磷酸酶活力值。

1.4.8 茜素红钙结节定量检测 按实验分组设计培养骨髓间充质干细胞,于细胞培养的1,21,28 d后行茜素红染色,待矿化结节红染后各孔加入100 g/L十六烷基氯化吡啶400 μL ,37℃孵育1 h,酶标仪562 nm处检测各孔吸光度值。

1.5 主要观察指标 各组骨髓间充质干细胞的增殖、黏附与

成骨分化能力。

1.6 统计学分析 以上各实验均重复3次,使用SPSS 17.0统计软件进行统计分析,各组间采用单因素方差分析法检验,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 认为结果差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 兔骨髓间充质干细胞的培养与鉴定 倒置显微镜下可见,培养36 h时见组织块周围有骨髓间充质干细胞爬出贴壁,分布不均,形态多样,见图1A,B;培养48 h时,镜下可见贴壁细胞数目明显增多,多呈梭形,形态饱满,边界清晰,排列密集,呈现出火焰状、层叠状、放射状排列,见图1C,D。成骨诱导培养基培养21 d,经茜素红染色后矿化结节显深红色,呈玫瑰花状,见图2A,B。

流式细胞仪检测显示,骨髓间充质干细胞表面标记物CD90、CD29、CD34、CD45的阳性率分别为99.73%,99.90%,3.91%,0.06%,见图3。

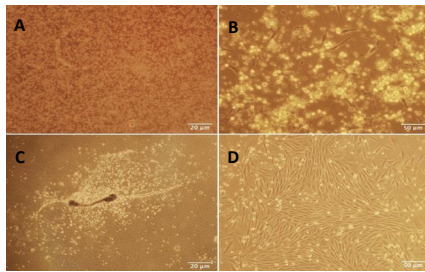
2.2 双相磷酸钙的基本表征 双相磷酸钙的规格为直径9 mm、高度2 mm,孔径率为60%-80%,孔隙半径为300 μm 左右,内连接大小约150 μm ,其组成为30%的羟基磷灰石、70%的 β -磷酸三钙。

2.3 细胞增殖情况 CCK-8检测显示,随培养时间的延长,各组细胞数量在前7 d逐渐增加,7 d后增殖减慢。培养第1,5天时,细胞增殖活性表现为:A-PRF+BCP组>A-PRF组>BCP组>空白组,除A-PRF+BCP组与A-PRF组比较无差异外,其余组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$);培养第3天时,细胞增殖活性表现为:A-PRF组>A-PRF+BCP组>BCP组>空白组,除A-PRF+BCP组与A-PRF组比较无差异外,其余组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$);培养第7,11,14天时,细胞增殖活性表现为:A-PRF+BCP组>BCP组>A-PRF组>空白组,除第7天A-PRF组与空白组比较无差异外,其余组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$),见图4。

2.4 细胞黏附情况 倒置荧光显微镜下可见A-PRF组呈现蓝色荧光,微丝聚集成束被紫外光激发后呈红色,沿着细胞突起规则排列,见图5。在细胞培养的第7天,双相磷酸钙圆形孔隙及周围见呈蓝色荧光的细胞核,红色微丝,A-PRF+BCP组细胞及微丝数量明显多于BCP组,见图6。

2.5 茜素红钙结节定量检测 培养1 d时,A-PRF+BCP组矿化结节合成多于其余3组($P < 0.05$),其余组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$);培养21,28 d时,矿化结节合成情况为:A-PRF+BCP组>BCP组>A-PRF组>空白组,21 d时各组间对比差异有显著性意义($P < 0.05$),28 d时除BCP组与A-PRF+BCP组无差异外,其余组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$),见图7。

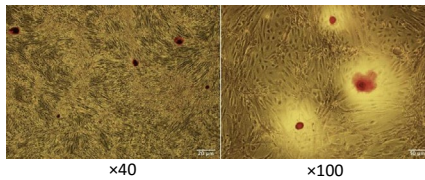
2.6 碱性磷酸酶定量检测 培养第5,7,9天时,碱性磷酸酶的表达情况为:A-PRF+BCP组>BCP组>A-PRF组>空白组,组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$),见图8。



图注: A($\times 40$), B($\times 100$) 为培养 36 h 时, 骨髓间充质干细胞爬出贴壁, 分布不均, 形态多样; C($\times 40$), D($\times 100$) 为培养 48 h 时, 贴壁细胞数目明显增多, 多呈梭形, 排列密集, 呈火焰状、层叠状、放射状排列

图 1 | 原代骨髓间充质干细胞的形态

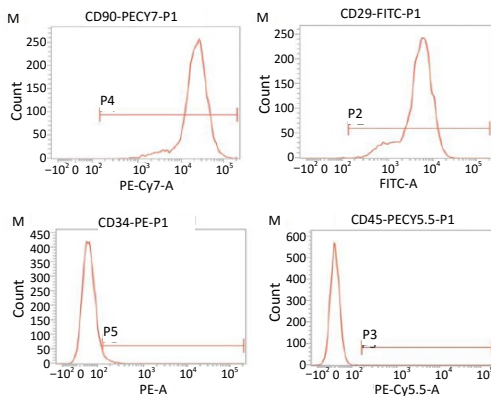
Figure 1 | Morphology of primary bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 矿化结节显深红色, 呈玫瑰花状

图 2 | 骨髓间充质干细胞茜素红 S 染色

Figure 2 | Alizarin red S staining of bone marrow mesenchymal stem cells

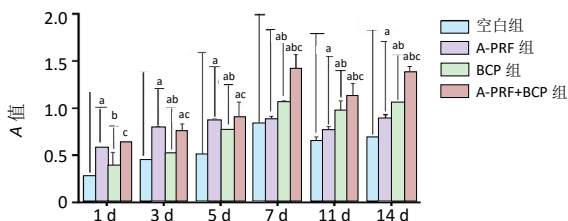


Statistics							
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	FSC-A Mean	SSC-A Mean	
BLANK:P2	6	0.07	0.06	0.06	88,869	72,442	
BLANK:P3	4	0.04	0.04	0.04	65,717	64,668	
BLANK:P4	15	0.16	0.15	0.15	103,525	77,745	
BLANK:P5	3	0.03	0.03	0.03	108,070	99,008	
CD90-PECY7:P4	8,843	99.73	88.43	88.43	126,354	59,286	
CD29-FITC:P2	9,099	99.90	90.99	90.99	122,946	57,925	
CD34-PE:P5	355	3.91	3.55	3.55	120,183	91,731	
CD45-PECY5.5:P3	5	0.06	0.05	0.05	92,085	89,792	

图注: 表面标记物 CD90、CD29、CD34、CD45 的阳性率分别为 99.73%、99.90%、3.91%、0.06%

图 3 | 骨髓间充质干细胞流式细胞仪分析的结果

Figure 3 | Flow cytometry results of bone marrow mesenchymal stem cells



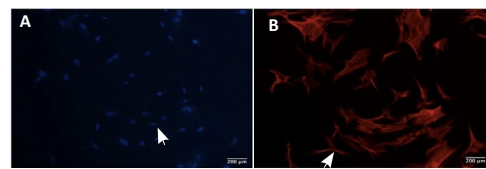
图注: BCP 为双相磷酸钙; A-PRF 为改良型富血小板纤维蛋白。与空白组比较, $^aP < 0.05$; 与 A-PRF 组比较, $^bP < 0.05$; 与 BCP 组比较, $^cP < 0.05$

图 4 | 各组骨髓间充质干细胞增殖的比较

Figure 4 | Comparison of proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in different groups

3 讨论 Discussion

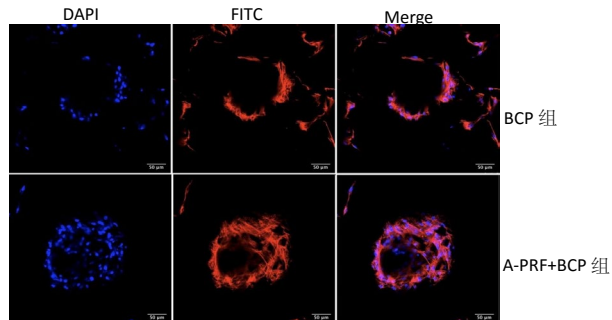
骨组织工程近年来已成为研究与应用的热点, 将支架材料、种子细胞、生长因子这 3 种元素共同应用于组织再生工



图注: A 为细胞核染色, 箭头示细胞; B 为微丝染色, 箭头示微丝

图 5 | 改良型富血小板纤维蛋白骨髓间充质干细胞的黏附 (甲基罗丹明 - 鬼笔环肽荧光染色, $\times 400$)

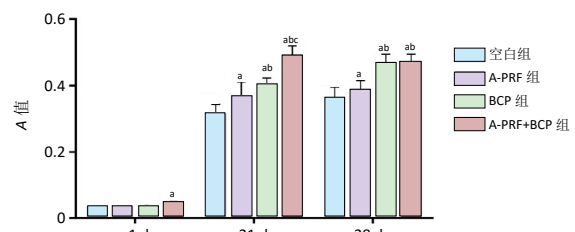
Figure 5 | Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells in the advanced platelet rich fibrin group (methylrhodamine-phalloidin fluorescence staining, $\times 400$)



图注: 改良型富血小板纤维蛋白 + 双相磷酸钙组 (A-PRF+BCP 组) 的细胞及微丝数量明显多于双相磷酸钙组 (BCP 组)

图 6 | 双相磷酸钙组与改良型富血小板纤维蛋白 + 双相磷酸钙组骨髓间充质干细胞的黏附 (甲基罗丹明 - 鬼笔环肽荧光染色, $\times 100$)

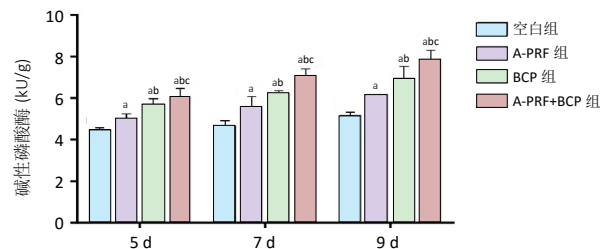
Figure 6 | Adhesion of bone marrow mesenchymal stem cells in the biphasic calcium phosphate group and advanced platelet rich fibrin+biphasic calcium phosphate group (methylrhodamine-phalloidin fluorescence staining, $\times 100$)



图注: BCP 为双相磷酸钙; A-PRF 为改良型富血小板纤维蛋白。与空白组比较, $^aP < 0.05$; 与 A-PRF 组比较, $^bP < 0.05$; 与 BCP 组比较, $^cP < 0.05$

图 7 | 各组不同时间点的矿化结节合成情况

Figure 7 | Synthesis of mineralized nodules at different time points in each group



图注: BCP 为双相磷酸钙; A-PRF 为改良型富血小板纤维蛋白。与空白组比较, $^aP < 0.05$; 与 A-PRF 组比较, $^bP < 0.05$; 与 BCP 组比较, $^cP < 0.05$

图 8 | 各组不同时间点碱性磷酸酶含量的比较

Figure 8 | Comparison of alkaline phosphatase content at different time points in each group

程取得了较佳的再生效果^[20-21]。骨髓间充质干细胞具有多向分化潜能, 方便提取, 常用做组织工程的种子细胞, 在诱导培养条件下促进骨缺损修复^[22]。实验采用全骨髓法成功提取

兔骨髓间充质干细胞,其形态学、生物学特征、细胞表面特异性标志物与文献报道的骨髓间充质干细胞一致^[23]。

将生长因子加入支架材料能促进体外培养干细胞的增殖及成骨分化,促进骨组织再生^[24-25]。改良型富血小板纤维蛋白中含有多种生长因子,如血小板衍生生长因子、转化生长因子 β 、血管内皮生长因子等,能够促进多种细胞的增殖活性及相关功能蛋白的表达^[26]。此次实验使用的双相磷酸钙是参照李佳乐^[6]的研究,调整支架材料羟基磷灰石 β -磷酸三钙的质量比为3:7,直径5 mm,厚度2 mm,孔隙大小约400 μ m,总体孔隙率70%-80%,有研究证实这一比例和孔隙的双相磷酸钙具有良好生物相容性和骨引导性,能为细胞生长提供支架作用。实验将富含生长因子的改良型富血小板纤维蛋白与双相磷酸钙联合培养细胞,改良型富血小板纤维蛋白中的生长因子发挥协同作用,共同促进了细胞在双相磷酸钙表面的增殖与黏附;前期含改良型富血小板纤维蛋白两组促细胞增殖作用较其他组明显,而在培养的中后期,含双相磷酸钙的实验组均超过了改良型富血小板纤维蛋白组,作者认为随时间的延长细胞数量逐渐增加,在中后期,不含双相磷酸钙组因生长空间不足,其增殖速度减慢,而含双相磷酸钙实验组的细胞可长入支架材料的三维孔隙中,A-PRF+BCP组因综合了改良型富血小板纤维蛋白与双相磷酸钙的共同作用而表现出最佳的促增殖作用。在后续实验中观察到A-PRF+BCP组更利于细胞碱性磷酸酶与钙结节的合成,该两项指标都是成骨分化的重要标志物,说明联合使用改良型富血小板纤维蛋白和支架材料双相磷酸钙对细胞增殖及成骨分化的正向调节作用优于单独使用,这与相关研究得到的结论一致^[27]。关于改良型富血小板纤维蛋白联合双相磷酸钙对细胞成骨分化作用的影响,作者认为除了生长因子与双相磷酸钙对细胞的作用外,双相磷酸钙本身的成分也有重要影响:其一,双相磷酸钙发生轻度溶解时会释放出钙离子,形成的高钙离子层可以促进细胞分泌基质^[28],钙、磷元素被应用于合成碱性磷酸酶与钙盐时较空白组及A-PRF组有更多原料;其二,双相磷酸钙所含的微量氟元素能促进碱性磷酸酶及钙盐的合成及活性。所以在整个实验周期中含支架材料两组的成骨分化能力更佳,这与SHUANG等^[29]的结果是契合的。但是,当前实验结果与一些以往报道存在差异。FERNÁNDEZ等^[26]发现不同浓度改良型富血小板纤维蛋白对细胞的增殖分化存在不同的作用,当改良型富血小板纤维蛋白提取液的浓度高于40%时会抑制细胞的增殖分化,作者认为改良型富血小板纤维蛋白的生物学行为非常复杂,其纤维蛋白的结构、蛋白、血沉棕黄层、白细胞、生长因子等的含量都可能对细胞产生未知影响。而KANNO等^[30]认为血小板浓缩物对于细胞的增殖分化同时存在促进作用是不可能的,有学者猜测这种增殖分化不一致可能是血小板衍生物共培养的细胞存在2个亚群,大多数细胞在生长因子作用下增殖分化,少部分会在与纤维蛋白和白细胞的接触处分化^[31]。另一方面,通过查阅文献发现以往许多不同种属的研究其运用的血小板制品离

心方法和人一致,并且常使用非专用的改良型富血小板纤维蛋白离心机,或者采用不同种属来源的细胞与血液制品进行实验,这对结果也会产生一定影响。所以当前实验采用前人筛选出的兔改良型富血小板纤维蛋白离心方法,原代培养细胞进行研究,在一定程度上消除了一些干扰因素。

此外,细胞骨架是位于胞质内的纤维状蛋白,主要包括中间纤维、微管、微丝等结构^[32]。微丝中的主要蛋白为肌动蛋白,其在细胞内主要以游离肌动蛋白和聚合肌动蛋白这2种形式存在,其中纤维状的聚合肌动蛋白是细胞骨架的主要部分,其在细胞内的解聚、聚合、重排等动态变化可反映细胞的不同功能状态,对骨髓间充质干细胞的形态结构、黏附、迁移、伸展等研究有重要意义^[33-34]。实验使用TRITC标记的鬼笔环肽与细胞中的游离肌动蛋白,来观察改良型富血小板纤维蛋白对支架材料上细胞骨架的影响,发现接种的骨髓间充质干细胞能成功黏附在双相磷酸钙材料表面,且在改良型富血小板纤维蛋白存在的情况下,双相磷酸钙材料上的细胞与微丝更多,说明细胞能适应双相磷酸钙材料的局部环境和结构,并沿着双相磷酸钙材料的三维支架结构生长、增殖,并且改良型富血小板纤维蛋白中含有的生长因子能够促进骨髓间充质干细胞骨架在双相磷酸钙材料表面的充分伸展,进而促进骨髓间充质干细胞在双相磷酸钙材料上的黏附、增殖。

实验的不足:①改良型富血小板纤维蛋白是立体三维网状结构,生长因子、白细胞嵌合在上面能够持续发挥作用,对细胞产生影响,但实验只单纯研究了析出液对细胞的影响;②没有阐述改良型富血小板纤维蛋白促进骨髓间充质干细胞成骨分化具体机制的相关问题。

综上所述,实验进一步研究了改良型富血小板纤维蛋白与双相磷酸钙单独或联合使用对骨髓间充质干细胞增殖、分化及黏附的影响,证实二者联合使用对细胞生物活性的促进作用最佳,为采用这2种材料构建组织工程骨治疗骨缺损提供了理论依据。接下来课题组将进一步研究这2种新型材料促进干细胞增殖分化、诱导组织再生的具体机制,并通过动物实验建立骨缺损模型,探究这2种材料进一步用于组织工程的可能性。

改良型富血小板纤维蛋白与双相磷酸钙对骨髓间充质干细胞的增殖分化具有一定的促进作用,两者联合使用效果更佳。

作者贡献:全体作者进行实验设计,实验实施为刘丹、王玉姣,实验评估为孙勇、孙嵩,资料收集为王玉姣、刘丹,王玉姣成文,孙勇审核。
经费支持:该文章未接受任何经费支持。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题:动物实验获西南医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经西南医科大学生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] BRÅNEMARK PI. Osseointegration and its experimental background.J Prosthet Dent.1983;50(3):399-410.
- [2] ELNAYEF B, MONJE A, GARGALLO-ALBIOL J, et al. Vertical Ridge Augmentation in the Atrophic Mandible: A Systematic Review and Meta-Analysis.Int J Oral Maxillofac Implants.2017;32(2):291-312.
- [3] 何帆, 彭巍, 张书童. 引导骨在口腔种植中的应用 [J]. 全科口腔医学电子杂志, 2019,6(27):57-58.
- [4] ARUNJAROENSUK S, PANMEKATE S, PIMKHAOKHAM A. The Stability of Augmented Bone Between Two Different Membranes Used for Guided Bone Regeneration Simultaneous with Dental Implant Placement in the Esthetic Zone.Int J Oral Maxillofac Implants.2018;33(1):206-216.
- [5] DI RAIMONDO R, SANZ-ESPORRÍN J, PLÁ R, et al. Alveolar crest contour changes after guided bone regeneration using different biomaterials: an experimental in vivo investigation.Clin Oral Investig.2019;10.1007/s00784-019-03092-8.
- [6] 李佳乐. 三维打印双相磷酸钙陶瓷支架在骨组织工程中的应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [7] MIRON RJ, SCULEAN A, SHUANG Y, et al. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA.Clin Oral Implants Res.2016; 27(6): 668-675.
- [8] WANG X, ZHANG Y, CHOUKROUN J, et al. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma.Platelets.2018;29(1):48-55.
- [9] CHOU TM, CHANG HP, WANG JC. Autologous platelet concentrates in maxillofacial regenerative therapy.Kaohsiung J Med Sci.2020. doi:10.1002/kjm2.12192.
- [10] FUJIOKA-KOBAYASHI M, MIRON RJ, HERNANDEZ M, et al. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response.J Periodontol. 2017;88(1): 112-121.
- [11] LATALSKI M, WALCZYK A, FATYGA M, et al. Allergic reaction to platelet-rich plasma (PRP): Case report.Medicine (Baltimore).2019; 98(10): e14702.
- [12] CHOUKROUN J, ADDA F, SCHOEFFER C, et al. PRF: An opportunity in perio implantology.Implantodontie.2000;42:55-62.
- [13] AGRAWAL AA. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology.World J Clin Cases.2017;5(5):159-171.
- [14] VAHABI S, VAZIRI S, TORSHABI M. Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts.J Dent (Tehran).2015;12(7):504-512.
- [15] GHANAATI S, BOOMS P, ORLOWSKA A, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells.J Oral Implantol.2014; 40(6):679-689.
- [16] KOBAYASHI E, FLÜCKIGER L, FUJIOKA-KOBAYASHI M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF.Clin Oral Investig.2016;20(9):2353-2360.
- [17] LI W, WEI S, LIU C, et al. Regulation of the osteogenic and adipogenic differentiation of bone marrow-derived stromal cells by extracellular uridine triphosphate: The role of P2Y2 receptor and ERK1/2 signaling. Int J Mol Med.2016;37(1):63-73.
- [18] WANG Y, HUANG X, TANG Y, et al. Effects of panax notoginseng saponins on the osteogenic differentiation of rabbit bone mesenchymal stem cells through TGF-β1 signaling pathway.BMC Complement Altern Med. 2016;16(1):319.
- [19] CHEN X, WANG L, HOU J, et al. Study on the Dynamic Biological Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Senescence.Stem Cells Int.2019;2019:9271595.
- [20] SHANBHAG S, SULIMAN S, PANDIS N, et al. Cell therapy for orofacial bone regeneration: A systematic review and meta-analysis.J Clin Periodontol.2019;46 Suppl 21:162-182.
- [21] QASIM M, CHAE DS, LEE NY. Bioengineering strategies for bone and cartilage tissue regeneration using growth factors and stem cells.J Biomed Mater Res A.2020;108(3):394-411.
- [22] WANG J, LIU S, LI J, et al. Roles for miRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.Stem Cell Res Ther.2019;10(1):197.
- [23] SUN J, ZHAO F, ZHANG W, et al. BMSCs and miR-124a ameliorated diabetic nephropathy via inhibiting notch signalling pathway.J Cell Mol Med.2018;22(10):4840-4855.
- [24] BEHNIA H, KHOJASTEH A, SOLEIMANI M, et al. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report.J Craniomaxillofac Surg.2012;40(1):2-7.
- [25] HOUSHMAND B, BEHNIA H, KHOSHABAN A, et al. Osteoblastic differentiation of human stem cells derived from bone marrow and periodontal ligament under the effect of enamel matrix derivative and transforming growth factor-beta.J Oral Maxillofac Implants.2013;28(6):e440-450.
- [26] FERNÁNDEZ-MEDINA T, VAQUETTE C, IVANOVSKI S. Systematic Comparison of the Effect of Four Clinical-Grade Platelet Rich Hemoderivatives on Osteoblast Behaviour.Int J Mol Sci.2019; 20(24): 6243.
- [27] BÖLÜKBAŞI N, YENİYOL S, TEKESIN MS, et al. The use of platelet-rich fibrin in combination with biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: a histologic and histomorphometric study.Curr Ther Res Clin Exp.2013;75:15-21.
- [28] SCHUMACHER M, UHL F, DETSCH R, et al. Static and dynamic cultivation of bone marrow stromal cells on biphasic calcium phosphate scaffolds derived from an indirect rapid prototyping technique.J Mater Sci Mater Med.2010;21(11):3039-3048.
- [29] SHUANG Y, YIZHEN L, ZHANG Y, et al. In vitro characterization of an osteoinductive biphasic calcium phosphate in combination with recombinant BMP2.BMC Oral Health.2016;17(1):35.
- [30] KANNO T, TAKAHASHI T, TSUJISAWA T, et al. Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation.J Oral Maxillofac Surg.2005;63(3):362-369.
- [31] DOHAN EHRENFEST DM, DISS A, ODIN G, et al. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures.Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(3):341-352.
- [32] SAIDOVA AA, VOROBEV IA. Lineage Commitment, Signaling Pathways, and the Cytoskeleton Systems in Mesenchymal Stem Cells.Tissue Eng Part B Rev.2020;26(1):13-25.
- [33] LIU L, LUO Q, SUN J, et al. Cytoskeletal control of nuclear morphology and stiffness are required for OPN-induced bone-marrow-derived mesenchymal stem cell migration.Biochem Cell Biol. 2019;97(4): 463-470.
- [34] CHEN Z, LUO Q, LIN C, et al. Simulated microgravity inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via depolymerizing F-actin to impede TAZ nuclear translocation.Sci Rep.2016;6:30322.