

• 牙体牙髓病学研究 •

载柚皮苷羟基磷灰石胶原支架对人牙髓干细胞
体外增殖及成骨向分化的影响

侯婷婷 潘爽 李艳萍 何丽娜 肖婉鲁 牛玉梅*

(哈尔滨医科大学口腔医院牙体牙髓病科 黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的:探讨载柚皮苷羟基磷灰石胶原复合支架对人牙髓干细胞体外增殖以及成骨向分化的影响。方法:体外扩增人牙髓干细胞与复合支架联合培养。采用 CCK-8 法检测人牙髓干细胞在支架上的增殖能力,通过检测碱性磷酸酶活性、茜素红染色和蛋白质印迹法观察支架对细胞体外成骨向分化能力的影响。结果:载柚皮苷羟基磷灰石胶原复合支架能促进牙髓干细胞增殖($P < 0.05$),并能增加其 ALP 活性($P < 0.05$)增强矿化能力,并对成骨相关标记蛋白 RUNX-2 和 BMP-2 的表达具有上调作用。结论:载柚皮苷羟基磷灰石胶原支架可提高人牙髓干细胞的增殖能力以及成骨分化的潜能。

[关键词] 柚皮苷 羟基磷灰石胶原支架 人牙髓干细胞 成骨向分化增殖

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)08—0744—04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.08.006

Naringin in Nanometer Hydroxyapatite Collagen Scaffold Enhanced the Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells *in Vivo*. HOU Tingting, PAN Shuan, LI Yanping, HE Lina, XIAO Wanlu, NIU Yumei*. *Department of Endodontics, Stomatology Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China.*

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of naringin-hydroxyapatite collagen scaffold (Nar-HA/COL) on proliferation and osteoblastic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Methods:** hDPSCs were isolated and cultured on Nar-HA/COL scaffolds. CCK-8 was used to detect the proliferation ability. The osteoblastic differentiation potentials were assessed by alkaline phosphatase assay kit, Alizarin red S histochemical staining, and western Blot. **Results:** The proliferation ability, ALP activity, mineralization potential, RUNX-2, and BMP-2 proteins expression of hDPSCs were enhanced by 0.5% Nar-HA/COL scaffolds. **Conclusion:** The results showed Nar-HA/COL scaffolds could enhance the proliferation and osteoblastic differentiation abilities of hDPSCs.

[Key words] naringin hydroxyapatite collagen scaffold human dental pulp stem cells osteoblastic differentiation

柚皮苷(Naringin, Nar)黄酮类化合物为中药骨碎补的有效成分,具有促进干细胞增殖,成骨向分化以及预防机体骨丢失的能力^[1]。羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)和胶原(collagen, COL)是天然骨骼中的主要成分,HA/COL 复合支架具有良好的结构和生物性能^[2],在骨组织工程中应用广泛。人牙髓干细胞具有多向分化的潜能^[3],可作为组织工程的种子细胞。本实验制备出载柚皮苷的 HA/COL 复合支架(Nar-HA/COL),将人牙髓干细胞与

支架体外共同培养,研究 Nar-HA/COL 支架对人牙髓干细胞增殖以及成骨向分化能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与设备 柚皮苷(Sigma, USA), HA/COL 复合支架(奥精,北京),高糖培养基 DMEM(Hyclone, USA),胎牛血清 FBS, 0.25% 胰酶 EDTA,青霉素/链霉素(双抗)(Gibco, USA), CCK-8(博士德,上海),碱性磷酸酶测试盒(建成,南京),酶标仪(BioTek, USA),倒置相差显微镜照相系统(Olympus, Japan)。

1.2 hDPSCs 的培养与鉴定 收集 15~25 岁健康人拔除阻生齿或因正畸拔出的完整无龋坏前磨牙和智齿。在超净台内取出牙髓,用改良酶消化法分离,

基金项目 国家自然科学基金(编号:81570963)

作者简介 侯婷婷(1992~),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,医师,主要从事牙体牙髓病科临床治疗工作。

* 通信作者 牛玉梅, E-mail: yumeiniu@163.com

培养和鉴定人牙髓干细胞^[4]。

1.3 制备 Nar-HA/COL 支架 将柚皮苷溶解于无水乙醇中得到 0.5% 质量分数的柚皮苷乙醇溶液。经过⁶⁰Co 消毒 HA/COL 复合支架剪裁成 8 mm×8 mm 大小,浸泡在 0.5% 质量分数的柚皮苷乙醇溶液中 8 h,超净台中通风过夜吹干,紫外照射 8 h,无菌超纯水清洗 15 min,过夜吹干,不含柚皮苷的无水乙醇浸泡 HA/COL 支架相同处置为对照组。

1.4 CCK-8 检测 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 粘附的影响 Nar-HA/COL 支架和 HA/COL 支架中均匀接种密度为 2×10^4 个/支架的第 3 代 hDPSCs 于 24 孔板中培养。加入 DMEM 完全培养基(含 1% 双抗,10% FBS 的 DMEM 培养基),在加入培养液后 1、5、8 h 弃掉培养液,EDTA 消化支架中的细胞收集,PBS 冲洗支架 3 次收集,细胞计数器检测细胞个数,计算细胞的粘附率。

1.5 CCK-8 检测 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 粘附的影响 Nar-HA/COL 支架和 HA/COL 支架中均匀接种密度为 2×10^4 个/支架的第 3 代 hDPSCs 于 24 孔板中培养。加入 DMEM 完全培养基(含 1% 双抗,10% FBS 的 DMEM 培养基),在加入培养液后 1、5、7 d 加入 CCK-8 试剂,37 °C 孵育 2 h,转移到新的 96 孔板中酶标仪检测 450 nm 波长的 A 值。

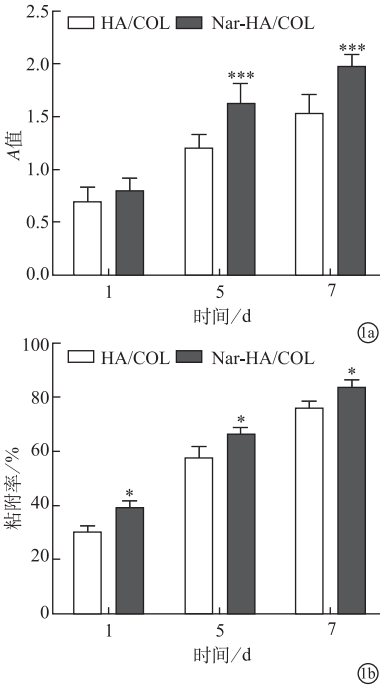
1.6 ALP 检测 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 成骨向分化的影响 将密度为 2×10^4 个/支架的第 3 代 hDPSCs 均匀接种到 Nar-HA/COL 支架和 HA/COL 支架中,于 24 孔板中培养。加入 DMEM 培养液 1 d 后,更换成矿化诱导液(含有 1% 双抗、10% FBS、10 nm/L 地塞米松、10 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 mg/L 抗坏血酸的 DMEM 培养基)进行矿化诱导。每 2 d 更换 1 次培养基,7 d 和 14 d 后,弃上清液,PBS 冲洗 3 次,每孔加入 300 μ L 0.2% TritonX-100 100 μ L,冰上裂解 40 min,按 ALP 试剂盒说明书操作,酶标仪 520 nm 波长处检测个孔的 A 值,计算相对 ALP 活性。

1.7 茜素红染色检测 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 成骨向分化的影响 HDPSCs 矿化诱导 21 d 后进行茜素红染色。弃培养液,PBS 冲洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 4 °C 过夜。PBS 冲洗 3 次之后,加入 1% 茜素红染液室温下 30 min 孵育,超纯水冲洗 3 次。光学显微镜下观察矿化结节并拍照。

1.8 Westernblot 检测 Nar-HA/COL 支架对

hDPSCs 成骨相关标记蛋白表达的影响 细胞矿化诱导培养 8 d 后收集对照组和实验组支架上细胞,加入含有 PMSF 的 RIPA 裂解液(RIPA : PMSF = 100 : 1) 提取细胞总蛋白并用 BCA 法测定蛋白浓度。每孔总蛋白上样量为 20 μ g,8% Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿转法转至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉室温下封闭 2 h。孵育一抗(RUNX-2、BMP-2 以 1 : 500 比例稀释;GAPDH 以 1 : 5000 比例稀释)4 °C 过夜,含 0.05% 吐温的 TBST 漂洗 3 次,室温下进行二抗的孵育(均以 1 : 1000 的比例稀释),1 h 后再用 TBST 进行漂洗 3 次,ECL 发光液曝光显影。GAPDH 作为内参 Image J 软件进行图像的灰度值分析,统计结果。

1.9 统计学分析 用 GphpadPrism 7 统计学软件处理实验数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义,所有实验独立重复 3 次。



1a: 两组增殖率比较; 1b: 两组粘附率比较
图 1 不同支架对 hDPSCs 增殖和粘附能力的影响 (* * * *P* < 0.01)
Fig. 1 Effects of different scaffolds on the adhesion and proliferation abilities of hDPSCs. (* * * *P* < 0.01)

2 结果

2.1 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 粘附和增殖的影响 CCK-8 结果显示 1 d 时,Nar-HA/COL 支架与对照组 HA/COL 支架上接种的 DPSCs 增殖能力没有统计学差异,但在 5、7 d 时 Nar-HA/COL 支架显著促进 hDPSCs 增殖(*P* < 0.01),见图 1a。细胞计数统计

显示 Nar-HA/COL 支架与对照组 HA/COL 支架相比在 1、5、8 h 细胞的粘附率增加,见图 1b。

2.2 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 成骨向分化的影响 Nar-HA/COL 支架组在矿化诱导 7 d 和 14 d 时 ALP 的活性显著高于对照组 HA/COL 支架 ($P<0.01$),见图 2。

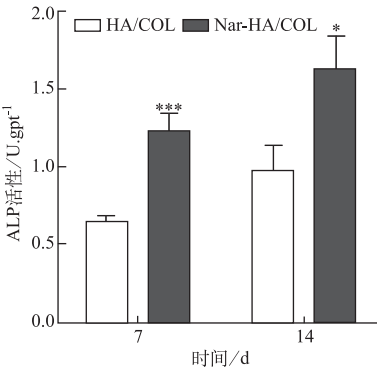
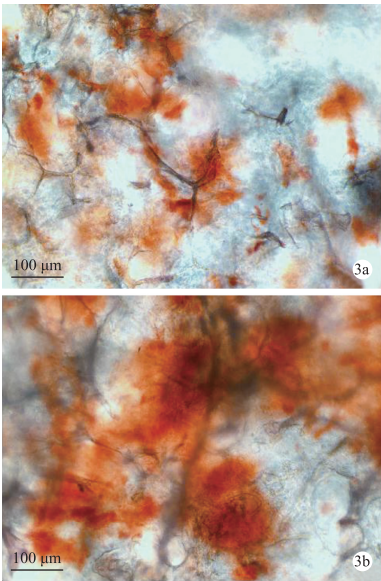


图 2 不同支架对 hDPSCs 相对 ALP 活性的影响 (* $P<0.05$, *** $P<0.01$)

Fig. 2 Effects of different scaffolds on relative ALP activity of hDPSCs. (* $P<0.05$, *** $P<0.01$)

2.3 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 矿化的影响 如图 3,与对照组 HA/COL 支架相比,Nar-HA/COL 支架组细胞染色较深且面积大,矿化结节形成更多。

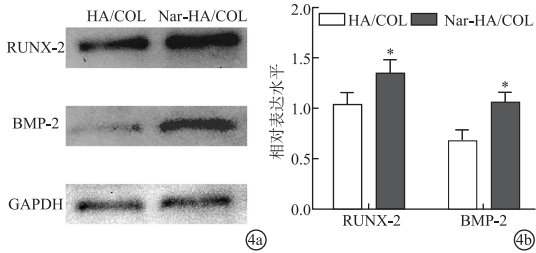


3a: HA/COL;3b:Nar-HA/COL
图 3 不同支架对 hDPSCs 矿化能力的影响

Fig. 3 Effects of different scaffolds on the mineralization capability of hDPSCs.

2.4 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 成骨标相关标记蛋白的影响 Nar-HA/COL 支架组在矿化诱导 8 d 后 RUNX-2、BMP-2 蛋白的表达量明显上调,见

图 4。



4a: Western blot 电泳图;4b:蛋白定量分析
图 4 不同支架对 hDPSCs 成骨相关蛋白 RUNX-2 和 BMP-2 的影响

Fig. 4 Effects of different scaffolds on expression of osteogenesis-related protein in hDPSCs.

3 讨论

骨缺损的修复一直以来都是困扰临床的难题,骨组织工程的出现为骨损伤和功能修复带来了希望。理想的支架是组织工程的重要因素,为了增加支架的生物性能,通常在支架中加入药物,基因载体和生长因子[5]。柚皮苷能够促进干细胞增殖及成骨向分化[6]。BMP-2 作为成骨诱导生长因子,在促进干细胞成骨方面被广泛研究,并且作为促进因子与组织工程支架结合。但因其价格昂贵、易降解使其普遍应用与组织工程受到一定限制。柚皮苷是为中药骨碎补的有效成分,价格便宜,易于得到,性能稳定,研究显示它能够促进干细胞合成与分泌 BMP2[7]。HA/COL 复合支架结合了 HA 优良的机械性能,不易降解,可以为种子细胞成骨提供良好的支撑[8];COL 具有多孔隙结构,能够提供足够的空间供种子细胞增殖分化,且具有良好的生物相容性能够促进干细胞的增殖和粘附[9]。本实验的目的在于结合柚皮苷和 HA/COL 复合支架的优良性能,以 hDPSCs 作为种子细胞,研究 Nar-HA/COL 支架对 hDPSCs 增殖和成骨向分化的影响。

组织工程支架能否促进种子细胞增殖是构建支架的关键之一,而种子细胞粘附在支架上是细胞增殖的基础。粘附实验结果 Nar-HA/COL 复合支架在细胞粘附方面优于 HA/COL 支架。柚皮苷在适宜浓度下能够促进人牙周膜干细胞、人脐带间充质干细胞和 小鼠 MC3T3-E1 细胞的增殖[10-12]。CCK-8 结果显示与 HA/COL 复合支架相比,Nar-HA/COL 复合支架更能够促 hDPSCs 增殖,且随着时间的增加细胞数量显著增加,说明柚皮苷在支架上仍具有活性,加入柚皮苷能够促进 HA/COL 支架对 hDPSCs 的增殖且有一定的时间依赖性[13]。成骨可以分为 3 个阶段:成骨祖细胞阶段、成骨细胞

前阶段和成熟成骨细胞阶段。本研究发现 Nar-HA/COL 复合支架能够促进 hDPSCs 成骨向分化。ALP 活力测试中,Nar-HA/COL 和 HA/COL 复合支架都能诱导 hDPSCs 分泌 ALP,但 Nar-HA/COL 复合支架在成骨诱导 7 d、14 d 后促进效果明显优于 HA/COL 复合支架对照组,且 ALP 的表达量随着时间的延长而增加。这可能是由于柚皮苷和 HA/COL 复合支架增强 ALP 活性性能的叠加作用。有研究发现,柚皮苷能够促进人牙周韧带干细胞的增殖和 ALP 活性^[11],这和本实验结果一致。矿化结节的形成代表成骨的后期阶段,通过茜素红染色结果图片的观察,Nar-HA/COL 复合支架相交单纯的 HA/COL 复合支架产生更多的矿化结节,说明其具有更强的促进 hDPSCs 矿化的能力。Western blot 实验结果显示 Nar-HA/COL 复合支架中 hDPSCs 成骨相关蛋白 RUNX-2 和 BMP-2 的表达明显上调。RUNX-2 是骨发育过程中重要的转录因子,对成骨细胞的分化、软骨细胞成熟、破骨细胞的分化及细胞外基质的分泌都有重要的调控作用^[14]。RUNX-2 的表达是间充质干细胞向成骨骨细胞谱系分化的必要和充分条件。骨形态发生蛋白(BMPs)具有使未分化的间充质细胞定向分化为成骨细胞并形成骨组织的能力,其中 BMP-2 是最重要的诱导成骨因子。在体内和离体实验都证明 BMP-2 具有促进成骨细胞分化和诱导体外成骨的能力。BMP-2 由于其对干细胞的成骨诱导作用,作为生物活性分子应用于骨组织工程中。BMP-2 固定在壳聚糖-透明质酸聚电解质复合物与京尼平交联的复合支架上,BMP-2 和 HA/COL 复合支架结合,均够促进 MC3T3-E1 细胞的成骨向分化^[15]。本实验中检测到矿化诱导 8 d 时,Nar-HA/COL 支架相比对照组支架能够明显上调 RUNX-2 和 BMP-2 的表达,表明 Nar-HA/COL 复合支架能够诱导人牙髓干细胞成骨向分化且有可能是通过上调 BMP-2 的表达完成的。

中药骨碎补具有促进骨折愈合,强骨补肾的功效。柚皮苷作为骨碎补的有效成分,在体外能够诱导骨髓间充质细胞、MC3T3-E1 细胞、牙周韧带细胞等增殖和成骨向分化。本实验将柚皮苷结合到 HA/COL 复合支架上,检测其在体外对 hDPSCs 增殖以及成骨向分化能力的影响,结果表明柚皮苷具有替代 BMP-2 成为骨组织工程诱导药物的潜能,Nar-HA/COL 复合支架能够促进 hDPSCs 的增殖以及成骨向分化,具有作为骨组织工程支架的潜能,

但其具体的机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Yu M, You D, Zhuang J, et al. Controlled release of naringin in metal-organic framework-loaded mineralized collagen coating to simultaneously enhance osseointegration and antibacterial activity [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9 (23):19698-19705.
- [2] Ma X, He Z, Han F, et al. Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, 143: 81-87.
- [3] Gu Y, Bai Y, Zhang D. Osteogenic stimulation of human dental pulp stem cells with a novel gelatin-hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold [J]. J Biomed Mater Res A, 2018, 106(7): 1851-1861.
- [4] 于天瑶,潘爽,何丽娜,等. Rho 激酶抑制剂 Y-27632 对人牙髓干细胞增殖能力的影响[J]. 口腔医学研究,2016,32(3):278-281.
- [5] Black CR, Goriainov V, Gibbs D, et al. Bone tissue engineering [J]. Curr Mol Biol Rep, 2015, 1(3):132-140.
- [6] Wong RW, Rabie AB. Effect of naringin collagen graft on bone formation [J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1824-1831.
- [7] Ji Y, Wang L, Watts DC, et al. Controlled-release naringin nanoscaffold for osteoporotic bone healing [J]. Dent Mater, 2014, 30(11): 1263-1273.
- [8] Villa MM, Wang L, Huang J, et al. Bone tissue engineering with a collagen-hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015, 103(2):243-253.
- [9] Dawson JI, Wahl DA, Lanham SA, et al. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells [J]. Biomaterials, 2008, 29(21): 3105-3116.
- [10] 张帆,司文腾,白玉,等. 柚皮苷对人脐带间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 风湿病与关节炎,2016,5(5):9-12.
- [11] 蒋俊强,丁一,李小明,等. 骨碎补柚皮苷对人牙周膜细胞增殖、碱性磷酸酶活性影响的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2009,27(5):538-541.
- [12] 张恩南,郭晓宁,李丹. 柚皮苷对 H₂O₂ 处理小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 骨形成的影响[J]. 山东中医药大学学报,2016,40 (2):178-181.
- [13] Yin L, Cheng W, Qin Z, et al. Effects of naringin on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Stem Cells Int, 2015, 2015:758706.
- [14] 陈伟健,晋大祥,谢炜星,等. Runx2 基因参与骨代谢相关通路的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2018,24(4):557-560.
- [15] Cai Y, Tong S, Zhang R, et al. *In vitro* evaluation of a bone morphogenetic protein-2 nanometer hydroxyapatite collagen scaffold for bone regeneration [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (4): 5830-5836.

[收稿日期:2019-01-29]

(本文编辑 李四群)