基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0873-04

成骨生长肽对钛表面人牙周膜成纤维细胞增殖分化影响的研究

周雯雯,王 璐,徐 凌
(重庆医科大学附属口腔医院修复科,重庆 400015)

【摘 要】目的:研究成骨生长肽(Osteogenic growth peptide,OGP)对人牙周膜成纤维细胞(Periodontal ligament cells,PDLCs)在钛金属表面增殖分化的影响。方法:将纯钛试件放在 12 孔培养板内,取生长良好的第五代人牙周膜成纤维细胞接种在试件表面,加入不同浓度的 OGP(10^{-11} ~ 10^{-7}mol/L),分别在接种后 1、3、5、7 d 应用 MTT 法检测细胞增殖;接种后 3、7、10 d 应用酶联免疫法检测细胞内碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性的表达。结果:OGP 在该浓度范围内时,对钛表面的人牙周膜成纤维细胞的增殖率有明显的促进作用($P<0.05$),并且能促进细胞内 ALP 表达活性($P<0.05$),最佳作用浓度为 10^{-9}mol/L。结论:OGP 可促进钛片表面人牙周膜成纤维细胞的增殖活性,同时可以增强细胞碱性磷酸酶表达的活性,提示 OGP 在口腔种植领域中具有良好的应用前景。

【关键词】成骨生长肽;人牙周膜成纤维细胞;细胞增殖;碱性磷酸酶
【中国图书分类法分类号】R78 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-10

Effects of osteoblastic growth peptide on the proliferation in human periodontal ligament cells located on titanium disc in vitro.

ZHOU Wen-wen, et al
(*Department of Periodontics, the Affiliated Stomatologic Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To elucidate the effect of osteogenic growth peptide(OGP) on proliferation and differentiation of human periodontal ligament cells on titanium disc in vitro. *Methods*: Human periodontal ligament cells were cultured located on titanium disc individually in medium contained various concentrations of OGP; and cell proliferation quantity were examined by MTT and alkaline phosphatase activity were examined by enzyme-linked immunosorbentassay. *Results*: In vitro, the addition of OGP in cultures resulted in an increase of cell proliferation and ALP activity ($P<0.05$). All OGP concentrations used (10^{-11}~10^{-7}mol/L) were effective but the maximum response was obtained with 10-9mol/L OGP. *Conclusion*: Our results demonstrate that OGP stimulates proliferation and ALP expression of human periodontal ligament cells located on titanium disc in vitro and suggest that OGP is a promising growth factor in the region of oral implant.

【Key words】Osteogenic growth peptide; Human periodontal ligament cells; Proliferation; ALP

随着种植技术的日臻完善,种植体 - 软组织界面的良好结合成为种植义齿成败的关键。牙周膜成纤维细胞(Periodontal ligament cells,PDLCs)是种植体 - 软组织界面中的重要组成成分。如何促进牙周膜成纤维细胞在钛种植体表面附着和生长,越来越受到国、内外学者的关注。成骨生长肽(Osteogenic growth peptide,OGP)是新近发现的促进有丝分裂的多肽类生长因子[1]。本实验的目的是应用人牙周膜成纤维细胞体外培养模型,观察 OGP 对 PDLCs 在钛金属表面附着和生长的影响,从而为临床研究工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要的实验试剂和仪器

改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco,DMEM)(Gibco,USA),胎牛血清(Hyclone,USA),OGP(Sigma,USA),胰蛋白酶(Gibco,USA),3-(4,5- 二甲基噻唑 -2)-2,5- 二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT)(Gibco,USA),二甲基亚砜(分析纯),考马斯亮兰(Sigma,USA),牛血清白蛋白 BSA(Sigma,USA),碱性磷酸酶(Alkaline phospha tase, ALP)检测

作者介绍:周雯雯(1983-),女,硕士,
研究方向:口腔组织工程学。
通讯作者:徐 凌,男,副教授,E-mail:xh1201@163.com。

试剂盒（南京建成公司）。CO_2 恒温培养箱，YJ-2450 医用净化工作台（苏州净化设备厂），倒置相差显微镜（Olympus，Japan），HTS7000plus 多孔板高效分析仪（PE，USA），钛片（宝鸡科迪普有色金属加工有限公司）。

1.2 钛片的制备

钛片由西安宝鸡科迪普有色金属加工有限公司制备提供。具体方法：用直径 10 mm 纯钛棒线切割成 1 mm 厚的圆钛片，以金相砂逐级打磨至 1 200 目，直至表面平滑、呈现灰白的金属色为止，然后用丙酮、75%乙醇和去离子水在超声清洗器（KQ250）轮流清洗 15 min，以除去材料表面机械加工而残留的油污，40℃烤箱烘干，即得到所需的钛片。

1.3 人 PDLCs 的体外培养及来源鉴定

取临床上因正畸需要拔除的牙周健康、无龋的新鲜第一前磨牙，在无菌条件下用无血清 DMEM 培养液冲洗牙根面 3 遍；用刀片刮取牙根中 1/3 的牙周膜组织，剪成 0.2 mm × 0.2 mm 大小碎块，均匀铺散于培养瓶瓶底；瓶底向上，在 37 ℃、饱和湿度、5%CO_2 孵箱中孵育 4 h，待组织块贴壁牢固后，翻转培养瓶，加入 5 ml 含 10%胎牛血清的 DMEM 继续培养。待细胞从组织块周围游出并铺满培养瓶瓶底后，用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代，取 4～6 代细胞用于实验。取第五代细胞行波形丝蛋白及角蛋白免疫组化染色，予以鉴定。

1.4 不同浓度 OGP 对钛表面人 PDLCs 增殖率的 MTT 检测

实验分为 6 组：即对照组、10^{-11} mol/L OGP 组、10^{-10} mol/L OGP 组、10^{-9} mol/L OGP 组、10^{-8} mol/L OGP 组和 10^{-7} mol/L OGP 组。将生长良好的第五代人 PDLCs，按每孔 1×10^4 个/200 μl 细胞密度接种于 24 孔细胞培养板中的钛片表面，按上述分组方案，每组设 5 个复孔。12 h 细胞贴壁后，在各孔内换入相应的培养液，继续培养。在 1、3、5、7 d 4 个时间段，吸去培养液，PBS 液洗 3 次，收集样本。在所需检测培养孔内的钛片表面加入 MTT 溶液（5 mg/ml）30 μl，37 ℃继续孵育 4 h，终止培养，小心吸弃孔内培养上清夜，每孔加入 300 μl 二甲基亚砜（DMSO），室温下振荡 10 min，待结晶充分溶解后转移至 96 孔培养板中，选择 490 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值（A）。

1.5 不同浓度 OGP 对人 PDLCs ALP 表达活性的影响

实验分为 6 组：即对照组、10^{-11}mol/L OGP 组、10^{-10} mol/L OGP 组、10^{-9} mol/L OGP 组、10^{-8} mol/L OGP 组和 10^{-7} mol/L OGP 组。取生长良好的第五代人 PDLCs，按每孔 1×10^4 个/200 μl 细胞密度接种于 24 孔细胞培养板中的钛片表面，按上述分组方案，每组设 8 个复孔，5 个孔用于碱性磷酸酶活性测定，剩余 3 个孔用于细胞计数。12 h 细胞贴壁后，在各孔内换入相应的培养液，继续培养。在第 3、7、10 d 后，对行 ALP 检测各孔，弃孔内液体，用 PBS 液冲洗 3 次，吸干，每孔加入 200 μl 的 2 ml/L Triton X-100，振荡 30 min。倒置显微镜镜下观察，见细胞破碎、已无完整细胞结构后，每孔加入 37 ℃的保温工作液 250 μl，在酶联免疫检测仪上选择 405 nm 波长测定吸光度值（A），再乘以系数 1.383 求出样本中 ALP 活性（U/L）。每组剩余 3 个孔的细胞用消化液消化后配置成 300 μl 的细胞悬液，用计数板进行计数。最后计算出各实验组中的每个细胞内相对的 ALP 活性值。

1.6 统计学处理

实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计分析软件进行处理。采用单因素方差分析处理组间各值，$P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 人 PDLCs 培养

倒置显微镜下观察，可见原代培养第 5～8 d 时有细胞从组织块中游离出来，成长梭形或星形，胞体丰满，胞突细长，胞质均匀，中央胞核呈椭圆形或圆形，核仁清晰。14 d 左右细胞长满培养瓶底，呈放射状、漩涡状排列。免疫细胞化学染色显示细胞波形丝蛋白染色阳性，角蛋白染色阴性，提示细胞来源于外胚间充质。见图 1～3。

2.2 不同浓度 OGP 对钛表面人 PDLCs 增殖率的影响

见表 1。由表可见，实验组细胞的吸光度值较高，与对照组相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。说明当 OGP 浓度在 10^{-11}～10^{-7} mol/L 范围内时，能明显促进钛片表面细胞的增殖活动。在各实验组中，OGP 浓度为 10^{-9} mol/L 时，促进细胞增殖作用最强，与其它实验组比较，差异也有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 不同浓度 OGP 对钛表面人 PDLCs ALP 表达活性的影响

见表 2。实验组在培养第 3、7、10 d，ALP 表达活性高于对照组（$P<0.05$）。当 OGP 浓度为 10^{-9} mol/L 时，增加细胞内 ALP 活性作用最为明显，ALP 活性表达达到最大值，且与其它实验组相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨 论

种植义齿具有良好的固位、稳定和支持作用，咀嚼功能良好且戴用舒适，近年来广泛地应用于口腔修复临床中。尽管种植义齿有诸多优点，但是种植体失败的问题在很大程度上限制了其更广泛的应用，尤其表现在种植体－软组织的连接上。在临床上，种植体的失败首先表现在软组织正常结构的破坏，甚至丧失，最终出现被称为“种植体周围炎”的类似于慢性牙周炎的一系列表现，如种植体周软、硬组织炎症，种植体周袋形成，种植体周骨吸收等[2]。因此，获得质量良好的种植体－软组织界面是一个急待解决的问题。促进牙周膜细胞在种植体表面附着和生长，是形成并保持穿粘膜处种植体颈部牙龈上皮屏障，防止口腔内细菌等破坏因素侵蚀颌骨，以及提高种植体成功率的有效途径。生长因子以其独特的生

表 1 实验组和对照组人牙周膜细胞吸光度值($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

分组(mol/L)	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	0.59 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.96 ± 0.07	1.15 ± 0.03
10^{-11}	0.83 ± 0.08*	0.96 ± 0.11*	1.19 ± 0.08*	1.31 ± 0.04*
10^{-10}	0.88 ± 0.09*	1.16 ± 0.07*	1.23 ± 0.08*	1.36 ± 0.05*
10^{-9}	0.96 ± 0.06*△	1.27 ± 0.06*△	1.36 ± 0.12*△	1.46 ± 0.09*△
10^{-8}	0.98 ± 0.08*	1.15 ± 0.07*	1.24 ± 0.11*	1.37 ± 0.08*
10^{-7}	0.84 ± 0.04*	1.01 ± 0.09*	1.18 ± 0.07*	1.29 ± 0.06*

*$P<0.05$,与对照组相比较;△$P<0.05$,与其它实验组相比较

表 2 实验组和对照组人牙周膜细胞 ALP 活性(mU/mg)($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

分组(mol/L)	ALP 活性(mU/mg)		
	3 d	7 d	10 d
10^{-11}	184.12 ± 13.97*	324.36 ± 25.57*	475.29 ± 39.93*
10^{-10}	196.85 ± 13.81*	368.48 ± 31.13*	491.51 ± 23.69*
10^{-9}	326.29 ± 25.24*△	395.12 ± 27.39*△	583.57 ± 32.61*△
10^{-8}	242.56 ± 11.65*	372.72 ± 29.23*	517.29 ± 34.59*
10^{-7}	255.47 ± 11.11*	354.29 ± 31.69*	490.67 ± 23.21*
对照组	149.21 ± 18.24	220.24 ± 13.20	292.25 ± 20.63

*$P<0.05$,与对照组相比较;△$P<0.05$,与其它实验组相比较



图 1 原代培养接种 3、4 d 后可见单个细胞贴壁(×400)



图 3 免疫细胞化学染色,Keratin 染色阴性(×200)

物学效应,对细胞的生长代谢起着调控作用。国内外学者对多种生长因子进行了相应研究,如骨形成蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)、血小板衍生生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)、碱性纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子 β1(Transforming growth factor β1, TGF-β1)、胰岛素样生长因子Ⅱ(Insulin-like growth factor, IGF-Ⅱ)等。但是这些生长因子在免疫原性、自身调节、临床使用成本等方面存在着各自的不足。因此,寻找

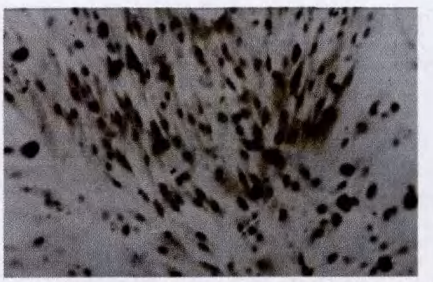


图 2 免疫细胞化学染色,Vimentin 染色阳性(×200)

合适的生长因子,促进 PDLCs 在种植体表面附着生长,这在口腔种植修复领域具有重要的临床意义。

1992 年,Bab 等首先报道了愈合的骨髓组织能产生促进成骨细胞增殖的活性因子,通过进一步分离、纯化,得到一个 14 个氨基酸组成的多肽,命名为成骨生长肽[1]。研究证实OGP 对细胞有促有丝分裂活性[3-5]。本实验观察 OGP 对 PDLCs 在钛金属表面附着和生长的影响。MTT 检测结果显示,OGP 组钛表面细胞附着数与空白对照组的差异有显著性($P<0.05$),其最佳 OGP 浓度为 10^{-9} mol/L。这表明 OGP 促细胞附着的作用和促细胞生长的作用均显著。同时国内外学者也普遍认为生长因子应用于牙周组织再生,应促进 PDLCs 成骨细胞表型的表达[3,4]。ALP 被普遍认为是成骨细胞分化和功能的标志。体外实验已证实,没有 ALP 的存在,钙化就不会发生[6]。本实验结果显示,OGP 对人 PDLCs 中 ALP 活性有促进作用。体外 OGP 最佳促进 ALP 活性的浓度为 10^{-9}mol/L, 这与 Gabet 等报道的 OGP 对成骨细胞作用结果相符。他们认为 OGP 的浓度达到某一临界点后,对细胞 ALP 活性有明显促进作用[8]。

已有的研究发现 OGP 氨基酸序列短,免疫原性低,远远小于其它外源性生长因子。其氨基酸序列在啮齿类和人类完全一致,大多数动物具有同源性。这种进化上的保守性暗示了 OGP 具有潜在的生物学价值和医学价值。并且自身调节极其敏感,已有研究证实外源性 OGP 加入,浓度从较适宜至最适宜变化时,正向调控内源性 OGP 产生,呈剂量依赖型;超出最适浓度时,呈负调控[7-10]。这也为临床使用的安全性提供了可靠的保障。

OGP 在口腔种植修复领域具有良好的应用前景,但其临床应用仍需进一步的动物实验提供依据。

参 考 文 献

[1] Bab I,Gazit D,Chorev M,et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP):a novel circulating stimulator of osteoblastic activity[J]. EMBO J,1992,11(5):1867-1873.

[2] 巢永烈,梁 星,主编. 种植义齿学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1999.32-40.

[3] Chen Z X,Chang M,Peng Y L,et al.Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP (10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes[J]. Regul Pept, 2007,142(1-2):16-23.

[4] 王 璐,徐 凌,梁 星,等. 成骨生长肽对大鼠骨髓基质细胞增殖分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007,11(18):52-55.

[5] 徐 凌,梁 星,黄 姣,等. 成骨生长肽对大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞增殖和分化的影响[J].四川大学学报(医学版),2006,37(3):445-448.

[6] 田卫东,高贤华,王大章,等. 生长因子网络调节对骨形成作用的研究 -Ⅵ. 多种生长因子联合应用对人胚成骨样细胞增值及分化的影响[J]. 华西医科大学学报,1999,30(3):1636-1640.

[7] Spreafico A,Frediani B,Capperucci C,et al. Osteogenic growth peptide effects on primary human osteoblast cultures:potential relevance for the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis[J].J Cell Biochem, 2006,98(4):1007-1020.

[8] Gabarin N,Gavish H,Muhlrad A,et al. Mitogenic G (i) protein-MAP kinase signaling cascade in MC3T3-E1 osteogenic cells: activation by C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)] and attenuation of activation by cAMP[J].J Cell Biochem,2001,81(4):594-603.

[9] Fazzi R,Pacini S,Testi R,et al. Carboxy-terminal fragment of osteogenic growth peptide in vitro increases bone marrow cell density in idiopathic myelofibrosis[J].Br J Haematol,2003,121(1):76-85.

[10] Bab I, Chorev M.Osteogenic growth peptide: from concept to drug design[J]. Biopolymers,2002,66(1):33-48.

(责任编辑:关蕴良)

读者·编者·作者

校 对 须 知

为保证作者文稿刊出准确无误,本编辑部将排版后的校样一律交作者校对,请作者务必在校样上按以下要求校对:

1. 对正文(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对(诵读),毋需重新打字。不能增加图表或成句的文字。

2. 若发现错误,请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范汉字);必须改动的字符,宜在样稿的空白处写出(毋需重描编辑已改过的字符),所增删的字数最好相等。

3. 样稿中编者提出的问题(有"?"处)请予改正或作出解释,参考文献的缺项的内容,按本学报规定格式补充。务请作者认真核实所引用的文献是否正确,并核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应。

4. 请核实(或补充)作者介绍,包括出生年、性别、职称等信息。

5. 请用规范药名(不用商品名)及医学名词;认真核查法定计量单位及药物剂量。

6. 若特殊情况需要样稿,请作者自行复印留底。

7. 若不能在规定时间内校回,本编辑部只能将文稿延期出版。

本刊编辑部

2010 年 6 月