

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.01.008

文章编号: 1005-8982 (2019) 01-0045-05

富血小板纤维蛋白对人牙髓干细胞增殖、凋亡及碱性磷酸酶活性的影响

项海东, 田松波, 陈惠珍

(河北医科大学第二医院 口腔内科, 河北 石家庄 050000)

摘要: **目的** 探讨富血小板纤维蛋白 (PRF) 对人牙髓干细胞增殖、凋亡及碱性磷酸酶活性的影响及机制。**方法** 从人牙髓组织中分离出人牙髓干细胞 (hDPSCs), hDPSCs 随机分为对照组及实验组, CCK8 实验检测 PRF 刺激 hDPSCs 第 0、1、3、5 及 7 天时细胞增殖情况; RT-PCR 检测 PRF 刺激 hDPSCs 第 0、3、7 及 14 天时碱性磷酸酶 (ALP) 的 mRNA 表达情况; 流式细胞仪检测 PRF 刺激 hDPSCs 7 d 后细胞的凋亡情况, Western blotting 检测活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved Caspase-3)、p38、p-p38 蛋白表达。**结果** 实验组第 1 天时细胞的增殖与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 第 3、5、7 天时细胞的增殖均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组第 3 天时 ALP mRNA 表达与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 第 7 和 14 天时 ALP mRNA 表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞的凋亡率及 Cleaved Caspase-3 蛋白、p-p38 蛋白表达实验组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组细胞的凋亡率及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达均下降, p-p38 蛋白表达上调, p38 蛋白表达两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** PRF 可促进 hDPSCs 的增殖, 上调 ALP 的 mRNA 表达, 抑制其凋亡, 其机制与激活 p38 信号通路有关。

关键词: 纤维蛋白; 人牙髓干细胞; 牙髓; 细胞增殖; 细胞凋亡; 碱性磷酸酶

中图分类号: R783.4

文献标识码: A

Effect of PRF on proliferation, apoptosis and alkaline phosphatase activity of human dental pulp stem cells

Hai-dong Xiang, Song-bo Tian, Hui-zhen Chen

(Department of Oral Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University,
Shijiazhuang, Hebei 050000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of PRF on proliferation, apoptosis and alkaline phosphatase activity of human dental pulp stem cells. **Methods** Human dental pulp stem cells (hDPSCs) were isolated from human dental pulp tissue, and were randomly divided into control group and experimental group. Cells in experimental group were co-incubated with PRF for 7 days. Cell proliferation and apoptosis were detected by CCK8 assay and flow cytometry on day 0, 1, 3, 5 and 7, respectively. Expression of alkaline phosphatase, Cleaved Caspase-3, p38 and p-p38 were measured by RT-PCR and Western blotting on day 0, 3, 7, 14. **Results** Cell proliferation was enhanced significantly on day 3, 5 and 7 compared with control group ($P < 0.01$). Expression of alkaline phosphatase were increased significantly on day 7 and 14 when compared with that in control group ($P < 0.01$). Cells apoptosis rate and expression of cleaved Caspase-3 were decreased while expression of p-p38 was increased significantly compared with those in control group ($P < 0.01$). No significant difference in p38 protein was

收稿日期: 2018-03-19

[通信作者] 陈惠珍, E-mail: kqchenhuiizhen@163.com

observed between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** PRF promotes the proliferation and inhibits the apoptosis of hDPSCs cells through mediation of p38 signaling pathway.

Keywords: fibrin; stem cells; dental pulp; cell proliferation; apoptosis; alkaline phosphatase

牙髓干细胞 (dental pulp stem cells, DPSCs) 来自于成年机体的牙髓组织, 是具有多向分化潜能和自我更新的未分化细胞。正常情况下, DPSCs 处于静息状态, 维持牙髓中细胞的功能及新旧交替的稳态, 当牙髓中的成牙本质细胞受到损伤后, DPSCs 可参与牙髓的修复与重建。因此, DPSCs 被认为是影响牙髓牙本质复合体形成的理想种子细胞^[1-2]。目前已发现多种在体内及体外影响 DPSCs 增殖及分化的因素。富血小板纤维蛋白 (platelet-rich fibrin, PRF) 是新一代的血小板浓缩制品, 富含血管内皮生长因子、血小板衍生长因子、转化生长因子等多种生长因子, 这些因子可构成强大的组织修复功能调节系统, 目前已被应用于基础细胞的研究^[3-4]。但 PRF 对 DPSCs 的影响及机制尚不清楚。因此, 本研究旨在探讨 PRF 对 DPSCs 的增殖、分化、凋亡的影响及机制, 以期为牙髓再生带来新的契机。

1 资料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、青链霉素购自美国 Sigma 公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒、细胞计数试剂盒 (cell counting Kit-8, CCK8)、膜联蛋白 V (Annexin V) - 异硫 / 碘化丙锭 (propidium iodide, PI) 凋亡试剂盒均购自中国碧云天生物技术有限公司, 活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Cleaved Caspase-3)、p38、p-p38 单克隆抗体及辣根过氧化物标记的二抗均购自美国 abcam 公司, 实时定量聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒、逆转录试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。RT-PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, CO₂ 细胞培养箱购自美国 SIM 公司, 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司, 酶标仪、电泳凝胶图像分析系统、聚丙烯酰胺凝胶电泳仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 人牙髓干细胞 (hDPSCs) 的分离培养

收集河北医科大学第二医院口腔科志愿者 (16 ~ 25 岁) 阻生第 3 磨牙, 即刻放入预冷及加入青链霉素双抗的 α -MEM 培养基中培养保存。无菌条

件下取出牙髓组织, 用 0.01 mol/L 的 PBS 清洗 2 次, 小剪刀将牙髓组织剪成 1 ~ 2 mm 的小组织块, 按照 1 : 1 比例加入 0.4% 的分散酶和 0.3% 的 I 型胶原酶, 37℃ 消化 1 h, 轻轻吹打离散单细胞团块, 过 70 μ m 的细胞筛网, 1 000 r/min 离心 5 min, 0.01 mol/L 的 PBS 清洗 1 遍。细胞沉淀用高糖 DMEM 培养基 (含 20% 的胎牛血清) 重悬, 以 1×10^5 个 /ml 密度接种于细胞培养瓶中, 置于 37℃, 5% CO₂, 95% 饱和湿度的培养箱中培养。每 3 天换液 1 次, 细胞生长密度达到 80% ~ 90% 时, 用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化后传代。收集生长至对数期的第 2 代 hDPSCs 进行纯化后再用于后续的实验研究。

1.3 PRF 的制备

血液来自河北医科大学第二医院口腔科 10 例健康的志愿者, 平均 26 岁 (22 ~ 28 岁), 均签署知情同意书。无菌条件下每个志愿者抽取 5 ml 静脉血于真空中, 3 000 r/min 离心 10 min, 静置数分钟后, 弃去上清, 收集中间层 (中间层为 PRF), 将 PRF 凝胶与试管底部的红细胞分离出来, 所获得的 PRF 膜用来制备渗液。将 PRF 膜放置在预先盛有 2 ml / 孔的 DMEM 培养基的 6 孔板中, 1 孔 / 板, 培养板置于孵育箱中继续孵育, 4℃ 放置 7 d 后收集 6 孔板中的培养液, 3 000 r/min 离心 15 min 以沉淀红细胞, 然后使用 0.22 μ m 的无菌滤器过滤除菌。将收集的 PRF 浸出液分装, 置于 -80℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.4 细胞增殖检测

hDPSCs 随机分为对照组及实验组。将第 3 代 hDPSCs 以 1×10^4 个 / 孔接种于 6 孔细胞培养板中, 37℃, 5% CO₂, 95% 饱和湿度的培养箱中培养。培养第 1、3、5 及 7 天时, 每孔细胞中加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱孵育 2 h, 酶标仪在 490 nm 波长处测定并记录各组的光密度 (OD) 值。计算细胞存活率, 细胞存活率 = (实验组 A / 对照组 A) $\times$ 100%。

1.5 碱性磷酸酶 (ALP) 活性检测

hDPSCs 随机分为对照组及实验组。每组设置第 0、3、7、14 天 4 个时间点。以 2×10^4 个 /ml 的密度将生长至对数期的第 4 代 hDPSCs 的单细胞悬液接种于 6 孔细胞培养板中, 置于 37℃, 5% CO₂

培养箱中培养至相应时间后,用 Trizol 法提取细胞中的总 RNA,以逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参,RT-PCR 检测 ALP 的 mRNA 表达。ALP 引物序列:正向:5'-GGCTGGA GATGGACAAGTTC-3',反向:5'-CTCGTTTCCTGAGT CGTGT-3';GAPDH 引物序列:正向:5'-AAGAGTGGG TTTAAGTGGGAAGGCT-3',反向:5'-GAAGATGGTGAT GGGATTTC-3'。PCR 反应参数:A,预变性 95℃ 10 min;B,变性 95℃ 10 s;退火 60℃ 15 s,延伸 72℃ 20 s,共 40 个循环;C,72℃ 15 min。4℃ 终止反应。每个样品设置 3 个重复,取均值采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行相对定量分析。

1.6 细胞凋亡检测

收集按照上述分组培养第 7 天的细胞,预冷的 PBS 及结合缓冲液各洗涤细胞 1 次后,离心弃上清,加入 400 μ l 的结合缓冲液重悬细胞,细胞沉淀加入 5 μ l 的 PI 和 Annexin-V-FITC,充分混匀后置于室温下避光孵育 10 ~ 15 min,离心沉淀细胞,缓冲液洗涤细胞 1 次,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.7 Western blotting 检测 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 蛋白表达

收集按照上述分组培养第 7 天的细胞,按照细胞蛋白提取试剂盒提取细胞中的蛋白,BCA 试剂盒检测提取的蛋白质量。将蛋白样品与上样缓冲液等量混匀后置于 100℃ 变性 10 min,依次进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离、转膜、封闭、一抗孵育 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 1:400 稀释,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),1:1000 稀释、二抗孵育辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,1:1000 稀释,37℃ 孵育 1 h,洗膜 3 次,ECL 发光剂显影,自动凝胶成像系统采集图像。以 GAPDH 作为内参,分析 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 的蛋白表达水平。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 t 检验,两组多时间点的比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PFR 对 hDPSCs 增殖的影响

对照组在第 0、1、3、5 及 7 天的 OD 值分别为

(0.18 ± 0.04)、(0.25 ± 0.06)、(0.36 ± 0.07)、(0.48 ± 0.08)、(0.63 ± 0.09),实验组在第 0、1、3、5 及 7 天的 OD 值分别为(0.20 ± 0.05)、(0.28 ± 0.07)、(0.59 ± 0.08)、(0.73 ± 0.09)、(0.90 ± 0.08)。对照组与 PRF 组第 0、1、3、5 及 7 天的 OD 值比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的 OD 值有差异($F=13.243, P=0.000$);②对照组与 PRF 组 OD 值有差异($F=17.276, P=0.000$);③对照组与 PRF 组 OD 值变化趋势有差异($F=19.417, P=0.000$)。见图 1。

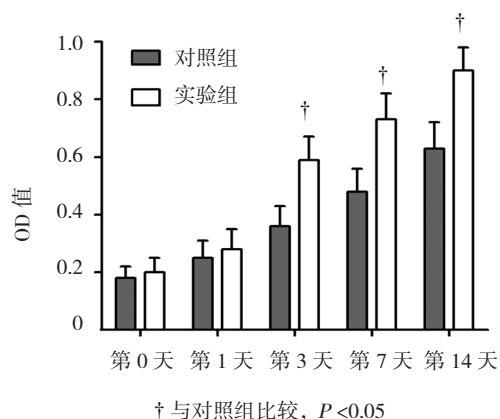


图1 PFR对hDPSCs增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 PFR对hDPSCs矿化相关基因ALP表达的影响

对照组在第 0、3、7 及 14 天 ALP mRNA 表达分别为(0.883 ± 0.112)、(1.231 ± 0.163)、(1.624 ± 0.152)、(1.913 ± 0.164),实验组分别为(0.925 ± 0.144)、(1.284 ± 0.192)、(2.422 ± 0.321)、(2.695 ± 0.371),两组第 0、3、7 及 14 天 ALP mRNA 表达比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点间 ALP mRNA 表达有差异($F=17.191, P=0.000$);②两组 ALP mRNA 表达有差异($F=19.841, P=0.000$);③两组 ALP mRNA 表达变化趋势有差异($F=18.358, P=0.000$)。见图 2。

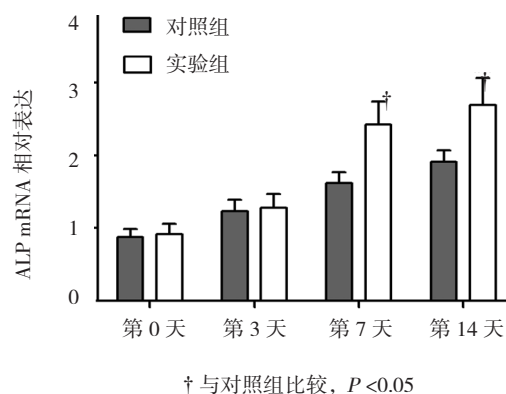
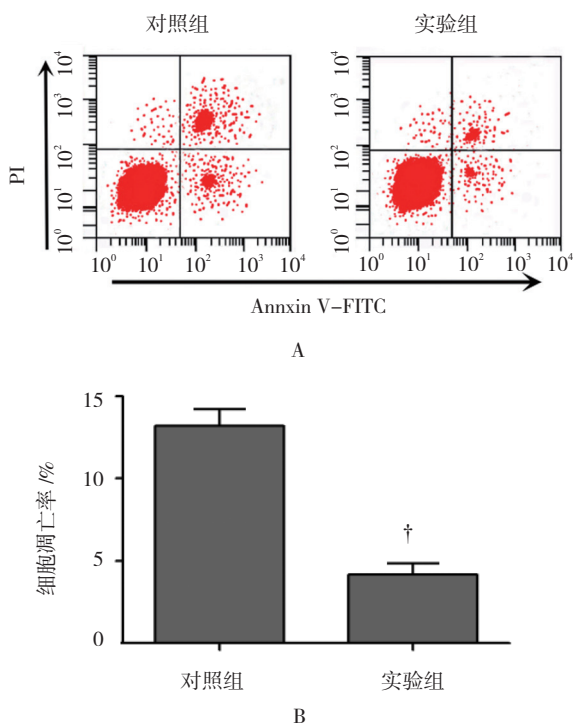


图2 PFR对hDPSCs的ALP mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 PFR 对 hDPSCs 凋亡的影响

实验组细胞的凋亡率 (4.18 ± 0.67) % 较对照组 (13.21 ± 1.02) % 下降 ($t=12.816, P=0.000$)。见图 3。

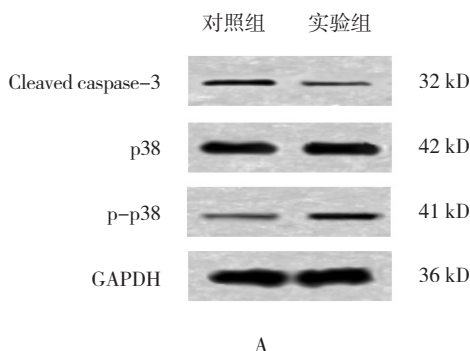


A: 流式细胞仪检测结果; B: 细胞凋亡率。† 与对照组比较, $P < 0.05$

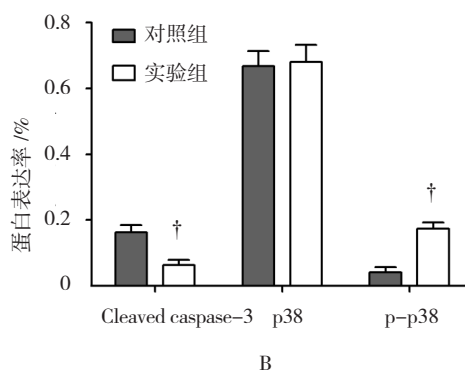
图 3 PFR 对 hDPSCs 凋亡的影响

2.4 PFR 对 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 蛋白表达的影响

对照组 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 的蛋白表达分别为 (0.162 ± 0.023)、(0.668 ± 0.046)、(0.041 ± 0.016)，实验组 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 的蛋白表达分别为 (0.063 ± 0.016)、(0.681 ± 0.051)、(0.174 ± 0.019)，实验组 Cleaved Caspase-3 蛋白表达较对照组下调 ($t=0.120, P=0.004$)、p-p38 蛋白表达上调 ($t=9.274, P=0.001$)，p38 蛋白在两组间比较差异无统计学意义 ($t=0.328, P=0.760$)。见图 4。



A



A: Western blotting 检测结果图; B: 蛋白表达率; † 与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 PFR 对 Cleaved Caspase-3、p38、p-p38 蛋白表达的影响

3 讨论

近些年来, 利用干细胞治疗已成为再生医学研究的热点^[5]。干细胞可分为成体干细胞和胚胎干细胞。DPSCs 是成体干细胞的一员, 可分化为脂肪干细胞和神经干细胞, 也可形成牙本质牙髓细胞。牙本质牙髓细胞是未来牙形成的第一步, 这也说明 DPSCs 在活髓的保存及治疗中有临床应用价值及潜在的优势^[5]。PRF 是继富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 后的新一代血小板浓缩制品, 富含纤维蛋白原、多种生长因子及高浓度的血小板, 可诱导内皮细胞、成骨细胞等的增殖、分化等过程^[6]。研究显示, PRF 可在体外促进牙槽骨成骨细胞的增殖及分化, 可以不同的方式促进犬 DPSCs 的增殖及分化^[7-8]。ALP 是一种磷酸单酯水解酶, 是成骨细胞成熟的早期标志物之一, 参与骨的形成及代谢过程, 其活性的增强是 DPSCs 向成牙本质细胞分化的早期标志^[9]。本研究结果显示, PRF 可促进 DPSCs 的增殖和分化。

细胞凋亡过程受到 Caspase 家族的调控, Caspase-3 是 Caspase 家族的一员, 是细胞凋亡通路中关键性的活化酶, 处在 Caspase 级联反应的下游, 其激活可导致细胞的凋亡^[10]。研究显示, Caspase-3 的激活可引起 DPSCs 的凋亡^[11]。本研究结果显示, PRF 可抑制 DPSCs 的凋亡及下调 Cleaved Caspase-3 蛋白表达。

丝裂原活性蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 属于丝蛋白 / 苏氨酸激酶, 参与细胞的增殖及死亡、基因表达调控等过程, 在多种信号的传递过程中有重要作用^[12]。p38 MAPK 信号通路是 MAPK 信号通路家族中重要一员, 参与牙髓干细胞向成牙本

质细胞分化等过程^[13]。研究显示,阿司匹林可通过抑制 p38 MAPK 信号通路抑制 DPSCs 的增殖及分化^[14]。p38 MAPK 信号通路抑制剂可抑制 ALP 的活性和成牙本质样细胞的分化,在初期牙本质及第3期反应性牙本质形成过程中,可发现 p38 MAPK 信号通路的激活^[15]。本研究结果显示,PRF 可上调 p-p38 蛋白的表达。

综上所述,PRF 可通过激活 p38 信号通路促进 hDPSCs 的增殖,上调 ALP mRNA 表达,抑制其凋亡。该研究为牙髓损伤修复及再生带来了新的思路。

参 考 文 献:

- [1] HWANG H I, LEE T H, KANG K J, et al. Immunomic screening of cell surface molecules on undifferentiated human dental pulp stem cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2015, 24(16): 1934-1945.
- [2] GALLER K M, WIDBILLER M, BUCHALLA W, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells[J]. *International Endodontic Journal*, 2016, 49(6): 581-590.
- [3] HASAN S, WEINBERG M, KHATIB O, et al. The effect of platelet-rich fibrin matrix on rotator cuff healing in a rat model[J]. *International Journal of Sports Medicine*, 2016, 37(1): 36-42.
- [4] KIM T H, KIM S H, SÁNDOR G K, et al. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing[J]. *Archives of Oral Biology*, 2014, 59(5): 550-558.
- [5] YASUI T, MABUCHI Y, TORIUMI H, et al. Purified human dental pulp stem cells promote osteogenic regeneration[J]. *Journal of Dental Research*, 2016, 95(2): 206-214.
- [6] PATEL S, DHILLON M S, AGGARWAL S, et al. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial[J]. *The American Journal of Sports Medicine*, 2013, 41(2): 356-364.
- [7] PRADEEP A R, KARVEKAR S, NAGPAL K, et al. Rosuvastatin 1.2 mg in situ gel combined with 1: 1 mixture of autologous platelet-rich fibrin and porous hydroxyapatite bone graft in surgical treatment of mandibular class II furcation defects: A randomized clinical control trial[J]. *Journal of Periodontology*, 2016, 87(1): 5-13.
- [8] LI X, HOU J, WU B, et al. Effects of platelet-rich plasma and cell coculture on angiogenesis in human dental pulp stem cells and endothelial progenitor cells[J]. *Journal of Endodontics*, 2014, 40(11): 1810-1814.
- [9] FENG G, ZHENG K, SONG D, et al. SIRT1 was involved in TNF- α -promoted osteogenic differentiation of human DPSCs through Wnt/ β -catenin signal[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2016, 52(10): 1001-1011.
- [10] 杨文慧, 郭涛, 杨莉, 等. 体外心脏震波对大鼠心肌梗死后心肌凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(2): 265-267.
- [11] ZHU Q, TIAN G, TANG Z, et al. Adrenomedullin promotes the proliferation and inhibits apoptosis of dental pulp stem cells involved in divergence pathways[J]. *Journal of Endodontics*, 2016, 42(9): 1347-1354.
- [12] 周丹, 涂悦, 张赛. MAPK 信号通路在颅脑创伤中作用的研究进展[J]. *中华神经外科杂志*, 2016, 32(4): 427-429.
- [13] SHEN S, HUANG D, FENG G, et al. MEF2 Transcription factor regulates osteogenic differentiation of dental pulp stem cells[J]. *Cellular Reprogramming (Formerly Cloning and Stem Cells)*, 2016, 18(4): 237-245.
- [14] GAO Q, WALMSLEY A D, COOPER P R, et al. Ultrasound stimulation of different dental stem cell populations: role of mitogen-activated protein kinase signaling[J]. *Journal of Endodontics*, 2016, 42(3): 425-431.
- [15] FENG X, SHEN S, CAO P, et al. The role of oncostatin M regulates osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells through STAT3 pathway[J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(6): 2699-2709.

(王荣兵 编辑)