

# 富血小板血浆对牙髓干细胞增殖及成骨活性的影响解析

白甲一

西安交通大学 陕西 西安 710049

**摘要：**目的：探讨富血小板血浆对牙髓干细胞的增殖与成骨活性的作用。方法：采集本院口腔科门诊年龄介于18至58岁患者拔除的牙齿样本，采用酶消化法进行牙髓干细胞（Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHED）的培养。将细胞被随机分配至三个组别：对照组、3 $\mu$ mol/L组及10 $\mu$ mol/L组，并按照浓度梯度0 $\mu$ mol/L、3 $\mu$ mol/L、10 $\mu$ mol/L对SHED细胞施加mPRP处理。运用MTT分析法探究mPRP对SHED细胞增殖活性的作用。通过应用碱性磷酸酶（ALP）试剂盒，对mPRP处理后SHED细胞的ALP活性变化进行测定。采用逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）技术检测细胞内骨涎蛋白（BSP）与骨钙素（OCN）信使核糖核酸（mRNA）表达量的变化。**结果：**在使用改良型牙髓细胞培养液（mPRP）培养的牙源性干细胞（SHED）中，观察到细胞展现出良好的生长形态。这些细胞以单细胞形式呈现，具有成纤维细胞样特征，体积相对较小。大多数细胞呈现长梭形或多角形态，部分细胞则呈现出立方形态。细胞质分布均匀，细胞体饱满。细胞培养过程中，细胞分裂周期为5至7天，适宜进行细胞传代操作；观察到miRNA前体蛋白对牙髓干细胞（SHED）的增殖具有显著的促进效应。发现经3  $\mu$ mol/L和10  $\mu$ mol/L浓度的mPRP处理后，SHED细胞的吸光度值（OD值）相较于未处理的对照组显著提高，且该差异在统计学上具有显著性（ $P < 0.05$ ）。随着TM浓度的增加，检测到的光密度（OD）值呈现显著上升趋势（ $P < 0.05$ ）；在关于碱性磷酸酶（ALP）活性的研究中，观察到在3  $\mu$ mol/L浓度组和10  $\mu$ mol/L浓度组中，随时间推移，光密度（OD）值呈现显著增加趋势，并且该变化在统计学上具有显著性差异（ $P < 0.05$ ）。在3  $\mu$ mol/L浓度组与10  $\mu$ mol/L浓度组的实验中，所测定的光密度（OD）值在不同时间点均显著超越对照组，并且该差异在统计学上呈现显著性（ $P < 0.05$ ）；在3  $\mu$ mol/L及10 $\mu$ mol/L浓度水平的SHED细胞中，骨涎蛋白与骨钙素的信使核糖核酸(mRNA)表达量均显著超越对照组。此外，随着微小蛋白富血小板血浆(mPRP)浓度水平的增加，其促进效应表现出逐渐增强的趋势( $P < 0.05$ )。**结论：**mPRP能提升SHED细胞的增殖及成骨活性，且该提升效果与其浓度和作用时间呈正相关。

**关键词：**富血小板血浆；牙髓干细胞；细胞增殖；成骨活性；影响

在学术研究领域，组织工程学作为一门新兴学科，近期已引起众多学者的广泛关注。特别是干细胞作为种子细胞的潜在来源，目前已成为研究的热点。干细胞范畴涵盖了全能干细胞、多能干细胞以及单能干细胞这三大亚类，这些细胞不仅拥有向多种细胞系分化的能力，还展现出强大的自我更新能力，并且具备克隆形成的能力，是一类极为独特且重要的细胞群体<sup>2-7</sup>。凭借各类诱导条件的巧妙应用，干细胞得以被顺利地诱导并转化为多样化的细胞类型。这一转化机制在组织和多种器官的形成过程中，具有不可忽视的决定性作用<sup>[1]</sup>。牙髓干细胞，因其相对易于获取的特性，在组织修复与再生领域的应用价值受到了学术界的广泛关注。本研究旨在系统性地评估富血小板血浆（mPRP）对牙髓干细胞（SHED）增殖性能及成骨活性的具体效应，并据此解析mPRP在牙齿再生领域中的潜在应用价值与机制，具体内容如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

本研究主要采集从本院口腔科门诊年龄介于18至58岁的患者中，选取因治疗需要而拔除的牙齿作为样本，共纳入86名患者，平均年龄为（22.43 $\pm$ 8.26）岁。采用酶消化法对采集的牙齿样本进行牙髓干细胞（Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHED）的分离与培养。将培养得到的SHED细胞随机分配至三个组别：对照组、3 $\mu$ mol/L处理组及10 $\mu$ mol/L处理组。按照浓度梯度0 $\mu$ mol/L（对照组）、3 $\mu$ mol/L、10 $\mu$ mol/L，对SHED细胞施加富血小板血浆（mPRP）处理，以探究不同浓度mPRP对SHED细胞生物学特性的影响。本研究严格遵循

**作者简介：**姓名：白甲一，出生年月：2001年10月1日，民族：汉族，籍贯：陕西省咸阳市，性别：女，学历：本科，研究方向：口腔医学，身份证号：610402200110011208，邮箱：baijiayi1001\_xjtu@163.com 密码：baijiayi1001XJTU

伦理审查原则,所有实验操作均在本院口腔科实验室完成,由具备资质的研究人员执行。所有患者信息和实验数据均保密处理,确保仅用于本研究目的。且患者均签署了知情同意书。

## 1.2 方法

1.2.1 对牙齿表面执行灭菌消毒程序,在无菌环境下提取牙髓组织,并进行彻底的剪碎处理。在37℃的恒定温度环境中,利用0.25%浓度的I型胶原酶,对样本实施了为期35分钟的消化处理程序。利用细胞筛网将获得的牙髓细胞制备成单细胞悬液,并将此悬液接种于96孔板中,每孔接种2~3个细胞<sup>[2]</sup>。进行原代细胞的培养,培养周期为10至14天。每一代细胞的培养时间约为6至8天。细胞克隆形成后,若细胞数量达到或超过40个,则应进行细胞的扩大培养。

1.2.2 为制备单采血小板浓缩液(mPRP),首先从经严格筛选的AB型供体中采集0.1单位的机采血小板。采集后,向血小板中添加肝素至终浓度为2.4单位/毫升,并以3500转每分钟的速度离心15分钟以去除上清液。随后,调整血小板浓度至 $1 \times 10^9/L$ ,并通过反复吹打使其重新悬浮<sup>[3]</sup>。富血小板血浆(PRIP)随后被分装至冻存管中,并进行快速冷冻处理:将冻存管浸入液氮罐中约5分钟,然后迅速转移至37℃水浴箱中温育5分钟,此过程重复三次以确保血小板的完全裂解。以3000转每分钟的速度离心30分钟,并通过过滤步骤去除可能存在的细胞碎片。

1.2.3 采用四唑盐(MTI,又称MTT)比色分析法,选取处于第3代至第5代且生长状态良好的牙髓干细胞(SHED),随后将其随机分配至三个不同组别中:关于对照组、3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组的细胞接种实验,其实验步骤包括:将各组细胞按照 $5 \times 10^3/L$ 的细胞密度和每孔200 $\mu\text{l}$ 的接种体积,均匀地接种到96孔板中的相应孔位,每组均分配有12个重复孔;将接种好的96孔板置于相同的培养环境中,进行为期24小时的培养。本实验将细胞样本分组后,分别暴露于0 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的微粒型血小板浓缩物(mPRP)中,并分别进行1天、3天、7天、14天的培养。向各组细胞培养液中添加MIT溶液,持续培养4至6小时。培养周期结束后,移除上清部分,向各孔内注入150 $\mu\text{l}$ 二甲基亚砜(DMSO),进行20至30分钟的孵育。通过轻微振荡孔板8至10分钟,促使结晶物完全溶解。重复3次,确保此实验的数据准确性。

1.2.4 选取96孔板作为实验容器,接种第三代生长的SHED细胞,细胞密度设定为 $5 \times 10^3/L$ 。经过24小时的培养,确保细胞贴壁生长稳定。在各孔中加入含有不同浓度mPRP(分别为0 $\mu\text{mol/L}$ 、3 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ )的培

养液<sup>[4]</sup>。根据ALP试剂盒(上海碧云天公司)说明书操作,于520 nm处酶标仪测各孔吸光度值OD,检测细胞ALP活性。将细胞继续培养,设定时间点为1天、3天、7天和14天,以观察不同培养时间下细胞ALP活性的变化。

1.2.5 RT-PCR:检测SHED中的骨涎蛋白、骨钙素mRNA含量,按照Trizol试剂盒(上海生工公司)说明书提取细胞总RNA,引物由上海生工合成。

## 1.3 观察指标

1.3.1 探讨微小蛋白聚糖相关肽(mPRP)对来源于牙髓的干细胞(SHED)增殖活性的作用。发现其在特定浓度下促进细胞增殖,超出则可能抑制或诱导凋亡。

1.3.2 研究探讨了mPRP对人源牙髓干细胞(SHED)内骨涎蛋白及骨钙素mRNA表达水平的调节作用。

## 1.4 统计学分析

本次实验数据SPSS23.0软件进行统计学分析,计量资料对比采用t检验,表示( $\bar{x} \pm s$ ),计数资料对比采用 $\chi^2$ 检验,( $n, \%$ )表示,以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义

## 2 结果

### 2.1 mPRP对SHED增殖能力的影响

在3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组与10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组中,经检测,SHED细胞的光密度(OD)值显著高于对照组( $P < 0.05$ )。此外,随着微小蛋白相关肽(mPRP)浓度的增加,OD值呈现出显著的上升趋势( $P < 0.05$ )。在不同时间点的观察中,对照组细胞的增殖能力未表现出统计学上的显著变化。然而,在3 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组和10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组中,随着时间的推移,细胞的OD值呈现显著增长( $P < 0.05$ )。详细数据见表1。

表1 mPRP作用不同时间点对人SHED增殖能力的影响  
[d, ( $\bar{x} \pm s$ ) ]

时间点	对照组	3 $\mu\text{mol/L}$ 组	10 $\mu\text{mol/L}$ 组
1d	0.45 $\pm$ 0.22	0.55 $\pm$ 0.23	0.80 $\pm$ 0.37
3d	0.47 $\pm$ 0.19	0.61 $\pm$ 0.32	0.88 $\pm$ 0.38
7d	0.46 $\pm$ 0.23	0.70 $\pm$ 0.33	0.94 $\pm$ 0.44
14d	0.47 $\pm$ 0.23	0.78 $\pm$ 0.35	1.23 $\pm$ 0.56
t值	11.234	11.257	11.379
p值	< 0.05	< 0.05	< 0.05

### 2.2 mPRP对人SHED中骨涎蛋白和骨钙素mRNA的影响

通过实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术,本研究对牙髓干细胞(Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, SHED)中骨涎蛋白(BSP)和骨钙素(OCN)的mRNA表达水平进行了定量分析。实验结果表明,在3 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组中,SHED细胞内

BSP和OCN的mRNA表达量显著高于对照组，且随着微小血小板富集血浆（micro-platelet-rich plasma, mPRP）浓度的增加，其促进作用呈现出显著的剂量依赖性增强趋势（ $P < 0.05$ ）。详细数据见表2。

表2 mPRP对人SHED中骨涎蛋白和骨钙素mRNA的影响 [分, ( $\bar{x} \pm s$ ) ]

组别	骨涎蛋白	钙素mRNA
对照组	0.35±0.12	0.47±0.14
3 pmol/L组	0.56±0.19	0.57±0.22
10 $\mu$ mol/L组	0.80±0.24	0.88±0.20
<i>t</i> 值	11.245	12.432
<i>p</i> 值	< 0.05	< 0.05

### 3 讨论

富血小板血浆是通过离心技术从自体血液中提取的一种富含血小板的血浆。本研究深入探讨了PRP对牙髓干细胞增殖能力以及成骨活性的潜在影响。近期，富含血小板血浆（PRP）在组织工程与再生医学领域的潜在应用价值已引起学术界的广泛关注。牙髓干细胞属于成体干细胞的一种，具有分化为多种细胞类型的潜能，主要栖息于牙齿的牙髓组织内。研究指出，富含血小板的血浆（PRP）能够显著增强牙髓干细胞的增殖及成骨活性，对牙科再生治疗具有显著贡献<sup>[5]</sup>。在富含血小板的血浆（PRP）中，高浓度的血小板具备分泌多种生长因子的能力，这些生长因子包括但不限于血小板衍生生长因子

（PDGF）、转化生长因子- $\beta$ （TGF- $\beta$ ）以及血管内皮生长因子（VEGF）等。在牙髓干细胞的增殖过程中，特定生长因子发挥着关键性作用。生长因子与牙髓干细胞表面的受体相互作用，能够启动细胞内的信号传导路径，促进细胞周期的演进，从而实现细胞增殖速率的提升。

综上所述，PRP促进牙髓干细胞增殖和成骨活性，具临床价值。进一步研究PRP，望在牙科再生治疗中发挥更大作用，提供安全有效治疗方案。

### 参考文献

- [1] 闫娜,黄涛,张中月,张淑华,王丽华,韩国良.富血小板纤维蛋白对牙髓干细胞增殖和成骨分化的功能研究[J].口腔医学研究,2020,36(10):973-977.
- [2] 丁钰,武志贤,惠宏斌.富血小板血浆对人乳牙牙髓干细胞的增殖与向成骨分化的调控作用[J].临床和实验医学杂志,2019,18(13):1372-1375.
- [3] 王莹,徐燕,庞罡,叶兴如,何家林,谢贤哲.无血清培养下富血小板纤维蛋白提取液对牙髓干细胞增殖分化的影响[J].口腔医学研究,2018,34(07):712-716.
- [4] 谭金娣,陈福扬,史欣,赵芳,姜建平,胡伟平.富血小板血浆对干细胞增殖及分化作用的研究进展[J].口腔医学,2017,37(08):743-745.
- [5] 文军,吴补领,段建民,李洪涛,李斯翰,李鑫.改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞增殖的最佳浓度[J].中国组织工程研究,2014,18(28):4517-4523.