四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ (Med Sci Edi)　2018，49(5)：716－719

血小板浓缩生长因子对人牙髓细胞存活及其增殖分化的影响*

严崎方[1,2,3]，窦　磊[1,2,3]，宦　俊[1,2,3]，杨德琴[1,2,3△]

1. 重庆医科大学附属口腔医院 牙体牙髓科（重庆 401147）；2. 重庆医科大学附属口腔医院 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室（重庆 401147）；3. 重庆医科大学附属口腔医院 重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室（重庆 401147）

【摘要】 目的　探讨血小板浓缩生长因子（Concentrate Growth factors，CGF）对人牙髓细胞（human dental pulp cells，hDPCs）增殖分化的影响，为其今后在牙髓及根尖周疾病治疗应用进行前期研究。**方法**　从因正畸治疗拔除的健康恒牙分离培养出人牙髓细胞，在体外采用 CGF 或矿物三氧化物聚合体（mineral trioxide aggregate，MTA）处理人牙髓细胞，分别在第 1、3、7 天，CCK-8 法测定各组细胞增殖水平、碱性磷酸酶活性、流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况。**结果**　与 MTA 组相比，CGF 组的细胞增殖能力增强，S 期细胞的比例增加，且第 3、7 天 ALP 活性增高（$P<0.05$），而第 1、7 天牙髓细胞凋亡率降低。**结论**　CGF 在体外具有良好的促进牙髓细胞增殖，抗凋亡以及诱导成骨/成牙分化的能力。

【关键词】 血小板浓缩生长因子　矿化三氧化物聚合物　牙髓细胞　CCK8 增殖　成牙分化

The Effect of Concentrate Growth Factors on the Survival, Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells

YAN Qi-fang[1,2,3], *DOU Lei*[1,2,3], *HUAN Jun*[1,2,3], *YANG De-qin*[1,2,3△]. 1. *Department of Endodontics, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University*, Chongqing 401147, China; 2. *Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University*, Chongqing 401147, China; 3. *Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Chongqing Colleges and Universities, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University*, Chongqing 401147, China

△ Corresponding author, E-mail: 346924620@qq.com

【Abstract】 Objective　To explore the cytotoxicity of concentrate growth factors (CGF) and the effects on the apoptosis, proliferation and differentiation of human dental pulp cells (hDPCs), which were closely correlated with future application of CGF in the treatment of dental pulpal and periapical diseases. **Methods**　hDPCs were isolated from permanent teeth extracted for orthodontic purpose, and expanded *in vitro*. hDPCs were treated with CGF and mineral trioxide aggregate (MTA) respectively. The cell apoptosis, proliferation, cell cycle and ALP activity were analyzed after 1, 3 and 7 days. **Results**　Compared with the MTA group, CGF significantly promoted cell proliferation, increased the proportion of S-phase cells and ALP activity on days 3 and 7 ($P<0.01$). Besides, hDPCs apoptotic rates decreased in CGF group. **Conclusion**　CGF has a good ability to promote the proliferation of dental pulp cells, resist apoptosis and induce osteogenic/odontogenic differentiation *in vitro*.

【Key words】　CGF　MTA　Human dental pulp cells　CCK-8 proliferation　Odontogenic differentiation

直接盖髓术是用药物覆盖在牙髓暴露处，促进修复性牙本质形成以保护牙髓、保存牙髓活力的方法[1]。而直接盖髓术能否成功与盖髓剂有着密切的关系，理想的盖髓剂应该对牙髓组织无毒，有杀菌抑菌消炎作用，有较强渗透力，且能促进牙髓组织修复再生[2-3]。现有的盖髓材料存在着各自的不足，其中矿物三氧化物聚合体（mineral trioxide aggregate，MTA）是临床上应用比较广泛的盖髓剂之一，具有良好的生物相容性，封闭性和抑菌性[4]，但 MTA 也有固化时间较长，不易塑形，容易使牙齿变色，成本较高，不可吸收被自身组织替代等缺点[5]。浓缩生长因子（concentrated growth factors，CGF）是 2006 年由 SACCO[6] 首次提出，静脉取血变速离心制作而成，它是一种新型的修补生物材料，是继富血小板血浆（platelet rich plasma，PRP）、富血小板纤维蛋白（platelet-rich fibrin，PRF）后又一代自体血液提取物，富含高浓缩的多种生长因子及

* 重庆市卫计委医学科研项目（No. 2015MSXM047，No. KJ1600214）资助

△ 通信作者，E-mail：346924620@qq.com

纤维蛋白，包括转移生长因子-β(TGF-β)、血小板衍生生长因子(PDGF)、类胰岛素生长因子(IGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子(EGF)以及成纤维细胞生长因子(FGF)等[7]。CGF 所释放的多种生物活性因子在牙髓损伤修复过程中也扮演着重要的作用。已有研究表明 CGF 对于软骨及骨缺损的修复均具有促进作用[8]，此外，有研究证明 CGF 有利于牙龈细胞黏附及增殖[9]，并且一定浓度下可以促进骨髓间充质干细胞的分化[10]。目前，有关 CGF 对于人牙髓细胞(human dental pulp cells，hDPCs)的作用尚未见报道，本研究以 MTA 作为对照，探讨 CGF 对 hDPCs 增殖分化的影响，为其今后在牙髓及根尖周疾病治疗应用进行前期研究。

1　材料与方法

1.1　主要仪器和试剂

低速台式离心机(5810R，德国)，倒置相差显微镜(Nikon，日本)，滤光片式酶标仪(ELX800，美国)，DMEM-F12 培养基、胰蛋白酶(Hyclone，美国)，胎牛血清(Natocor，阿根廷)，9 mL真空采血管(Sanli，中国)；碱性磷酸酶检测试剂盒、染色试剂盒(碧云天，上海)，CCK-8 试剂盒(同仁，日本)，细胞周期试剂盒(跃亚，苏州)，细胞凋亡试剂盒(BD，美国)，流式细胞仪(BD influx，美国)。

1.2　hDPCs 的分离培养

本研究经重庆医科大学附属口腔医院伦理委员会通过，患者签署知情同意书。选取患者因正畸治疗需要拔除的健康恒牙，采用改良酶消化组织块法分离培养 hDPCs[11]。牙髓细胞呈长梭形贴壁生长，待细胞长满瓶底约 80%时，常规传代并扩大培养。

1.3　CGF 膜片制备

用 Medifuge 离心机匹配的真空采血管抽取患者静脉血，立即置入 Medifuge 离心机，设定 CGF 制备程序，离心 13 min 后，可见采血管中血液分为 3 层，最上层淡黄色为血清层，中间层为 CGF 纤维蛋白层，底层为红细胞层。超净工作台中弃除血清层，无菌眼科剪自中间层及底层交界处剪，用无菌纱布轻轻挤压水分，即获取 CGF。将 CGF 挤压成膜，后铺平于培养皿底待用。

1.4　MTA 制备

参照 ZHANG 等[12]报道的方法，在无菌条件下，MTA 粉液以体积比 1∶1 调制，压平后铺平在底壁，37 ℃、96%湿度下固化 4 h。

1.5　CCK-8 检测细胞增殖

将 100 μL 培养基加入至预铺 CGF、MTA 以及空的孔板中，振荡 24 h，制备材料浸染液；取第 3 代自体 hDPCs 细胞悬液以细胞密度为 10^4 mL^{-1}接种于 96 孔板中(100 μL/孔)，分为 CGF 组、MTA 组和空白对照组，待细胞贴壁后，分别换用相对应的浸染液。每组各时间点各取 5 孔，放入培养箱中分别培养 1、3、7 d 后，每孔加入 10 μL CCK-8 液，放入 37 ℃，体积分数 5%CO_2 培养箱中孵育 4 h 后上酶标仪，用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A_{450})，反映细胞增殖水平。去除最高值和最低值后再取平均值，实验重复 5 次。

1.6　细胞成骨碱性磷酸酶(ALP)活性检测

将等体积 CGF 和 MTA 预铺在孔板底壁，取第 3 代 自体 hDPCs，以 10^5 mL^{-1}接 种 于预铺的 6 孔 板中 ，分为 CGF 组、MTA 组和空白对照组，每组各时间点各取 5 孔，放入培养箱中分别培养 1、3、7 d 后，取出培养板，弃去培养液，PBS 轻轻清洗 3 次，每孔加入 ALP 裂解液 200 μL，37 ℃，体积分数 5%CO_2 孵箱中放置 4～6 h 后震动 30 min，收集细胞和裂解液混合液，用酶标仪测定 A_{405}，反映 ALP 活性。去除最高值和最低值后再取平均值，实验重复 5 次。

1.7　流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡率

取 第 3 代 自体 hDPCs，以 10^5 mL^{-1}的细胞密度接种于 6 孔板。分组培养同 1.6，每组各时间点各取 5 孔，分别培养 1、3、7 d 后，胰酶消化细胞，经 PBS 洗 2 次，收集部分细胞悬浮于 PI 染液中，室温避光染色 30 min，300 目筛网过滤后上流式细胞仪检测的细胞周期，计算各组处于 S 期(DNA 合成期)的细胞百分率。收集剩余细胞悬浮于 Staining buffer，加入 PE Annexin Ⅴ室温避光反应 15 min 后，再加入适量 Staining buffer，300 目筛网过滤后上流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.8　统计学方法

组间数据比较采用 t 检验或方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　hDPCs 的原代培养

原代培养 6 d 后，倒置显微镜下可见细胞从组织块边缘爬出，细胞呈长梭形并贴壁生长。随着培养时间的延长，待细胞生长汇合至 80%以上时，细胞数目逐渐增多，呈放射状排列。

2.2　细胞增殖水平

由表1可见，随着处理时间增加，各组细胞增殖水平均逐渐上升，MTA组在各个时点的增殖水平均低于CGF组和对照组($P<0.05$)，对照组和CGF组 之间差异均无统计学意义。

2.3　细胞ALP活性

在ALP定量的实验中，接种培养第1天时，3组吸光度值之间差异无统计学意义。第3、7天时，3组吸光度值之间差异均有统计学意义($P<0.05$)，CGF组中的hDPCs ALP活性明显高于MTA组和对照组。见表2。

2.4　细胞周期检测

在细胞周期流式检测后显示，接种培养1、3、7 d后，MTA组和CGF组之间S期细胞百分比差异均有统计学意义($P<0.01$)，培养第3、7天，CGF组和对照组之间S期细胞百分比差异有统计学意义($P<0.05$)。见表3。

2.5　细胞凋亡检测

在细胞凋亡流式检测后显示，接种培养1、3、7 d后，MTA组及CGF组细胞凋亡率与对照组之间差异均有统计学意义($P<0.05$)，培养第1、7天，MTA组和CGF组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

表1　各组hDPCs细胞增殖数

Table 1　Cell proliferation of hDPCs in each group

Group	n	Cell proliferation (A_{450} value)		
		1st day	3rd day	7th day
MTA	5	1.338±0.060	1.893±0.117	2.920±0.081
CGF	5	1.619±0.110*	2.392±0.049*	3.613±0.031*
Control	5	1.683±0.086*	2.316±0.078*	3.555±0.038*

* $P<0.05$, vs. MTA group at the same time

表2　各组hDPCs细胞碱性磷酸酶活性

Table 2　Alkaline phosphatase (ALP) activity of hDPCs in each group

Group	n	ALP activity (A_{405} value)		
		1st day	3rd day	7th day
MTA	5	0.071±0.005	0.091±0.003△	0.172±0.012△
CGF	5	0.074±0.001	0.014±0.007△	0.180±0.007△
Control	5	0.067±0.004	0.082±0.002△	0.097±0.002△

△ $P<0.05$, vs. other groups at the same time

表3　各组hDPCs细胞培养后各时点S期细胞百分比

Table 3　Percentage of S phase at each time point after cell culture of hDPCs in each group

Group	n	S phase rate/%		
		1st day	3rd day	7th day
MTA	5	37.850±0.757	35.973±1.431	28.990±0.315
CGF	5	48.597±0.766△	42.767±0.258*,△	38.510±1.202*,△
Control	5	46.297±0.889	42.373±0.466	36.613±0.201

* $P<0.05$, vs. control group at the same time; △$P<0.05$, vs. MTA group at the same time

表4　各组hDPCs细胞培养后各时点凋亡率

Table 4　Apoptosis rate at each time point after cell culture of hDPCs in each group

Group	n	Cell apoptotic rate/%		
		1st day	3rd day	7th day
MTA	5	10.460±1.142*	6.167±0.075*	4.527±0.081*
CGF	5	8.203±0.561*,△	5.600±0.329*,△	4.103±0.131*,△
Control	5	7.167±0.166	4.857±0.084	2.953±0.783

* $P<0.05$, vs. control group at the same time; △$P<0.05$, vs. MTA group at the same time

3　讨论

直接盖髓术成功的关键之一是盖髓剂不会引起明显牙髓炎症，并促进形成完整的修复性牙本质，这要求盖髓剂具有良好的生物相容性，且能够诱导牙髓细胞成牙分化局部矿化形成牙本质桥[13]。因此本实验采用CCK-8法检测了接触CGF生长的细胞增殖情况、流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡情

况，评估 CGF 对牙髓细胞的增殖及其毒性作用。ALP 活性在一定程度上能反映出牙髓细胞成牙/成骨分化的水平，其活性的增高是牙髓细胞早期成牙本质/成骨分化的标志[14]，因此本实验同时还检测了 ALP 活性。同时，本实验选择目前临床上认可的直接盖髓材料 MTA 作为阳性对照，并同时设置空白对照组。

本研究发现，CGF 组细胞的增殖能力和 ALP 活性明显高于 MTA 组。细胞周期检测发现，各时间点 CGF 组 S 期细胞比率明显高于 MTA 组（$P<0.01$），而培养第 3、7 天时，CGF 组 S 期细胞比率高于空白对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。细胞凋亡检测发现，第 1、7 天，MTA 组凋亡率与 CGF 组之间差异有统计学意义（$P<0.05$）。说明与目前临床上常用的盖髓材料 MTA 比较，CGF 能明显促进牙髓细胞增殖和成牙/成骨向分化，调控细胞周期，减少细胞凋亡，且对牙髓细胞无明显毒性作用。故本实验在理论上证明了 CGF 确实有作为直接盖髓材料的可能性。CGF 在体外具有良好的促进牙髓细胞增殖，抗凋亡以及诱导成骨/成牙分化的能力，本研究初步评价了其作为直接盖髓材料的可行性。但是 CGF 在体内的效果还需进一步的实验评估，如 CGF 作为直接盖髓材料在动物模型中对牙髓组织的影响，这些将在随后的实验中去验证。

参 考 文 献

[1] TAKITA T，HAYASHI M，TAKEICHI O，*et al*. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. Int Endod J，2006，39(5)：415-422.

[2] TZIAFAS D，SMITH AJ，LESOT H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent，2000，28(2)：77-92.

[3] WITHERSPOON DE. Vital pulp therapy with new materials：new directions and treatment perspectives-permanent teeth. J Endod，2008，34(7 Suppl)：S25-S28.

[4] PAROLIA A，KUNDABALA M，RAO NN，*et al*. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with propolis，mineral trioxide aggregate and dycal. Aust Dent J，2010，55(1)：59-64.

[5] PARIROKH M，TORABINEJAD M. Mineral trioxide aggregate：a comprehensive literature review-Part Ⅲ：clinical applications，drawbacks，and mechanism of action. J Endod，2010，36(3)：400-413.

[6] RODELLA LF，FAVERO G，BONINSEGNA R，*et al*. Growth factors，CD34 positive cells，and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. Microsc Res Tech，2011，74(8)：772-777.

[7] FENNIS JP，STOELINGA PJ，JANSEN JA. Mandibular reconstruction：a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. Int J Oral Maxillofac Surg，2002，31(3)：281-286.

[8] ZHANG W，WALBOOMERS XF，SHI S，*et al*. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng，2006，12(10)：2813-2823.

[9] MORI G，BRUNETTI G，ORANGER A，*et al*. Dental pulp stem cells：osteogenic differentiation and gene expression. Ann N Y Acad Sci，2011，1237：47-52.

[10] PIERDOMENICO L，BONSI L，CALVITTI M，*et al*. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. Transplantation，2005，80(6)：836-842.

[11] 何　飞，谭颖徽，张　纲. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定. 华西口腔医学杂志，2005，23(1)：75-78.

[12] ZHANG S，YANG X，FAN M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. Int Endod J，2013，46(10)：923-929.

[13] MURRAY PE，MATTHEWS JB，SLOAN AJ，*et al*. Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages. Arch Oral Biol，2002，47(10)：709-715.

[14] BAKOPOULOU A，LEYHAUSEN G，VOLK J，*et al*. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). Arch Oral Biol，2011，56(7)：709-721.

（2018－03－24 收稿，2018－06－21 修回）

编辑　汤　洁