

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.06.038

富血小板纤维蛋白对人牙周膜细胞成骨能力、炎症因子表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响*

何杨 肖帅 李迺 曾婷艳 唐俊

(长沙市第三医院(湖南中医药大学附属长沙医院)口腔科 湖南长沙 410035)

摘要 目的:探究富血小板纤维蛋白(PRF)对人牙周膜细胞(hPDLCs)成骨能力、炎症因子表达和 Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路的影响。**方法:**通过刮取法、组织块法获取 2019 年 1 月至 2020 年 1 月期间我院口腔科收治的 10 例正畸患者拔除健康阻生牙或正畸牙的牙周组织作为研究样本。将 hPDLCs 细胞分为干预 1 组、干预 2 组、对照组、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)组, 各组均采用含有 10% FBSMEM 培养基培养, TNF- α 组加用 10 ng/mL TNF- α 诱导液, 干预 1 组加用 50% PRF 培养, 干预 2 组加用 10 ng/mL TNF- α 诱导液和 50% PRF。对比各组的细胞增殖、碱性磷酸酶(ALP)活性、炎症因子、Wnt/ β -catenin 信号通路关键因子的表达差异。**结果:**(1)相比于其他 3 组, 干预 1 组的吸光度值(OD)明显升高, 相比于 TNF- α 组, 干预 2 组、对照组的 OD 值均明显升高($P<0.05$);(2)和其他 3 组相比, 干预 1 组的 ALP 活性明显升高, 相比于 TNF- α 组, 干预 2 组、对照组的 ALP 活性均明显升高($P<0.05$);(3)和其他 3 组相比, 干预 1 组的骨形态发生蛋白 2(BMP2) mRNA、runt 相关转录因子 2(Runx2) mRNA、BMP2 及 Runx2 蛋白表达水平均明显升高, 相比于 TNF- α 组, 干预 2 组、对照组的 BMP2 mRNA、Runx2 mRNA、BMP2 及 Runx2 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$);(4)相比于干预 1 组、对照组, 干预 2 组、TNF- α 组的 TNF- α mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$);(5)和其他 3 组相比, 干预 1 组的细胞周期蛋白 D1(CyclinD1) mRNA、 β -catenin mRNA 表达水平明显升高, 相比于 TNF- α 组, 干预 2 组、对照组的 CyclinD1 mRNA、 β -catenin mRNA 表达水平均明显升高($P<0.05$)。**结论:**PRF 可以促进 hPDLCs 细胞增殖和成骨, 并减少炎症因子表达, 提升 ALP 活性, 其可能是通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促进 CyclinD1、 β -catenin mRNA 表达加快 hPDLCs 细胞成骨。

关键词:富血小板纤维蛋白;人牙周膜细胞;成骨能力;炎症因子;Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号:R-33;R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)06-1180-06

Effects of Platelet-rich Fibrin on Osteogenic Ability, Expression of Inflammatory Factors and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Human Periodontal Ligament Cells*

HE Yang, XIAO Shuai, LI Li, ZENG Ting-yan, TANG Jun

(Department of Stomatology, Changsha Third Hospital(Changsha Hospital Affiliated to Hunan University of Traditional Chinese Medicine), Changsha, Hunan, 410035, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of platelet-rich fibrin (PRF) on osteogenic ability, expression of inflammatory factors and Wnt/ β -catenin (Wnt/ β -catenin) signaling pathway in human periodontal ligament cells (hPDLCs). **Methods:** Periodontal tissues of 10 orthodontic patients who were admitted to the Department of Stomatology from January 2019 to January 2020 were extracted from healthy impacted teeth or orthodontic teeth as research samples by curettage and tissue block methods. The hPDLCs cells were divided into intervention group 1, intervention group 2, control group and tumor necrosis factor- α (TNF- α) group. All groups were cultured with 10%FBSMEM medium. TNF- α group was added with 10 ng/mL TNF- α induction medium, and intervention group 1 was added with 50% PRF culture. Intervention group 2 was supplemented with 10 ng/mL TNF- α induction solution and 50% PRF. The expression of differences in cell proliferation, alkalinephosphatase (ALP) activity, inflammatory factors and key factors of Wnt/ β -catenin signaling pathway were compared among all groups. **Results:** (1) Compared with the other 3 groups, the absorbance value (OD) of intervention group 1 significantly increased, compared with TNF- α group, the OD of intervention group 2 and control group significantly increased ($P<0.05$). (2) Compared with the other 3 groups, the ALP activity of intervention group 1 significantly increased. Compared with TNF- α group, the ALP activity of intervention group 2 and control group significantly increased ($P<0.05$). (3) Compared with the other 3 groups, the expression levels of bonemorphogeneticprotein-2 (BMP2) mRNA, runt-relatedtranscriptionfactor-2 (Runx2) mRNA, BMP2 and Runx2 protein of intervention group 1 significantly increased, compared with TNF- α group, the expression levels of BMP2 mRNA,

* 基金项目:湖南省卫生健康委员会科研计划课题项目(B2017198)

作者简介:何杨(1971-),女,本科,副主任医师,从事口腔医学方向的研究,E-mail: heyang710608@163.com

(收稿日期:2021-08-23 接受日期:2021-09-18)

Runx2 mRNA, BMP2 and Runx2 protein in intervention group 2 and control group significantly increased ($P < 0.05$). (4) Compared with intervention group 1 and control group, the expression level of TNF- α mRNA of intervention group 2 and TNF- α group significantly increased ($P < 0.05$). (5) compared with the other 3 groups, the expression levels of CyclinD1 mRNA and β -catenin mRNA of intervention group 1 significantly increased, and compared with TNF- α group, the expression levels of CyclinD1 mRNA and β -catenin mRNA of intervention group 2 and control group significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** PRF can promote the proliferation and osteogenesis of hPDLs cells, reduce the expression of inflammatory factors, and enhance the ALP activity, which may promote the expression of CyclinD1 and β -catenin mRNA and accelerate the osteogenesis of hPDLs cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Platelet-rich fibrin; Human periodontal ligament cells; Osteogenic ability; Inflammatory factors; Wnt/ β -catenin signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)06-1180-06

前言

牙周组织包括牙周膜、牙龈、牙槽骨、牙骨质等,牙周炎会造成牙周组织损伤并导致骨质丧失,严重者会引发牙齿脱落,对患者的生活质量造成影响,由于其结构较复杂,具体的病理机制尚不明确,是国内外研究的热点方向^[1,2]。现阶段多选择牙周受损组织修复再生以及重建方案治疗,人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)是一组可以表达间充质干细胞表型的多能干细胞,是牙周组织的主要细胞,在一定条件下具有向成牙骨质细胞、成骨细胞分化的潜能,因此 hPDLs 对牙周组织的再生重建具有重要意义,且 hPDLs 细胞大量增殖是促进成骨分化以及牙周组织再生的首要前提^[3]。富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)是第二代血小板浓缩制品,优势是制备流程简单且未添加任何抗凝剂,其纤维网状支架结构可释放大量可溶性生长因子,并通过该途径发挥促进成骨细胞增殖、成骨相关蛋白表达的作用,例如骨形态发生蛋白 2 (bonemorphogenetic protein-2, BMP2)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor-2, Runx2)等,有助于牙周组织再生^[4-6]。有研究指出 PRF 可以促进成骨并有效调控炎症,临床上能够独立应用修复小范围的骨缺损,其中肿瘤细胞坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是反映炎症的敏感指标,参与绝大多数的炎症反应过程^[7],另外有研究指出经典 Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin)信号通路在干细胞成骨分化过程中发挥重要作用^[8,9]。目前已有研究文献中针对 PRF 影响 hPDLs 细胞成骨能力、细胞增殖以及相关细胞因子、信号通路的临床机制尚未明确,因此本次研究通过刮取法、组织块法获取 10 例正畸患者拔除的健康阻生牙或正畸牙的牙周组织进行深入分析,旨在明确 PRF 对 hPDLs 细胞成骨能力、炎症因子表达和 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用机制,为后续 PRF 在牙周组织再生重建治疗中的应用提供一定参考。现汇报如下。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的相关仪器与试剂见表 1。

1.2 方法

1.2.1 hPDLs 细胞培养与鉴定 取 2019 年 1 月至 2020 年 1 月期间本院口腔科收治的 10 例正畸患者拔除的健康阻生牙或

正畸牙作为取材样本。纳入标准:(1)健康阻生牙或正畸牙;(2)拔出牙齿无明显细菌感染;(3)患者明确研究内容并自愿签署同意书。冲洗样本牙齿后刮取牙颈部牙龈组织并按照组织块法对收集的根中 1/3 处牙周膜组织进行培养。流式细胞仪检测 hPDLs 细胞表面标记物 CD90、CD105、CD44、CD29 并采用免疫荧光法 DAPI 染色鉴定。本项试验方案已经通过我院伦理委员会审核批准。

1.2.2 PRF 制备 分别取 3 例牙龈组织捐供者的 2 mL 肘静脉血按照半径 7 cm、转速 3000 r/min 条件离心 10 min,静置于常温环境中并丢弃血浆,取中间层的 PRF 凝胶并使用双层无菌纱布包裹后轻轻按压,持续 10 s 后制成膜片,将膜片置于 5 mL DMEM 培养基中浸泡,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中放置培养 7 d,取出 PRF 浸出液,按照以上参数再次离心,过滤除菌后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.3 分组方法 将 hPDLs 细胞分为干预 1 组、干预 2 组、对照组、TNF- α 组,对照组 hPDLs 细胞采用含有 10% FBS DMEM 培养基培养, TNF- α 组是采用含有 10% FBS DMEM 培养基以及 10 ng/mL TNF- α 诱导液培养,干预 1 组 hPDLs 细胞在其基础上加入 50% PRF 培养,干预 2 组是采用 10% FBS DMEM 培养基、10 ng/mL TNF- α 诱导液以及 50% PRF 培养。

1.2.4 hPDLs 细胞增殖的检测方法 四组分别取生长状态良好的对数生长期 hPDLs 细胞,每孔按 5×10^4 个接种至 96 孔板中,每组设置 5 个复孔,待细胞贴壁后每孔加入 200 μ L 对应的培养基置于细胞培养箱中培养,继续培养 24 h,弃细胞培养基,间隔 3 天换液,分别培养 7 d,每孔加入 20 μ L MTT,在避光条件下继续孵育 4 h,丢弃上清并按照 150 μ L/孔条件加入 DMSO,充分震荡 10 min,待结晶物完全溶解采用酶标仪测定 490 nm 的吸光度值(optical density, OD)。实验重复 3 次,取实验结果的平均值作为最终实验结果。

1.2.5 ALP 活性检测方法 分别取四组处于对数生长期的 hPDLs 细胞,按照 2×10^4 个/孔密度在 12 孔板中接种,每组设置 3 个复孔,待细胞贴壁后每孔加入 1 mL 对应的培养基,间隔 3 天换液,分别培养 14 d,丢弃孔内液体并每孔加入 200 μ L 1% Triton X-100 裂解细胞,在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,应用 ALP 试剂盒以及 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定 ALP 活性,测定步骤严格按照说明书操作完成。实验重复 3 次,取实验结果的平均值作为最终实验结果。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)

检测方法 应用 Trizol 法提取总 RNA, 以 iScript cDNA Synthesis Kit 反转录获取总 cDNA。PCR 反应体系: 2× SYBR Premix 10 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, 模板 1 μL, 双蒸水 7 μL, 总体积 20 μL。目的基因序列以及 PCR 检测引物合成由研究室完成。95℃ 下进行 2 min 的 PCR 预变性, 在 95℃ 下进行 10 s 的变性, 在 60℃ 下进行 20 s 退火处理, 在 72℃ 下进行 20 s

的延伸, 40 次循环, 采用 SYBR Premix 法荧光定量分析 BMP2 mRNA、Runx2 mRNA、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) mRNA 及 β-catenin mRNA、TNF-α mRNA 表达水平, 以 β-actin 作为内参, 并以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算目的基因的相对表达水平。基因引物序列见表 2。

表 1 仪器与试剂
Table 1 Instruments and reagents

Instruments and reagents	Manufacturer
Trypsin	USA Gibco company
Fetal bovine serum(FBS)	USA Gibco company
DMEM culture medium	USA Gibco company
Double antibody	USA Gibco company
Methylthiazolotrazolium(MTT)	USA Sigma company
Runx2 antibody	USA Sigma company
BMP2 antibody	USA Sigma company
CD29, CD44, CD90, CD105 antibody	USA eBioscience company
BCA protein content determination reagent	Nanjing Kaiji biological company
SW-CJ-2F type super clean workbench	Shanghai Boxun industrial limited company
XDS-1B type inverted microscope	Chongqing optical instrument factory
Carbon dioxide incubator	USA Thermo company
Electrophoresis gel quantitative analysis system	USA Kodak company
PrimeScript® RT reverse transcription Kit	Beijing Takara company
Trizol reagent	Beijing Takara company
SYBR® Premix Ex Taq™ II test kit	Beijing Takara company
1%TritonX-100	Beijing regen biotechnology limited company
Dimethyl sulfoxide(DMSO)	Shanghai lianshuo biotechnology limited company
Multiskan SkyHigh full wavelength microplate reader	USA thermo shier technology limited company
TNF-α induction medium	Beijing baiolaibo technology limited company
CytoFLEX flow cytometry	USA thermo shier technology limited company

表 2 基因引物序列
Table 2 Gene primer sequences

Gene	Forward primer	Reverse primer
Runx2	5'-GCGGACGAGGCAAGAGTT-3'	5'-TTGGTGTCTGAGTTCAGGGAG-3'
β-catenin	5'-TGGCAACCAAGAAAGCAAG-3'	5'-CTGAACAAGAGTCCCAAGGAG-3'
CyclinD1	5'-CCCTCGGTGTCTACTTCA-3'	5'-GTTTGTCTCTCCCGCCTCT-3'
β-actin	5'-AGACCTTCAACACCCAG-3'	5'-CACGATTTCCCTCTCAGC-3'
TNF-α	5'-CAGGTGCAAAGCCAGCGACT-3'	5'-AGGGGATCTGGGTAGGGGGCT-3'
BMP2	5'-CCTCCCTGATGAATAAAGATGG-3'	5'-CTGGGCGGTCTCCACTGA-3'

1.2.7 Western blotting 检测蛋白表达 取对数生长期的 hPDLCs 细胞接种在 6 孔板中, 加入 200 μL 裂解缓冲液并充分混匀, 冰浴 30 min, 细胞充分裂解后在 4℃ 条件下, 按照

1300 r/min 转速离心 10 min。提取上层清液分装于容器中, 在 -20℃ 的环境中保存备用。蛋白浓度使用 BCA 分析试剂盒进行检测, 经 SDS-PAGE 电泳分离后将蛋白进行转膜, 转移至

PVDF膜并进行标记,使用TBST进行重复洗膜,至少3次,每次持续10分钟。将5%浓度的脱脂奶粉加入进行封闭处理,持续2h,加入一抗溶剂在37℃环境中进行摇床,振荡混匀后进行孵育,过夜。使用TBST进行清洗,重复清洗3次,每次持续10分钟。加入二抗试剂在室温环境中持续反应2小时,使用TBST进行清洗,重复清洗3次,每次持续5~10分钟。ECL化学发光液暗盒中进行曝光。将获得的结果应用Gel-Pro32软件进行灰度分析,计算BMP2、Runx2的蛋白表达情况。

1.3 统计学方法

采用SPSS20.0软件进行统计分析。采用Shapiro-Wilk法

检验正态性和方差齐性,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示正态分布的计量资料,采用t检验组间比较,多组数据比较差异采用单因素方差分析(F检验)。P<0.05,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对比四组hPDLCs细胞的细胞增殖情况差异

干预1组的OD值比干预2组、对照组、TNF-α组高,干预2组、对照组OD值均比TNF-α组高,差异均有统计学意义(P<0.05);干预2组的OD值高于对照组,但两组的OD值差异无统计学意义(P>0.05)。附表3。

表3 对比四组hPDLCs细胞的细胞增殖情况差异($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparing the differences in cell proliferation of hPDLCs cells in the four groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	OD
Intervention group 1	0.91± 0.22 ^{abc}
Intervention group 2	0.74± 0.14 ^c
Control group	0.72± 0.23 ^c
TNF-α group	0.61± 0.11
F	2.231
t	0.002

Note: ^a referred to compared with intervention group 2, P<0.05; ^b referred to compared with control group, P<0.05; ^c referred to compared with TNF-α group, P<0.05.

2.2 对比四组hPDLCs细胞的ALP活性结果差异

干预1组的ALP活性比干预2组、对照组、TNF-α组高,干预2组、对照组ALP活性均比TNF-α组高,差异均有统计学

意义(P<0.05);干预2组的ALP活性高于对照组,但两组的ALP活性差异无统计学意义(P>0.05)。附表4。

表4 对比四组hPDLCs细胞的ALP活性结果差异($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of ALP activity results of the four groups of hPDLCs cells($\bar{x} \pm s$)

Groups	ALP activity
Intervention group 1	1.01± 0.32 ^{abc}
Intervention group 2	0.94± 0.24 ^c
Control group	0.92± 0.20 ^c
TNF-α group	0.11± 0.21
F	2.564
t	0.001

Note: ^a referred to compared with intervention group 2, P<0.05; ^b referred to compared with control group, P<0.05; ^c referred to compared with TNF-α group, P<0.05.

2.3 对比四组hPDLCs细胞的BMP2、Runx2表达差异

干预1组的BMP2 mRNA、Runx2 mRNA、BMP2及Runx2蛋白表达水平高于干预2组、对照组、TNF-α组,干预2组、对照组BMP2 mRNA、Runx2 mRNA、BMP2及Runx2蛋白表达水平均高于TNF-α组,差异均有统计学意义(P<0.05);干预2组的BMP2 mRNA、Runx2 mRNA、BMP2及Runx2蛋白表达水平高于对照组,但两组差异无统计学意义(P>0.05)。附表5。

2.4 对比四组的炎症因子表达差异

干预2组、TNF-α组的TNF-α mRNA表达水平均高于干预1组、对照组,差异均有统计学意义(P<0.05);干预2组的

TNF-α mRNA低于TNF-α组,干预1组的TNF-α mRNA低于的低于对照组,但组间差异均无统计学意义(P>0.05)。附表6。

2.5 对比四组的Wnt/β-catenin信号通路相关因子表达差异

干预1组的CyclinD1 mRNA、β-catenin mRNA表达水平高于干预2组、对照组、TNF-α组,干预2组、对照组CyclinD1 mRNA、β-catenin mRNA表达水平均高于TNF-α组,差异均有统计学意义(P<0.05);干预2组的CyclinD1 mRNA、β-catenin mRNA表达水平高于对照组,但两组差异无统计学意义(P>0.05)。附表7。

表 5 对比四组 hPDLCs 细胞的 BMP2、Runx2 表达差异($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Compared the expression differences of BMP2 and Runx2 in the four groups of hPDLCs cells($\bar{x} \pm s$)

Groups	BMP2 mRNA	Runx2 mRNA	BMP2 protein	Runx2 protein
Intervention group 1	2.32± 0.41 ^{abc}	2.24± 0.43 ^{abc}	1.64± 0.33 ^{abc}	2.54± 0.41 ^{abc}
Intervention group 2	1.55± 0.33 ^c	1.57± 0.35 ^c	1.27± 0.25 ^c	1.77± 0.34 ^c
Control group	1.53± 0.29 ^c	1.53± 0.33 ^c	1.23± 0.23 ^c	1.73± 0.32 ^c
TNF-α group	1.12± 0.32	1.11± 0.33	0.91± 0.20	1.12± 0.35
F	3.324	3.342	2.323	2.332
t	0.002	<0.001	0.011	0.008

Note: ^a referred to compared with intervention group 2, $P < 0.05$; ^b referred to compared with control group, $P < 0.05$; ^c referred to compared with TNF-α group, $P < 0.05$.

表 6 对比四组的炎症因子表达差异($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Comparison of the expression differences of inflammatory factors in the four groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	TNF-α mRNA
Intervention group 1	1.37± 0.30
Intervention group 2	2.04± 0.33 ^{ab}
Control group	1.41± 0.32
TNF-α group	2.12± 0.34 ^{ab}
F	3.342
t	0.006

Note: ^a referred to compared with intervention group 1, $P < 0.05$; ^b referred to compared with control group, $P < 0.05$.

表 7 对比四组的 Wnt/β-catenin 信号通路相关因子表达差异($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Compared the expression differences of Wnt/β-catenin signaling pathway related factors in the four groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	CyclinD1 mRNA	β-catenin mRNA
Intervention group 1	2.31± 0.42 ^{abc}	2.23± 0.44 ^{abc}
Intervention group 2	1.54± 0.34 ^c	1.56± 0.36 ^c
Control group	1.52± 0.30 ^c	1.54± 0.32 ^c
TNF-α group	1.11± 0.31	1.12± 0.34
F	2.786	2.453
t	0.004	0.007

Note: ^a referred to compared with intervention group 2, $P < 0.05$; ^b referred to compared with control group, $P < 0.05$; ^c referred to compared with TNF-α group, $P < 0.05$.

3 讨论

PRF 中含有丰富的生长因子和细胞因子,可以对多种细胞产生刺激,参与成骨细胞的增殖与分化过程并发挥重要作用,例如可以通过调节细胞因子和纤维蛋白的支架作用有效修复牙周组织^[10,11]。在临床上颌骨萎缩、上颌窦提升以及颌面骨缺损中应用 PRF 均获得一定成效,可有效促进新骨形成^[12-14]。MMT 实验结果显示,干预 1 组的 OD 值高于其余三组,提示 PRF 可以安全用于 hPDLCs 细胞实验,另外 PRF 可促进细胞增殖的机制可能是 PRF 中包含各种生长因子,有效解决了生长因子配伍问题,使细胞趋化在各类生长因子协同作用下明显增强,进而促进细胞增殖^[15,16]。ALP 活性是反映细胞成骨能力的敏感指

标,可以直观反映出 hPDLCs 细胞的成骨分化情况^[17,18]。王素文等^[19]研究表示 ALP 活性随着 hPDLCs 大量成骨分化呈高表达。Runx2 是一种特异性转录因子,通过调控细胞成骨分化参与多个成骨信号通路并发挥关键作用,BMP2 是一类分泌型蛋白,是转化生长因子-β 超家族的成员之一,可以促进成骨细胞成熟以及骨前体细胞、骨原细胞分化,另外可以上调 Runx2 表达水平并通过该途径发挥促进成骨的作用^[20,21]。本研究结果与以上文献及分析相符,干预 1 组的 ALP 活性、BMP2 mRNA、Runx2 mRNA、BMP2 蛋白、Runx2 蛋白均高于其余三组。提示 PRF 可以起到促进 hPDLCs 细胞的成骨分化作用,可能是因为 PRF 能通过所含转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1,TGF-β1)使 Samds 蛋白磷酸化,从而上调 Runx2 转录,

进而增强 ALP 活性以及 BMP2 蛋白表达, 进而加快骨细胞成熟以及骨前体细胞、骨原细胞分化进程, 最后起到促进成骨的作用, 另外 PRF 促进增殖有助于 hPDLCs 细胞快速附着根面, 进而加快牙周组织再生与愈合^[22,23]。TNF- α 是一种影响牙周炎症以及牙槽骨吸收的重要因子, 本研究的炎症因子表达结果进行分析, 干预 2 组、TNF- α 组的 TNF- α mRNA 表达均高于对照组、干预 1 组, 结合以上本研究中的成骨能力结果分析, 提示加入 TNF- α 抑制了 hPDLCs 细胞增殖以及成骨能力, 推测原因可能是 TNF- α 可以通过激活核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号发挥抑制外源性 BMP2 表达的作用, 同时可以通过抑制 BMP2 间接减弱 BMP2 对下游转录因子 Runx2 表达的诱导作用, 最终对 hPDLCs 细胞成骨过程起到抑制作用。赵斌等^[24]研究结果显示 TNF- α 构建炎症微环境会降低 hPDLCs 细胞的成骨效能。而本次加入 PRF 的干预 2 组的成骨指标明显优于仅加入 TNF- α 诱导液的 TNF- α 组, 提示在炎症位环境下加入 PRF 仍能发挥出促进成骨的积极作用, 推测作用机制可能是 PRF 中的生长因子可以通过促进 TGF- β 1 磷酸化上调 Runx2 的途径拮抗 TNF- α 激活 NF- κ B 信号通路下调 Runx2 的作用, 进而使 PRF 在炎症微环境下发挥出一定的促进成骨作用^[25,26]。

已有多项研究证实 Wnt/ β -catenin 信号通路已被证实在调节细胞增殖、分化中起到了重要的作用^[27,28]。本研究中成骨能力最高的干预 1 组其 Wnt/ β -catenin 信号通路相关因子 CyclinD1 mRNA、 β -catenin mRNA 表达水平均明显高于其他组, 提示 Wnt/ β -catenin 信号通路参与 hPDLCs 细胞成骨过程并发挥重要促进作用。Wnt/ β -catenin 信号通路是典型的信号通路之一, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路可以使 Axin/GSK3/APC 复合物在 Wnt 蛋白刺激下的合成过程受到抑制, 同时抑制 β -catenin 降解使其大量积聚并转移入核, 进而使 β -catenin 在细胞核内的水平增高, CyclinD1 蛋白是重要的细胞周期调控蛋白, 正常情况下, 激活 Wnt/ β -catenin 信号通路对 CyclinD1 的基因转录过程具有一定的促进作用, 进而使导致 CyclinD1 蛋白的表达增多, 同时启动下游靶基因表达, 从而对细胞进行有效调控并促进细胞成熟和分化, 有助于成骨速度加快^[29,30]。

本研究仍存在一定的不足之处, 例如未针对不同 PRF 浓度对 hPDLCs 细胞增殖以及成骨能力、ALP 活性等指标的影响差异进一步探究, 研究设计思路仍有进一步完善的空间, 后续可针对不同浓度 PRF 的 hPDLCs 细胞成骨能力的影响等进行深入探索。

综上所述, PRF 对 hPDLCs 细胞增殖、成骨均具有一定的促进作用, PRF 可以提升 ALP 活性并通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促使 CyclinD1、 β -catenin mRNA 高表达, 进而发挥促进 hPDLCs 细胞成骨的作用, PRF 可能作为牙周组织再生重建治疗的一种新型方案。

参考文献(References)

[1] Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15): 995-1003

[2] 周维君, 车英林, 苏野, 等. 牙周组织再生术联合正畸治疗对牙周炎患者牙周状况及满意度的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19

(9): 1683-1686, 1691

[3] Cui D, Li H, Wan M, et al. The Origin and Identification of Mesenchymal Stem Cells in Teeth: from Odontogenic to Non-odontogenic [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(1): 39-45

[4] 王小黎, 徐丽, 张容秀, 等. Vitapex 对年轻恒牙牙髓血运重建术疗效的影响 [J]. *中华全科医学*, 2020, 18(5): 727-729, 756

[5] 何浩, 徐梦婷, 肖强, 等. 富血小板纤维蛋白联合人工骨粉在口腔种植引导性骨再生中的临床应用价值 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(10): 1920-1923

[6] Mohan SP, Jaishangar N, Devy S, et al. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Periodontal Regeneration: A Review [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2019, 11(Suppl 2): S126-S130

[7] Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 5169

[8] Liu SL, Zhou YM, Tang DB, et al. LGR6 promotes osteogenesis by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(1): 1-7

[9] Blinstein B, Bojarskas S. Efficacy of autologous platelet rich fibrin in bone augmentation and bone regeneration at extraction socket [J]. *Stomatologija*, 2018, 20(4): 111-118

[10] Cortellini S, Casteo AB, Temmerman A, et al. Leucocyte-and platelet-rich fibrin block for bone augmentation procedure: a proof-of-concept study [J]. *J Indian Prosthodont Soc*, 2018, 45(5): 624-634

[11] 罗艺, 王恩群, 许雅婷, 等. 改良型富血小板纤维蛋白修复下颌智齿拔除后邻牙远中骨缺损 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(15): 2314-2319

[12] Kumar RV, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration [J]. *Cell Tissue Bank*, 2013, 14(3): 453-463

[13] Liu R, Yan M, Chen S, et al. Effectiveness of Platelet-Rich Fibrin as an Adjunctive Material to Bone Graft in Maxillary Sinus Augmentation: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trails [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 17(3): 7267062

[14] Ortega-Mejia H, Estrugo-Devesa A, Saka-Herrón C, et al. Platelet-Rich Plasma in Maxillary Sinus Augmentation: Systematic Review [J]. *Materials (Basel)*, 2020, 13(3): 622

[15] Zheng S, Zhang X, Zhao Q, et al. Liquid platelet-rich fibrin promotes the regenerative potential of human periodontal ligament cells [J]. *Oral Dis*, 2020, 26(8): 1755-1763

[16] Mijiritsky E, Assaf HD, Peleg O, et al. Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review [J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(4): 317

[17] 李影, 刘娜, 张维, 等. Wnt 经典通路 β -catenin 过表达对人牙周膜干细胞增殖能力及成骨能力的影响 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2017, 15(4): 198-203

[18] 陈静涛, 王燕, 周志斐, 等. 力生长因子对周期性牵张力诱导的人牙周膜细胞成骨分化及 MMP-1、MMP-2 表达的影响 [J]. *上海口腔医学*, 2019, 28(1): 6-12

[19] 王素文, 赖思煜, 刁利军, 等. 黄芪甲苷调节人牙周膜细胞炎症反应及成骨分化的作用及机制研究 [J]. *口腔医学研究*, 2020, 36(2): 121-125

- cancer[J]. *Am J Surg*, 2020, 220(4): 938-944
- [18] X Li, Du G, Liu W, et al. Music intervention improves the physical and mental status for patients with breast cancer: A protocol of randomized controlled trial[J]. *Medicine*, 2020, 99(49): e23461
- [19] Xc A, Cz B, Peng C A, et al. Effect of pectoral nerve block type II under general anesthesia on the immune function of patients with breast cancer[J]. *Am J Surg*, 2020, 220(4): 938-944
- [20] Aghamelu O, Buggy P, Smith G, et al. Serum NETosis expression and recurrence risk after regional or volatile anaesthesia during breast cancer surgery: A pilot, prospective, randomised single-blind clinical trial[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2020, 65(3): 313-319
- [21] 移小峰, 巫绍汝, 彭艳. 右美托咪定对老年胃癌根治术患者围术期血流动力学及术后镇静镇痛的影响 [J]. *中华老年医学杂志*, 2021, 40(05): 637-640
- [22] 李永优. 右美托咪定复合瑞芬太尼静脉麻醉对乳腺癌根治术患者血流动力学及麻醉质量的影响 [J]. *中国药物与临床*, 2020, 20(5): 767-770
- [24] Khedri M, Samei A, Fasihi-Ramandi M, et al. The immunopathobiology of T cells in stress condition: a review[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2020, 25(5): 743-752
- [25] Tao J, Han D, Gao S, et al. CD8⁺T cells exhaustion induced by myeloid-derived suppressor cells in myelodysplastic syndromes patients might be through TIM3/Gal-9 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(1): 1046-1058
- [26] Frank AM, Braun AH, Scheib L, et al. Combining T-cell-specific activation and in vivo gene delivery through CD3-targeted lentiviral vectors[J]. *Blood Adv*, 2020, 4(22): 5702-5715
- [27] Rana J D, Marati R V, Harrison C A, et al. Total CD3 T Cells Are Necessary and Sufficient to Induce Colitis in Immunodeficient Mice With Dendritic Cell-Specific Deletion of TGF β R2: A Novel IBD Model to Study CD4 and CD8 T-Cell Interaction [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, 26(2): 229-241
- [28] Brightman SE, Naradikian MS, Miller AM, et al. Harnessing neoantigen specific CD4 T cells for cancer immunotherapy[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(4): 625-633
- [29] Wolf D, Gerhardt T, Winkels H, et al. Pathogenic Autoimmunity in Atherosclerosis Evolves From Initially Protective Apolipoprotein B100-Reactive CD4⁺T-Regulatory Cells [J]. *Circulation*, 2020, 142(13): 1279-1293
- [30] Raskov H, Orhan A, Christensen JP, et al. Cytotoxic CD8⁺T cells in cancer and cancer immunotherapy [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(2): 359-367
- [31] 解静. 盐酸右美托咪定对新生儿围术期应激反应和免疫功能的影响[D]. 河北: 河北医科大学, 2016

(上接第 1185 页)

- [20] Ji H, Cui X, Yang Y, et al. CircRNA hsa_circ_0006215 promotes osteogenic differentiation of BMSCs and enhances osteogenesis-angiogenesis coupling by competitively binding to miR-942-5p and regulating RUNX2 and VEGF [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7): 10275-10288
- [21] 陈伟健, 晋大祥, 谢炜星. 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
- [22] 孙涛, 和红兵. 富血小板纤维蛋白在牙周组织再生中的研究进展[J]. *口腔医学研究*, 2020, 36(9): 808-810
- [23] You JS, Kim SG, Oh JS, et al. Effects of Platelet-Derived Material (Platelet-Rich Fibrin) on Bone Regeneration [J]. *Implant Dent*, 2019, 28(3): 244-255
- [24] 赵斌, 张云鹏, 徐欣. 炎症微环境下芦丁对牙周膜干细胞成骨分化能力的影响[J]. *上海口腔医学*, 2019, 28(4): 356-361
- [25] 许晶晶, 罗子源, 雷蕾. 富血小板纤维蛋白提取液对经 TNF- α 刺激下人牙周膜细胞的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2017, 33(2): 223-228
- [26] 杨詠嘉, 黄元瑾, 陈宇雄. LPS 介导的 NF- κ B 信号通路在人牙周膜细胞促炎因子表达调控中的作用及机制研究 [J]. *广东医学*, 2018, 39(14): 2096-2101
- [27] 黄奕智, 郭俊, 杨健. 富血小板纤维蛋白对牙周膜成纤维细胞成骨能力影响的实验研究[J]. *口腔医学研究*, 2020, 36(1): 41-45
- [28] Sha YL, Liu S, Yan WW, et al. Wnt/ β -catenin signaling as a useful therapeutic target in hepatoblastoma [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(9): BSR20192466
- [29] Ardeshiryajimi A, Golchin A, Khojasteh A, et al. Increased osteogenic differentiation potential of MSCs cultured on nanofibrous structure through activation of Wnt/ β -catenin signalling by inorganic polyphosphate [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup3): S943-S949
- [30] 毛杰, 周翊飞, 吴晓玲, 等. 雌激素介导下 Wnt/ β -catenin 信号通路调控人牙周膜干细胞的成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(13): 2087-2092