

[文章编号] 1000-1182(2009)02-0220-04

人牙周膜细胞在透明质酸/胶原支架上的黏附与生长

王丽霞^{1,2} 赵寰¹ 蒋波³ 丁一¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2.天津市口腔医院 国际诊疗中心, 天津 300041; 3.四川大学 生物材料工程研究中心, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究人牙周膜细胞(PDLC)在胶原、透明质酸及透明质酸/胶原支架上的黏附、生长情况,以初步探讨透明质酸/胶原支架应用于牙周组织工程的可行性。方法 将体外培养的人牙周膜细胞接种到碳化二亚胺交联的胶原、透明质酸及透明质酸/胶原支架上;MTT法检测支架对人牙周膜细胞黏附、生长的影响;并用倒置相差显微镜和扫描电镜观察形态变化。结果 MTT结果显示胶原、透明质酸及透明质酸/胶原支架上人PDLC的黏附、生长情况,在第1、2、4天组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$),第7天组间差异无统计学意义($P>0.05$),且人牙周膜细胞数量透明质酸/胶原组均高于对照组;人牙周膜细胞在支架上生长良好。结论 相对于胶原支架和透明质酸支架,透明质酸/胶原支架更有利于人牙周膜细胞的黏附,提示该材料具备成为牙周组织工程理想支架材料的潜力。

[关键词] 透明质酸; 胶原; 牙周膜细胞; 支架材料

[中图分类号] R781.4 **[文献标识码]** A

Adhesion and growth of human periodontal ligament cells on hyaluronic acid/collagen scaffold WANG Li-xia^{1,2}, ZHAO Huan¹, JIANG Bo³, DING Yi¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. International VIP Dental Clinic, Tianjin Stomatological Hospital, Tianjin 300041, China; 3. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The adhesion and growth of human periodontal ligament cells(PDLC) on collagen(Col), hyaluronic acid (HA) and HA/Col scaffolds were studied to evaluate the feasibility of HA/Col as a scaffold material in periodontal tissue engineering. **Methods** Human PDLC cultured *in vitro* was collected and seeded on Col, HA, HA/Col scaffolds crosslinked by carbodiimide. The influences of scaffolds on cell adhesion and growth were observed by MTT assay. The growth of human PDLC on scaffolds was observed through inverted phase contrast microscope and scanning electron microscope(SEM). **Results** The result of MTT assay demonstrated that except the seventh day there was obviously differentiation between each group Col, HA, HA/Col scaffolds at the first, second and fourth day, and HA/Col group was higher than control group all the time. Human PDLC successfully grew on scaffolds. **Conclusion** HA/Col scaffold was more suitable for human PDLC adhesion compared with Col scaffold and HA scaffold. This indicates that HA/Col scaffold might be a potential ideal candidate for periodontal tissue engineering.

[Key words] hyaluronic acid; collagen; periodontal ligament cells; scaffold

牙周病是一种慢性破坏性疾病,可造成牙周支持组织的破坏和牙周附着丧失,最终导致牙齿丧失。牙周病治疗的目的是获得牙周支持组织包括牙槽骨、牙骨质及牙周膜的完全再生,但因牙周病丧失的牙周组织,其修复与重建的难度很大,而现代牙周组织工程技术有望解决这一难题^[1]。人牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLC)是牙周组织的主要细胞成分,是牙周组织再生的基础。支架材

料是细胞附着的基本框架和代谢场所,其形态和功能直接影响所构成组织的形态和功能。因此,本研究旨在寻找一种适合于牙周组织再生的支架材料,评价其与人PDLC的相互作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

型胶原(由四川大学生物材料工程中心提供,医用级),透明质酸(钠盐,山东福瑞达生物化工有限公司,医用级),碳化二亚胺(浙江普康化工有限公司,医用级),DMEM高糖培养液(Gibco公司,美国),胰蛋白酶(Sigma公司,美国),CO₂培养箱

[收稿日期] 2008-03-17; [修回日期] 2008-07-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30640077)

[作者简介] 王丽霞(1982-),女,河北人,住院医师,硕士

[通讯作者] 丁一, Tel: 028-61153007

(Binder公司, 德国), 倒置相差显微镜(Leica DMI 6000B公司, 德国), JEOL扫描电镜(Technics LTD 公司, 日本), 冷冻干燥机(Heto DW6-55-1公司, 丹麦)。

1.2 方法

1.2.1 支架材料的制备与预处理 取1% 型胶原(collagen, Col)20 mL, 加入1%透明质酸(hyaluronic acid, HA)水溶液5 mL(HA:Col质量比为1:4), 将pH值调为6.5, 磁力搅拌器室温下搅拌1 h。然后将Col、HA、HA/Col混合物分别倒在聚苯乙烯有盖培养皿上(直径5 cm), 冷冻干燥。室温下, 将制备的多孔支架浸入含0.6% 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide, EDC)的95%乙醇溶液中反应48 h。支架在蒸馏水中漂洗5次, 每次1 min, 以除去残留的EDC, 而后冷冻干燥。将直径1 cm大小的支架分别置于24孔板中, 紫外线消毒1 h后备用。

1.2.2 人PDLC的培养与鉴定 选择健康青少年(12~18岁)正畸拔除的健康前磨牙, 刮取根中1/3牙周膜组织, 组织块法常规培养^[2], 当细胞贴壁生长铺满80%瓶底时, 用0.25%胰蛋白酶进行消化并传代培养, 取第2代细胞进行爬片, 用免疫组化ABC法进行波形丝蛋白和细胞角蛋白染色鉴定。取3~8代细胞用于实验。

1.2.3 MTT法检测人PDLC在支架上的黏附、生长 将传代所得细胞密度调整至每毫升 4×10^5 个, 接种到预先处理的24孔板中3组支架上, 每组支架接种细胞悬液0.2 mL, 每组设立16个样本。对照组为细胞直接接种于24孔板上。标准环境下(5%CO₂、37℃)孵育, 2 h后小心加入0.8 mL培养液, 继续培养, 隔天换液。分别在1、2、4、7 d每组取4个样本, 小心吸去孔内培养液, 每孔加1 mL新鲜培养液, 再加40 μ L MTT, 置于培养箱中3.5 h后取出, 轻轻吸去液体, 每孔加二甲亚砷420 μ L, 置于培养箱中0.5 h后振荡, 置酶联检测仪上测量光密度值, 取4孔平均值。

1.2.4 支架与人PDLC复合培养的倒置相差显微镜和扫描电镜观察 将传代所得细胞密度调整至每毫升 4×10^5 个, 接种到预先处理的24孔板中3组支架上, 每组支架接种细胞悬液0.2 mL, 标准环境下(5%CO₂、37℃)孵育, 2 h后小心加入0.8 mL培养液, 继续培养。24 h后利用倒置相差显微镜观察。48 h后弃培养液, 用PBS液漂洗2次, 3%戊二醛4℃固定24 h, 乙醇梯度脱水(30%、50%、75%、85%、95%、100%)各15 min, 醋酸异戊酯置换20 min, 临界点干燥, 喷金镀膜, 扫描电镜观察。

2 结果

2.1 人PDLC形态学观察和来源鉴定

原代人PDLC于第5~7天从组织块游出, 以组织块为中心呈放射状排列生长。细胞呈长梭形, 胞体丰满, 胞浆均匀, 核圆形或卵圆形, 核仁清晰。免疫组化结果显示, 波形丝蛋白阳性(图1), 胞浆棕黄色着色, 角蛋白阴性(图2), 证实其为中胚层来源的成纤维细胞。

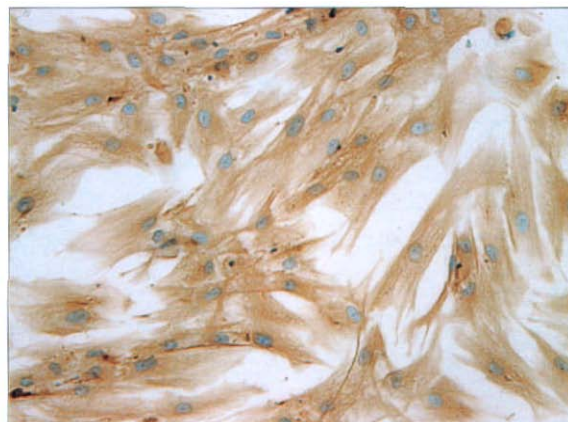


图1 人PDLC波形丝蛋白染色阳性 倒置相差显微镜 $\times 200$

Fig 1 Positive expression of Vimentin in cytoplasm of human PDLC inverted phase contrast microscope $\times 200$

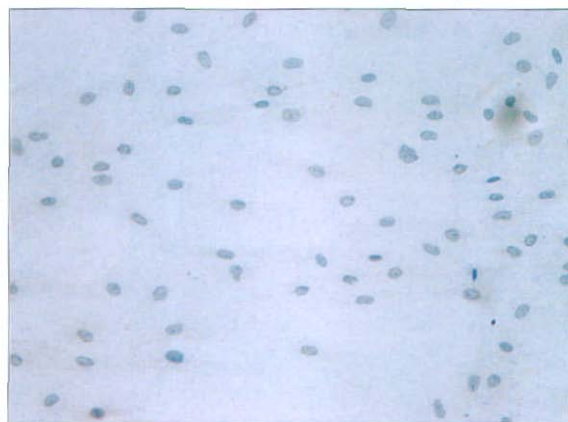


图2 人PDLC角蛋白染色阴性 倒置相差显微镜 $\times 200$

Fig 2 Negative expression of cytokeratin in cytoplasm of human PDLC inverted phase contrast microscope $\times 200$

2.2 MTT法检测人PDLC在支架上的黏附、生长情况

MTT结果显示胶原、透明质酸及透明质酸/胶原支架, 在第1、2、4天时组间比较有统计学意义($P < 0.05$), 第7天时组间比较不具有统计学意义。第1天时人PDLC数量实验组(Col、HA、HA/Col组)均高于对照组($P < 0.05$), 且HA/Col组高于Col、HA组($P < 0.05$)。与对照组比较, Col组人PDLC数量第2、4天明显增加($P < 0.05$), 第7天时两组比较无统计学差异($P > 0.05$); HA/Col组人PDLC数量第2、4、7天时均高于对照组($P < 0.05$, 表1和2)。

表 1 不同支架组人PDLC黏附生长活性比较的方差分析($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 ANOVA comparison of adhesion and growth activity of human PDLC among different scaffold groups($\bar{x}\pm s$)

时段 (d)	黏附生长活性				
	对照组	Col组	HA组	HA/Col组	P值
1	0.267±0.005	0.677±0.092	0.678±0.252	0.999±0.033	0.000
2	0.537±0.064	0.817±0.037	0.471±0.009	0.762±0.027	0.000
4	0.687±0.021	0.878±0.128	0.847±0.130	0.929±0.047	0.019
7	0.875±0.040	1.017±0.013	0.978±0.083	1.088±0.229	0.139

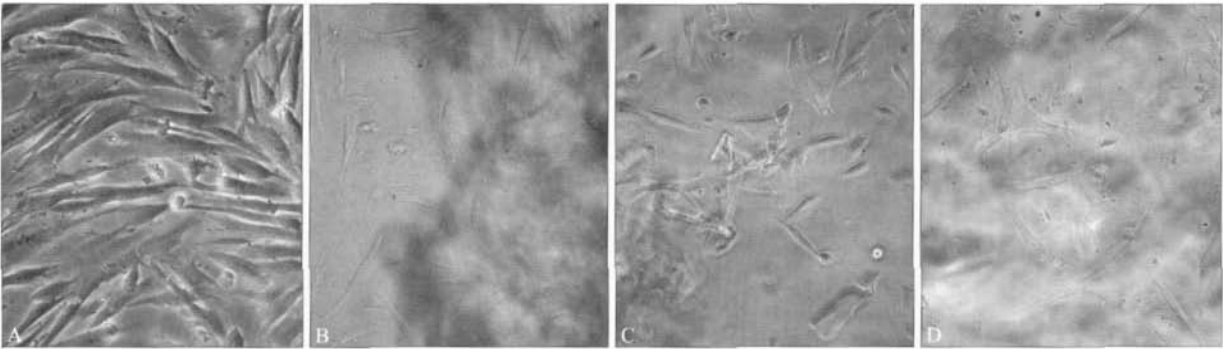
表 2 不同支架组人PDLC黏附生长活性均数多重比较检验

Tab 2 Multiple comparison test of adhesion and growth activity of human PDLC among different scaffold groups

时段(d)	组别	对照组	Col组	HA组	HA/Col组
1	对照组		0.001	0.001	0.001
	Col组	0.001		0.786	0.006
	HA组	0.001	0.786		0.006
	HA/Col组	0.000	0.006	0.006	
2	对照组		0.000	0.036	0.000
	Col组	0.000		0.000	0.049
	HA组	0.036	0.000		0.000
	HA/Col组	0.000	0.049	0.000	
4	对照组		0.014	0.034	0.003
	Col组	0.014		0.648	0.456
	HA组	0.034	0.648		0.239
	HA/Col组	0.003	0.456	0.239	
7	对照组		0.130	0.263	0.026
	Col组	0.130		0.660	0.382
	HA组	0.263	0.660		0.199
	HA/Col组	0.026	0.382	0.199	

2.3 人PDLC在支架上黏附、生长的形态学观察

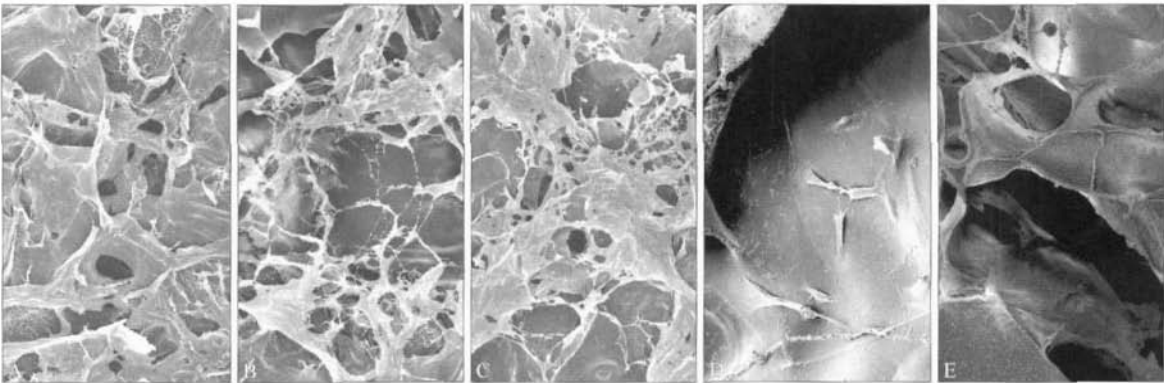
倒置相差显微镜下观察可见，对照组生长良好，呈长梭形，胞体丰满，核仁呈圆形或椭圆形；Col组和HA/Col组人PDLC呈长梭形，黏附生长于支架表面及孔板上，支架材料完整；HA组支架材料大部分溶解，人PDLC呈多角形或短梭形(图3)。扫描电镜观察Col、HA、HA/Col支架形成大小不同的孔径；人PDLC黏附生长于Col、HA/Col支架上，呈长梭形，伸出伪足(图4)。



A: 对照组; B: Col组; C: HA组; D: HA/Col组

图 3 人PDLC在支架上的生长 倒置相差显微镜 ×200

Fig 3 Observation on growth of human PDLC on scaffolds inverted phase contrast microscope ×200



A: 胶原支架 SEM ×35; B: 透明质酸支架 SEM ×30; C: 透明质酸/胶原支架 SEM ×35; D: 人PDLC在胶原上的生长 SEM ×800; E: 人PDLC在透明质酸/胶原上的生长 SEM ×800

图 4 支架结构及人PDLC在支架上的生长

Fig 4 Observation on scaffolds and growth of human PDLC on scaffolds

3 讨论

牙周组织工程是在体外将种子细胞种植在模拟细胞外基质材料上,在生长因子作用下,经过一段时间的培养,将这种细胞与生物材料复合体植入牙周病损部位,形成新的具有其原来特殊功能和形态的相应牙周组织,达到修复创伤和重建功能的目的。

PDLC是一种复杂的细胞群,包括成纤维细胞、成牙骨质细胞、成骨细胞和未分化的间充质细胞等。其中牙周膜成纤维细胞是牙周膜最主要的细胞,该细胞的主要功能是合成胶原,还可发育为成骨细胞和成牙骨质细胞,在牙周组织再生中起着重要作用^[3-4]。本研究种子细胞是从人牙周膜中分离培养的细胞,免疫组化染色显示抗波形丝蛋白阳性,抗角蛋白阴性,证实来源于中胚层,结合细胞形态学观察,可以表明所获得的细胞是人PDLC。

胶原具有特异性的分子识别信号,可促进细胞黏附和生长,诱导细胞分化,且具有良好的生物相容性,在组织工程学方面被广泛应用^[5]。透明质酸是人体组织中自然存在而不可缺的一种透明质酸钠盐,具有抗水肿、抗炎及促进细胞移行、分化的作用^[6-8]。碳化二亚胺是一类具有良好生物相容性的化学交联剂,利用其交联糖胺聚糖-胶原复合物,可以降低其生物降解性及抗原性;且不作为连接的一部分滞留在交联物分子中,而是转变为具有极低细胞毒性的水溶性脲衍生物释放^[9-10]。透明质酸和胶原作为天然支架材料有优异的生物学性能,利用EDC交联能改善其生物降解性;在胶原中加入透明质酸能更好地促进人PDLC在胶原支架上的黏附、增殖。

在组织工程研究中,支架材料设计是成败的关键^[11]。研究表明用10 mmol/L及以上浓度的EDC交联HA/Col复合物,能够提高其机械强度,降低其生物降解性,L929成纤维细胞培养显示几乎无细胞毒性^[12];当HA和Col质量比为1:4时,复合支架促人皮肤细胞黏附、增殖、胶原合成作用最显著^[13]。因此本研究利用0.6%的EDC交联质量比为1:4的HA/Col复合物作为支架材料。MTT检测结果发现在第1天时实验组支架上的附着细胞数均高于对照组,且HA/Col组高于Col组和HA组;HA组、Col组、HA/Col组支架均促进了人PDLC的黏附,且HA/Col组复合支架的促黏附作用更明显。在第2天时,HA组支架溶解、细胞形态改变。与对照组比较,Col组人PDLC数量第2、4天明显增加($P<0.05$),第7天时两组比较无统计学差异,Col组支架促进了人PDLC生长;HA/Col组人PDLC数量第2、4、7天时均高于对照组($P<0.05$),HA/Col组支架促进了人PDLC生长。

扫描电镜观察人PDLC在Col、HA/Col组支架上黏附良好,呈长梭形。以上结果表明,HA/Col组复合支架与人PDLC之间具有良好的生物相容性,其多孔网状结构适合细胞的黏附、生长;相对于Col组支架则明显促进人PDLC的黏附。本研究仅是对HA/Col支架复合培养人PDLC的初步评价,其应用于牙周组织工程还有待于进一步的探讨。

[参考文献]

- [1] Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, et al. Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology[J]. *Periodontol* 2000, 2000, 24 :253-269.
- [2] Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, et al. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*[J]. *J Dent Res*, 1988, 67(1) :66-70.
- [3] Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, et al. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts[J]. *J Periodontal Res*, 1990, 25(3) :179-185.
- [4] Lsidor F, Karring T, Nyman S, et al. The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new tissue for new attachment formation[J]. *J Clin Periodontol*, 1986, 13(2) :145-150.
- [5] Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen[J]. *Int J Pharm*, 2001, 22(1/2) :1-22.
- [6] Stamenkovic I, Aruffo A. Hyaluronic acid receptors[J]. *Methods Enzymol*, 1994, 245(3) :195-216.
- [7] Rosier RN, O'Keefe RJ. Hyaluronic acid therapy[J]. *Instr Course Lect*, 2000, 49(4) :495-502.
- [8] Oksala O, Salo T, Tammi R, et al. Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing[J]. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43(2) :125-135.
- [9] Pieper JS, van Wachem PB, van Luyn MJA, et al. Attachment of glycosaminoglycans to collagenous matrices modulates the tissue response in rats[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(16) :1689-1699.
- [10] Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M. The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(23) :3145-3154.
- [11] 杨志明. 细胞与支架材料的复合:组织工程基础与临床[M]. 成都:四川省科学技术出版社, 2000 :62-67.
YANG Zhi-ming. The combination of cells and scaffold materials: Tissue engineering basis and clinic[M]. Chengdu: Science and Technology Publishing Company of Sichuan Province, 2000 :62-67.
- [12] Park SN, Park JC, Kim HO, et al. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(4) :1205-1212.
- [13] Park SN, Lee HJ, Lee KH, et al. Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(9) :1631-1641.

(本文编辑 汤亚玲)