

双层胶原支架与人牙周膜细胞的体外生物相容性

孙文娟¹, 唐倩^{1*}, 黄南楠¹, 任力², 侯思润²

(1. 中山大学附属第三医院口腔科, 广东广州 510630; 2. 国家人体组织功能重建工程技术研究中心, 广东广州, 510641)

摘要:【目的】研究双层胶原支架与人牙周膜细胞的体外生物相容性。【方法】组织块培养法培养原代人牙周膜细胞。MTT法测胶原支架不同浓度浸提液的细胞毒性。将人牙周膜细胞与支架材料三维培养, 通过扫描电镜、组织切片观察其复合情况, 并检测三维培养后细胞碱性磷酸酶(ALP)、羟脯氨酸(HYP)的分泌情况。【结果】不同浓度材料浸提液毒性评级为0~1级。细胞与支架复合培养后, 细胞在支架上黏附、增殖良好, 支架材料内部细胞分布均匀, 且致密层可起屏障膜作用, 阻挡细胞进入支架内部。细胞与胶原支架复合培养24 h后, 细胞的ALP活性与对照组无明显差异($P > 0.05$), 复合培养48、72 h后, 细胞的ALP活性高于对照组($P < 0.05$)。复合培养24、48、72 h后, 细胞的HYP活性均高于对照组($P < 0.05$)。【结论】双层胶原支架具有良好的生物相容性, 可进一步应用于牙周组织工程的研究。

关键词: 胶原支架; 牙周膜细胞; 牙周组织工程; 支架材料

中图分类号: R318

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2014)02-0250-06

Biocompatibility of a Double-layer Collagen Scaffold and Human Periodontal Ligament Cells in Vitro

SUN Wen-juan¹, TANG Qian^{1*}, HUANG Nan-nan¹, REN Li², HOU Si-run²

(1. Department of Stomatology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. National Engineering Research Center for Tissue Restoration and Reconstruction, Guangzhou 510641, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate biocompatibility between a double-layer collagen scaffold and human periodontal ligament cells (hPDL). 【Methods】 The hPDL were obtained by explant culture. The cytotoxicity of different concentrations of an extract of the collagen scaffold was evaluated by an MTT assay. The morphology of hPDL after seeding on the scaffolds was evaluated by SEM and histological examination. Alteration of alkaline phosphatase (ALP) and hydroxyproline (HYP) activity of the hPDL after seeding on the scaffolds was also evaluated. 【Results】 The grade of the cytotoxicity of the collagen scaffold was from 0 to 1. The hPDL proliferated well on the scaffold and a uniform distribution of cells in the scaffold could be observed. The dense layer prevented cells from migrating into the scaffold. ALP activity between the scaffold group and the control group showed no significant difference ($P > 0.05$) at 24 h after cell seeding, however, at 48 and 72 h after cell seeding, ALP activity of the scaffold group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). HYP activity of the scaffold group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$) at 24, 48, and 72 h after cell seeding. 【Conclusion】 The double-layer collagen scaffold which showed good biocompatibility may be a promising biomaterial for periodontal tissue engineering.

Key words: collagen scaffold; periodontal ligament cells; periodontal tissue engineering; scaffold material

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2014, 35(2): 250-255]

牙周病是人类口腔中最常见的疾病之一, 同时也是造成成年人失牙的首要原因。理想的牙周病治疗不仅要求阻断牙周支持组织的破坏, 同时

应实现牙周组织的再生^[1-2]。组织工程技术被认为是修复牙周组织缺损的最有效的方式, 寻找合适的支架材料是目前牙周组织工程研究的重点内容^[3]。

收稿日期: 2013-08-13

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031300011, 2010B031100021)

作者简介: 孙文娟, 硕士, 住院医师, 研究方向: 牙周病的预防与治疗; * 通信作者, 唐倩, E-mail: doodoer@126.com

华南理工大学材料学院学者从牛跟腱中提取 I 型胶原,研制出一种具有双层结构的胶原支架,本研究该支架与人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLC)的体外生物相容性,为进一步应用于牙周组织工程的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

双层胶原支架由华南理工大学国家人体组织功能重建工程技术研究中心任力教授惠赠。该胶原支架制备方法如下:从牛跟腱中提取 I 型胶原,配制成 3%的胶原-乙酸溶液,浇注于模具中, -60℃预冻 24 h, -80℃真空冷冻干燥 48 h, 取出后真空热交联 24 h, 冷却至室温后浸泡于 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液中,化学交联 12 h。化学交联后弃去 EDC-NHS, 去离子水冲洗 10 遍, -60℃预冻 24 h, -80℃真空冷冻干燥 48 h。将冻干的海绵进行压制即制成胶原支架。在支架表面涂覆含有 EDC-NHS 交联剂的胶原-乙酸溶液,干燥后即为致密层。将支架材料裁剪为 5 mm×5 mm×3 mm 大小,⁶⁰Co 25 kGy 辐照消毒后备用。扫描电镜观察样品表面形态,100 倍下随机选取 5 个视野,每视野测量 10 个孔径值,计算平均孔径。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养液(Hyclone,美国);胎牛血清 FBS(Hyclone,美国);碱性磷酸酶试剂盒(南京建成,中国);羟脯氨酸试剂盒(凯基生物,中国);倒置显微镜(Nikon,日本);酶标仪(Thermo Scientific,美国);扫描电子显微镜(JEOL,日本)。

1.3 hPDLC 的原代培养^[4]

选择健康青少年(12~18岁,患者本人及患者监护人对本实验知情同意)因正畸拔除的健康前磨牙,采用组织块培养法进行 hPDLC 原代培养。取第 2 代细胞免疫组化法进行波形丝蛋白和细胞角蛋白染色,鉴定细胞来源。取 4~8 代细胞用于实验。

1.4 双层胶原支架细胞毒性实验

按照中华人民共和国国家标准 GB/T16886.12-2005/ISO10993-12:2002(100%浓度浸提液:材料表面积/浸提介质体积=6 cm²/mL)制备浸提液。将消毒后的材料浸入含 10%胎牛血清

的 DMEM 培养液中,使支架材料表面积/培养液体积为 6 cm²/mL,于培养箱内孵育 72 h 后用于实验。选择状态良好的 hPDLC 制备细胞悬液,调整细胞密度为 2×10⁴/mL,每孔 200 μL 接种于 96 孔板中,培养 24 h,待细胞贴壁后弃去原培养液,分别加入 100%、75%、50%、25%的浸提液,阴性对照组加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,每组重复 4 孔,置于细胞培养箱培养,隔天换浸提液及培养液。分别于培养后 2、4、6 d 进行 MTT 检测。每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h 后,弃去原培养液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 波长下比色,测定光密度值(A),调零后取均值,按公式计算出相对增殖率(relative growth rate, RGR, $= A_{\text{实验组}}/A_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$),并按 5 级毒性分级法评分:0 级 RGR ≥ 100%;1 级 RGR ≥ 80%;2 级 RGR ≥ 50%;3 级 RGR ≥ 30%;4 级 RGR ≥ 0^[5]。

1.5 hPDLC 与双层胶原支架三维培养情况观察

支架材料经 DMEM 预湿过夜,无菌滤纸吸干水分,置于 24 孔板中央。选择状态良好的 hPDLC 制备细胞悬液,调整细胞密度为 2×10⁶/mL,分别接种于支架致密面及疏松面,每块材料接种 50 μL,培养 4 h 后补加 500 μL 培养液。置于细胞培养箱常规培养,隔天换液。取三维培养 7 d 后的细胞-支架复合物,2.5%戊二醛固定,梯度乙醇脱水,叔丁醇置换,真空冷冻干燥,喷金后扫描电镜观察。取三维培养 14 d 后的细胞-支架复合物,以 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,常规切片,HE 染色后显微镜观察。

1.6 hPDLC 与支架材料复合培养后分泌功能的检测

细胞接种方法同 1.5。实验组细胞接种于支架材料疏松面,对照组细胞直接接种于 24 孔培养板。每组重复 4 组。置于细胞培养箱常规培养。于培养后 24、48、72 h 吸出上清液,按碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)试剂盒说明书操作,用酶标仪分别在 520 nm、550 nm 波长下比色,测定吸光度值(A)^[6]。

1.7 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

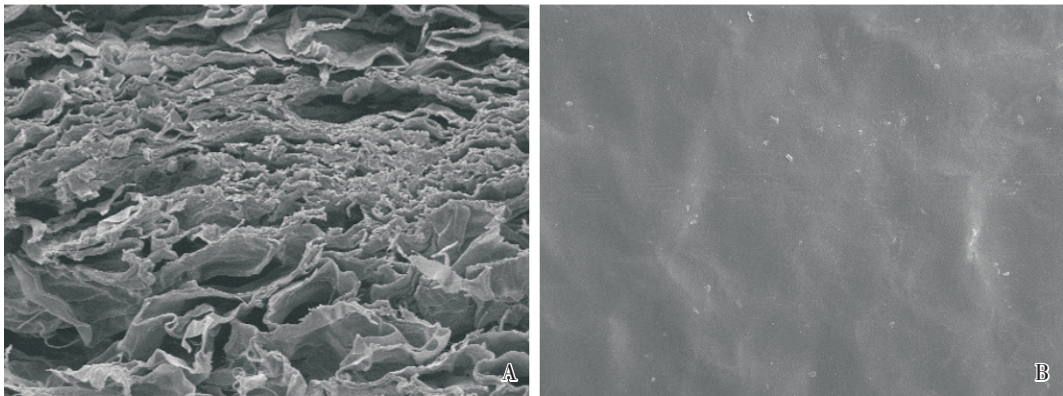


图 1 胶原支架扫描电镜观察结果

Fig.1 Morphology of the double-layer collagen scaffolds under SEM

A: Loose layer of the scaffold; B: Dense layer of the scaffold; $\times 50$

2 结 果

2.1 双层胶原支架扫描电镜观察结果

扫描电镜下可见支架疏松面呈多孔网状结构,孔隙相互连接,孔径约为 $140 \sim 190 (162.7 \pm 20.5) \mu\text{m}$;致密面无孔隙(图 1)。

2.2 hPDLCL 的培养及鉴定

所培养 hPDLCL 呈长梭形,细胞核边界清晰,呈卵圆形,位于细胞中央,细胞排列均匀,呈漩涡状(图 2)。细胞角蛋白免疫组化染色阴性,波形丝蛋白免疫组化染色阳性,提示细胞来源于外胚间充质(图 3)。

2.3 细胞毒性实验结果

各实验组和对照组的 OD 值均随培养时间延长而增大,第 2、4、6 天各实验组与对照组、各实验组之间的吸光度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4)。4 种不同浓度浸提液组的 RGR 为 $96.8 \sim 103.4$ (表 1),其毒性评级均为 0~1 级(表 2)。

表 1 各实验组 RGR

Table 1 RGR of experimental groups (%)

<i>t</i> /d	Concentrations of extract			
	100%	75%	50%	25%
2	103.4	99.1	99.5	102.3
4	96.8	100.5	100.6	101.6
6	98.9	98.4	99.1	101.1

2.4 hPDLCL 与支架复合培养情况

2.4.1 扫描电镜观察结果 培养 7 d 后,疏松侧

表 2 细胞毒性评级

Table 2 Grade of the cytotoxicity

<i>t</i> /d	Concentrations of extract			
	100%	75%	50%	25%
2	0	1	1	0
4	1	0	0	0
6	1	1	1	0

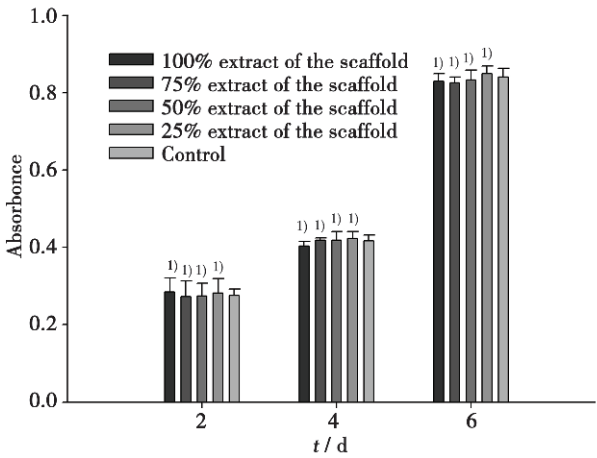


图 4 MTT 检测细胞增殖情况

Fig. 4 Resultes of MTT for cell proliferations

There were no significant differences between the groups. 1) $P > 0.05$

细胞跨孔隙生长,胞体呈梭形、多角形,伸出突起相互连接,并向孔隙内生长。致密侧无孔隙,大量细胞在支架表面黏附生长,胞体呈梭形、多角形,相互融合(图 5)。

2.4.2 组织切片观察结果 培养 14 d 后,疏松侧

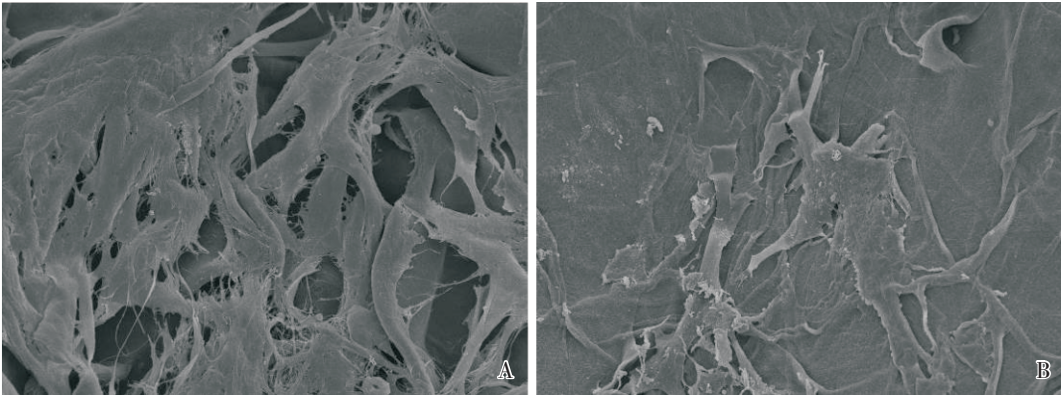


图 5 hPDLC 与支架三维培养后第 7 天扫描电镜下观察
Fig.5 HPDLC cultured with the scaffolds after 7 days under SEM

A: The cells migrated into the scaffold along the pores in the loose layer; B: The cells proliferated well on the surface of the dense layer; $\times 400$

细胞沿材料孔隙向支架内部迁移；致密侧细胞在支架材料表层呈复层生长，极少细胞进入支架内部；横截面可见细胞在支架内部分布均匀，充满支架孔隙，伸展良好，相互连接，胞核清晰，胞浆均匀（图 6）。

2.5 hPDLC 与支架复合培养后分泌功能的情况

2.5.1 hPDLC 与支架复合培养后上清液中 ALP 的活性 实验组和对照组的吸光度值均随培养时间延长而增大。培养 24 h 后，实验组与对照组间无统计学差异 ($P > 0.05$)，而 48、72 h 后实验组高于对照组，其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ ；表 3)。

2.5.2 hPDLC 与支架复合培养后上清液中 HYP 的活性 实验组和对照组的 A 值均随培养时间延长而增大。培养 24、48、72 h 后，实验组高于对照组，其差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ ；表 4)。

表 3 三维培养对细胞 ALP 活性的影响
Table 3 ALP activity of hPDLC after culture on the scaffold (A, $\bar{x} \pm s$)

t/h	Experimental Group	Control Group
24	$0.265 \pm 0.005^{1)}$	0.265 ± 0.008
48	$0.325 \pm 0.013^{2)}$	0.277 ± 0.012
72	$0.383 \pm 0.006^{2)}$	0.333 ± 0.017

1) Compared with control $P > 0.05$; 2) Compared with control $P < 0.05$.

3 讨 论

理想的牙周组织再生为形成新附着，新附着

表 4 三维培养对细胞 HYP 活性的影响

Table 4 HYP activity of hPDLC after culture on the scaffold (A, $\bar{x} \pm s$)

t/h	Experimental Group	Control Group
24	$0.145 \pm 0.008^{1)}$	0.116 ± 0.010
48	$0.176 \pm 0.007^{1)}$	0.150 ± 0.006
72	$0.213 \pm 0.007^{1)}$	0.177 ± 0.008

1) Compared with control $P < 0.05$.

的形成有赖于牙周膜细胞优先占据根面，引导组织再生术(guided tissue regeneration, GTR)是目前实现牙周新附着的有效手段^[7]。然而由于炎症的破坏，牙周膜细胞来源有限，且活性不足，生长缓慢，导致牙周组织再生量有限，疗效并不满意。组织工程技术通过引入外源细胞，可为牙周组织的再生创造良好条件^[3]。

组织工程技术的核心是构建细胞与支架材料的三维复合体，支架材料可为种子细胞的生长提供适宜的微环境。目前应用于牙周组织工程技术的材料主要有合成材料，如羟基磷灰石，聚乳酸，聚羟基乙酸等；天然材料，如天然骨衍生物，胶原等^[8-9]。其中，胶原不仅具有良好的生物相容性，同时是牙周膜的主要成分，将其应用于牙周组织工程具有独特优势，可为牙周膜细胞提供良好的细胞外基质环境，促进细胞的生长、增殖、分化，加速胶原纤维的形成、蛋白质的合成，促进牙周组织的再生。胶原作为 GTR 中的屏障膜，在牙周组织再生中的应用已非常广泛^[10-11]。

本实验通过将 GTR 技术与组织工程技术相

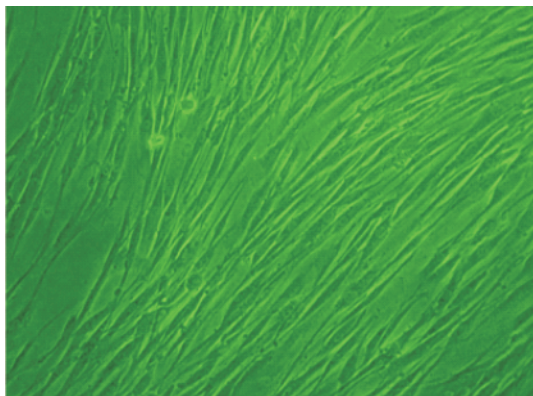


图 2 倒置相差显微镜下 hPDLC 的形态($\times 100$)
Fig.2 Morphology of hPDLC under inverted phase contrast microscope ($\times 100$)

结合,制备了具有双层结构的胶原支架。其疏松侧孔隙均匀,相互交通,牙周膜细胞与支架材料复合

培养后,可见大量细胞在材料表面跨孔隙生长,并沿孔隙向支架内部迁移,分布均匀,表明该支架材料具有良好的生物相容性,三维立体结构有利于细胞的攀附生长;而致密侧无孔隙,细胞与支架材料复合培养后,大量细胞在其表层黏附并呈复层生长,仅有极少细胞进入支架内部,证实其致密层可起到屏障作用,发挥有效的 GTR 屏障膜的功能。

牙周膜细胞具有分泌、矿化等多种功能,可分泌 ALP、胶原、蛋白等^[12]。ALP 作为生物矿化和成骨样细胞的一种特征性标记,其活性的高低可反映相应细胞向成骨方向转化的趋势,在牙周膜中,ALP 是成骨细胞或成牙骨质细胞分化早期的标志,其活性是细胞矿化的基础^[13],因此,ALP 活性已成为观察牙周膜细胞分化功能的一项重要指标。胶原是构成牙周膜的主要成分,其中 I 型胶原占 85%左右。I 型胶原在维持牙周组织结构的稳

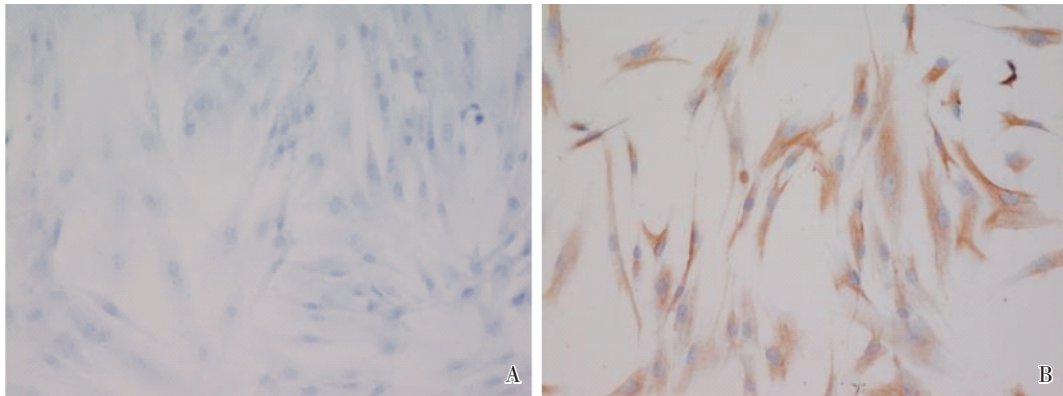


图 3 细胞角蛋白、波形丝蛋白免疫组化染色
Fig.3 The cytokeratin and vimentin immunohistochemical staining of hPDLC
A: The expression of cytokeratin was negative; B: The expression of vimentin was positive; Fluorescence microscope, $\times 200$

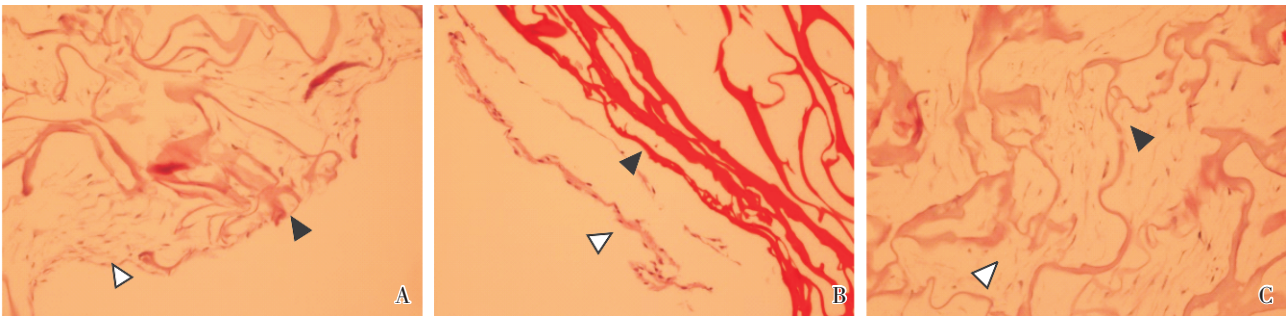


图 6 hPDLC 与支架三维培养后第 14 天
Fig.6 HPDLC cultured with the scaffolds after 14 days
A: On the loose side, the hPDLC migrated into the scaffold along the pores; B: On the dense side, the hPDLC formed a continuous layer; C Based on a cross-section, a uniform distribution of cells in the scaffold could be observed. HE staining, fluorescence microscope, $\times 200$.▲: scaffolds; △: hPDLC

定、功能、再生等方面起着重要作用^[14]。因此,评估牙周膜细胞分泌胶原的功能具有重要意义。HYP为前胶原、胶原蛋白合成必需的前体氨基酸,HYP在胶原蛋白中占13.4%,在弹性蛋白中占极少量,其他蛋白中均不存在,因此检测HYP的含量可以间接反映胶原的分泌情况,具有高度的灵敏性与可靠性^[15-16]。本实验通过检测牙周膜细胞与双层胶原支架三维培养后上清液中ALP及HYP的含量变化,证实经复合培养后,随着培养时间的延长,支架材料对牙周膜细胞分泌ALP及胶原的功能具有一定的促进作用。

以上实验结果提示,双层胶原支架疏松层有利于细胞攀附生长,致密层可起到屏障膜作用,且经复合培养后,人牙周膜细胞可维持其形态特征及生物功能。该支架材料具有良好的生物相容性,可进一步应用于牙周组织工程的研究。然而其体内再生效果仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] 束蓉. 牙周病病因及治疗研究进展[J]. 上海交通大学学报, 2007, 6(1): 625-628.
Shu R. Research advances in etiology and treatment of periodontal disease [J]. J Shanghai Jiaotong Univ: Med Sci, 2007, 6(1): 625-628.
- [2] Corbet EF, Leung WK. Epidemiology of periodontitis in the Asia and Oceania regions [J]. Periodontol 2000, 2011, 56(6): 25-64.
- [3] Tobita M, Mizuno H. Periodontal disease and periodontal tissue regeneration [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2010, 5(9): 168-174.
- [4] 黄南楠, 梁焕友, 唐倩, 等. 组织块法培养原代人PDLCS技术的新探讨[J]. 中华口腔医学研究杂志: 电子版, 2009, 3(1): 10-16.
Huang NN, Liang HY, Tang Q, et al. The new study of the tissue-explant technique on culturing primary human PDLCS [J]. Chin J Stomatol Res, 2009, 3(1): 10-16.
- [5] Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry [J]. Periodontol 2000, 2009, 50(9): 127-153.
- [6] 陈建洪, 黄南楠, 唐倩, 等. 人牙周韧带细胞在SGBG/PHBV三维支架材料上分泌功能的研究[J]. 中国实用医药, 2010, 5(26): 1-2.
Chen JH, Huang NN, Tang Q, et al. The study of the secretory function of Human PDLCS on the scaffold material [J]. China Prac Med, 2010, 5(26): 1-2.
- [7] Christgau M, Caffesse RG, Schmalz G, et al. Extracellular matrix expression and periodontal wound-healing dynamics following guided tissue regeneration therapy in canine furcation defects [J]. J Clin Periodontol, 2007, 34(9): 691-708.
- [8] He HX, Yu JH, Cao JK, et al. Biocompatibility and osteogenic capacity of periodontal ligament stem cells on nHAC/PLA and HA/TCP scaffolds [J]. J Biomater Sci, 2011, 22(9): 179-194.
- [9] Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, et al. Current concepts in periodontal bioengineering [J]. Orthod Craniofacial Res, 2005, 8(8): 292-302.
- [10] Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review [J]. J Periodontol, 2001, 72(2): 215-229.
- [11] Behring J, Junker R, Walboomers XF, et al. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes: A systematic review [J]. Odontology, 2008, 96(9): 1-11.
- [12] Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligament and pulp of human exfoliated deciduous teeth [J]. Cell Tissue Res, 2010, 340(9): 323-333.
- [13] Wu L, Wei Xi, Ling J, et al. Early osteogenic differential protein profile detected by proteomic analysis in human periodontal ligament cells [J]. J Periodont Res, 2009, 44(6): 645-656.
- [14] Yoshiyuki K, Shuauang Z. Significant Type I and Type III Collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3d peptide scaffolds without extra growth factors [J]. PLoS ONE, 2010, 5(4): e10305.
- [15] Colgrave ML, Allingham PG, Jones A. Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1212(1-2): 150-153.
- [16] 李玲, 杨路, 韩强, 等. 生长因子缓释微球的制备及对入牙周膜成纤维细胞作用的研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2010, 26(1): 21-24.
Li L, Yang L, Han Q, et al. Preparations of rhIGF-I-loaded gelatin microspheres and effects of rhIGF-I-GMs on human periodontal ligament fibroblasts in vitro [J]. J Clin Stomatol, 2010, 26(1): 21-24.

(编辑 刘清海)