基础研究 文章编号：0253-3626(2009)04-0420-04

成骨生长肽对人牙周膜细胞增殖和总蛋白含量的影响

徐 凌[1]，黄 姣[2]，向学熔[2]

（1. 重庆医科大学附属口腔医院修复科，重庆 400015；2. 重庆医科大学附属口腔医院牙周科，重庆 400015）

【摘 要】目的：研究成骨生长肽（Osteogenic growth peptide，OGP）对体外培养的人牙周膜细胞增殖和细胞总蛋白含量的影响。方法：在体外培养的人牙周膜细胞中加入不同浓度的 OGP（10^{-11}～10^{-7}mol/L），用 MTT 法检测细胞的增殖率；考马斯亮蓝染色法检测细胞内总蛋白含量的变化。结果：OGP 在该浓度范围内时，对人牙周膜细胞的增殖率有明显的促进作用（$P<0.05$），并且在该浓度范围内时，能明显增加人牙周膜细胞总蛋白的合成（$P<0.05$），最佳作用浓度为 10^{-9} mol/L。结论：OGP 可促进人牙周膜细胞的增殖活性，同时可以增强细胞总蛋白的合成，提示 OGP 在牙周组织再生领域中具有良好的应用前景。

【关键词】成骨生长肽；人牙周膜细胞；细胞增殖；总蛋白含量

【中国国书分类法分类号】782.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-20

作者简介：徐 凌（1976- ），男，讲师，博士，

研究方向：口腔组织工程学及口腔材料学。

通讯作者：黄 姣，女，讲师，E-mail：huangjiao1201@163.com。

基金项目：重庆医科大学校级课题资助（QD200523）。

靶细胞溶解作用。

Exosomes 是由肿瘤细胞排出的包含肿瘤抗原的结构单位，调节机体的免疫功能[12]。与以往的以细胞为基础的肿瘤疫苗相比，exosomes 为非活体细胞，膜很稳定，无致瘤性，可以高效地将抗原由抗原提呈细胞传递给其他细胞，促发并扩大抗原特异性免疫应答。

本实验结果表明肿瘤来源的 exosomes 能诱导体内抗肿瘤的免疫应答，对肿瘤起到免疫治疗作用，这种新兴的肿瘤疫苗将给各种恶性肿瘤的免疫治疗带来希望。然而，肿瘤治疗往往是多种手段的综合治疗，单一肿瘤疫苗诱导的抗肿瘤免疫效应有限，还需要探求更多更好的生物学技术以增强 exosomes 肿瘤疫苗诱导的 CTL 活性，从而起到更强的抗肿瘤作用。

参 考 文 献

[1] Hegmans J P，Bard M P，Hemmes A，et al.Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells[J]. Am J Pathol，2004，164(5)：1807-1815.

[2] 李 静，沈 宜，汤为学，等. 小鼠肝癌细胞（H_{22}）源 exosomes 的制备及其免疫相关蛋白的初步研究[J]. 中华肝脏病杂志，2007，15(6)：437-440.

[3] 杨 麟，沈 宜，李 静，等.热休克小鼠肝癌细胞（H_{22}）源 Exosomes 的制备及其蛋白组成的初步研究[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(6)：725-728.

[4] 李 静，沈 宜，杨 麟，等.小鼠肝癌细胞（H_{22}）源外泌体的体内抗肝癌作用研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(19)：1836-1838.

[5] 沈 秀，周则卫，王映兰，等.KM-HL 近交系小鼠对肿瘤细胞敏感性的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志，2008，15(5)：332-334.

[6] Vidal M，Mangeat P，Hoekstra D.Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation[J]. Cell Sci 1997，110(16)：1867-1877.

[7] Wofers J，Lozier A，Raposo G，et al.Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming[J].Nat Med，2001，7(3)：297-303.

[8] Chen S Q，Du Y，Sun H，et al. Effect of CTL on K562 cell induced by exosomes and in combination with CPG OND[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi，2008，16(2)：272-275.

[9] Saji S，Kunieda K，Sugiyama Y.Immunochemotherapy for cancer patients of the stomach-cancer therapy keeping with good host-immunocompetency[J]. Nippon Rinsho，2001，59(s4)：420-426.

[10] Gaffen S L，Liu K D.Overview of interleukin-2 function，production and clinical applications[J]. Cytokine，2004，28(3)：109-123.

[11] 龚非力.医学免疫学[M].第 2 版.北京：科学科版版社，2004.77-78.

[12] Clotilde T，Muriel B，Philippe V，et al. Protemic analysis of dendritic cell-derived exosomes：A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles [J]. J Immunol，2001，166(12)：7309-7318.

（责任编辑：冉明会）

Effects of osteoblastic growth peptide on the proliferation and total protein content in cultured human periodontal ligament cells

XU Ling, et al

(*Department of Prosthodontics, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To elucidate the effect of osteogenic growth peptide (OGP) on proliferation and protein synthesis of human PDLCs in vitro. *Methods*: Human PDLCs were cultured individually in medium contained various concentrations of OGP; and cell proliferation quantity and protein synthesis were examined by MTT and coom asie brilliant blue staining. *Results*: In vitro, the addition of OGP in cultures resulted in an increase of cell proliferation ($P<0.05$) and protein synthesis ($P<0.05$). All OGP concentrations used (10^{-11}~10^{-7} mol/L) were effective but the maximum response was obtained with 10^{-9}mol/L OGP. *Conclusion*: OGP stimulates proliferation and protein synthesis of human PDLCs in vitro, suggesting that OGP is a promising growth factor in the region of periodontal tissue regeneration.

【Key words】osteogenic growth peptide; human periodontal ligament cells; Proliferation; Total protein contents

牙周膜细胞(Periodontal ligament cells, PDLCs)是一组多能干细胞,具有多向分化潜能,在一定条件下可分化为成牙骨质细胞、成骨细胞,在牙周组织再生中发挥了重要作用。目前临床上大部分病例,往往由于 PDLCs 数量的减少以及生物学功能的减弱,导致牙周组织再生的效果并不理想。因此,选择合适的生长因子促进其生物学活性,是当前牙周组织再生领域的研究热点。成骨生长肽(Osteogenic growth peptide, OGP)是近年来发现的一种新的生长因子,具有促进有丝分裂、促进成骨等作用,在组织损伤后的修复过程中发挥了重要的生理作用[1-4]。目前尚无文献报道 OGP 对 PDLCs 的影响。为此,我们通过人 PDLCs 体外培养模型,研究 OGP 对其增殖活性和总蛋白(Total protein contents)合成的影响。旨在通过本研究,为临床应用 OGP 促进牙周组织再生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要的实验试剂和仪器

DMEM (Gibco, USA), 胎牛血清 (Hyclone, USA), OGP (Sigma, USA), 胰蛋白酶 (Gibco, USA), 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)。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), Epics Elite Esp 型流式细胞仪 (Coulter, USA)。

1.2 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 × 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。

1.3 不同浓度 OGP 对人 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 96 孔细胞培养板中,按上述分组方案,每组设 5 个复孔,共接种 3 块 96 孔培养板。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、2、3 d 3 个时间段,分别在所需检测的培养孔内每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 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 200 μl 二甲基亚砜 (DMSO), 室温下振荡 10 min。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(A)。

1.4 OGP 对人 PDLCs 细胞总蛋白含量的考马斯亮蓝染色法检测

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。取第五代人 PDLCs, 按每孔 1×10^4 个 /200 μl 细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中,按上述分组方案,每组设 5 个复孔,用于细胞总蛋白含量测定。在 1、3、5 d 3 个时间段,分别在所需检测的培养孔内每孔加入 100 μl 0.2% TritonX-100, 振荡 30 min, 吸取 20 μl, 转移到另一个 96 孔板,每孔加入考马斯亮蓝 200 μl, 振荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上选择 595 nm 波长测定吸光度值(A)。无血清的培养基作为空白对照。

1.5 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 对人 PDLCs 细胞总蛋白含量的影响

见表 2。实验组在培养第 1、3、5 d，细胞总蛋白含量值高于对照组（$P<0.05$）。当 OGP 浓度为 10^{-9} mol/L 时，增加细胞内总蛋白含量达到最大值，且与其它实验组相比，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。



图 1 原代培养接种 3、4d 后可见单个细胞贴壁（×400）

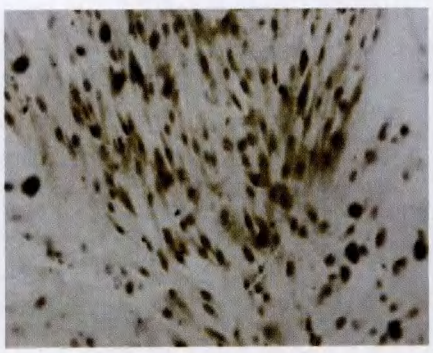


图 2 免疫细胞化学染色，Vimentin 染色阳性（×200）

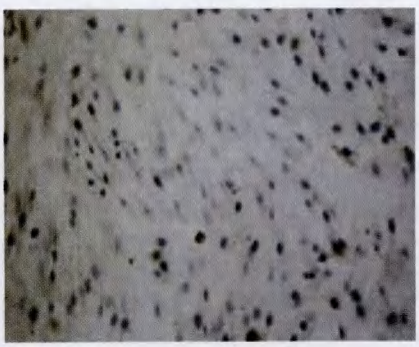


图 3 免疫细胞化学染色，Keratin 染色阴性（×200）

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	2 d	3 d
对照组	0.59 ± 0.05	0.79 ± 0.06	0.96 ± 0.07
10^{-11}	0.83 ± 0.08*	1.14 ± 0.11*	1.21 ± 0.08*
10^{-10}	0.88 ± 0.09*	1.16 ± 0.07*	1.23 ± 0.08*
10^{-9}	0.96 ± 0.06*△	1.27 ± 0.06*△	1.38 ± 0.12*△
10^{-8}	0.98 ± 0.08*	1.15 ± 0.07*	1.24 ± 0.11*
10^{-7}	0.92 ± 0.04*	1.01 ± 0.09*	1.19 ± 0.07*

注：*$P<0.05$，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细胞总蛋白含量（μg/ml）（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

分组(mol/L)	总蛋白含量（μg/ml）		
	1 d	3 d	5 d
10^{-11}	0.481 ± 0.021*	0.584 ± 0.053*	0.653 ± 0.042*
10^{-10}	0.510 ± 0.042*	0.601 ± 0.045*	0.706 ± 0.053*
10^{-9}	0.542 ± 0.025*△	0.645 ± 0.031*△	0.780 ± 0.044*△
10^{-8}	0.517 ± 0.032*	0.580 ± 0.042*	0.712 ± 0.064*
10^{-7}	0.447 ± 0.042*	0.534 ± 0.023*	0.641 ± 0.054*
control	0.351 ± 0.022	0.453 ± 0.034	0.542 ± 0.035

注：* $P<0.05$，与对照组相比较；△$P<0.05$，与其它实验组相比较

3 讨 论

牙周病治疗的最终目的是牙周组织的再生和形成牙周新附着,而牙周组织再生修复的首要基础是要有一定数量的健康牙周膜细胞。大部分牙周病晚期病例无法获得理想的牙周组织再生,其主要原因之一就是牙周病缺损部位参与牙周组织再生细胞的数量和来源不足。因此,选择合适的生长因子促进其生物学活性,是当前牙周组织再生领域的研究热点。1992 年,Bab 等[1]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 OGP。研究证实 OGP 对细胞有促有丝分裂活性[5-8]。本实验应用 MTT 法观察 OGP 对人 PDLC 的增殖效应,结果显示在 10^{-11}~10^{-7} mol/L 浓度范围内,OGP 对人 PDLC 具有显著的促增殖作用,其最佳促人 PDLC 增殖的浓度为 10^{-9} mol/L。此实验结果提示 GP 可通过诱导牙周膜细胞增殖以保证参与牙周再生细胞的数量而促进牙周组织再生。

合成和分泌蛋白是牙周膜细胞的基本功能,牙周组织的形成也是在此基础上进行的,因而细胞合成和分泌的总蛋白含量是检测牙周膜细胞的活性的指标之一。牙周膜细胞的蛋白成分除了组成本身结构和维持生存、增殖必需的蛋白外,主要是与细胞功能密切相关的蛋白成分,可分为胶原蛋白和非胶原蛋白。本实验通过测定细胞总蛋白,虽不具有特异性,但能说明 OGP 作用下牙周膜细胞总体功能变化情况,结果表明 OGP 浓度 10^{-11}~10^{-7}mol/L 内,明显增加人牙周膜细胞总蛋白的合成,与对照组比较有显著性差异,并且 10^{-9} mol/L 作用效应最大。由此可见,OGP 浓度 10^{-11}~10^{-7} mol/L 范围内,对细胞增殖和总蛋白合成影响效应最大,有关其最佳作用浓度尚未见报道,本实验的数据有助于为以后相关研究提供参考。

已有的研究证实 OGP 由 14 个氨基酸组成,免疫原性低,远远小于其它外源性生长因子,如转化生长因子(Transforming growth factor-β,TGF-β)、骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein,BMP)、釉基质蛋白(Enamal matrix protein,EMP)等。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[9-12]。这也为临床使用的安全性提供了可靠的保障。

OGP 在牙周组织再生方面具有良好的应用前景,其对牙周膜细胞的具体调控机制以及临床使用中的用药方式还有待进一步研究。

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] 徐 杨,施德源,陈统一,等. 合成成骨生长肽对大鼠骨髓基质干细胞的促成骨作用[J]. 复旦学报(医学版),2006,10(03):29-34.

[3] Gabet Y,Müller R,Regev E,et al.Osteogenic growth peptide modulates fracture callus structural and mechanical properties[J]. Bone,2004,35(1):65-73.

[4] 费琴明,陈统一,崔大敷,等. 人工合成成骨生长肽促进兔胫骨骨折愈合的实验研究[J]. 中华骨科杂志,2002,7(03):40-45.

[5] 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.

[6] 丁晓颖,邱明才,彭永德,等.成骨生长肽 10~14 及其结构类似物 G48A 对大鼠成骨细胞增殖和分化的影响[J].上海医学,2008,11(06):56-59.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

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

(责任编辑:冉明会)