

自体骨髓间充质干细胞复合富血小板纤维蛋白促进新骨形成的研究

周春梅 李淑慧 温齐古丽·乃库力 于 莉 袁 萍 尼加提·吐尔逊

摘 要 **目的** 研究自体骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)复合富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)对兔拔牙窝缺损新骨形成的促进作用。**方法** 将 2 月龄雄性新西兰兔 27 只,随机分 3 组,每组 9 只,建立动物模型,均在全身麻醉下微创拔除下颌左侧中切牙。A、B 和 C 组分别为 BMSCs 复合 PRF、单一 PRF 和空白对照。每组 3 只于 3 个时间点,即第 4、8、12 周,在骨缺损部位取材,拍摄 X 线片观察骨缺损区骨质的愈合及改建情况。同时制作 HE 染色的组织切片,进行骨计量观察。**结果** 观察和使用灰度值统计软件进行分析的结果表明,在 4、8、12 周 A 组缺损区骨密度明显高于 B、C 组($P < 0.01$)。A 组与 B、C 组的骨计量学比较分析显示骨小梁宽度、缺损区骨量、成骨细胞数差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 自体 BMSCs 复合 PRF 应用于兔牙槽骨缺损区能有效促进新骨形成。

关键词 骨髓间充质干细胞 富血小板纤维蛋白 新骨形成 X 线 骨计量学

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.023

Research of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Combined with Platelet Rich Fibrin Promoting New Bone Formation. Zhou Chunmei, Li Shuhui, Wenqiguli·Naikuli, et al. Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830000, China

Abstract **Objective** To study bone marrow stem cells (BMSCs) composited with platelet-rich fibrin (PRF) promote new bone formed on the defect of rabbit extraction sockets. **Methods** The 2-month-old male New Zealand rabbits with the number of twenty-seven were randomly divided among three groups, each nine, to establish the animal model. All were minimally invasive removal of mandibular incisor to the left under general anesthesia. The group A and B was implanted with BMSCs-PRF composite and single PRF respectively, and C was control. We removed a section of the bone defects from three rabbits of each group in four, eight and twelve weeks after operation respectively, and observed the bone healing and rebuilding using X-ray. Tissue sections stained with HE were prepared for histomorphometric observation. **Results** The results of observation and the use of statistical software gray value analysis showed that the bone density in defects of A group was significantly higher than that of B and C ($P < 0.01$). By histomorphometric comparison, it indicated that trabecular width and bone defects as well as the number of osteoblast cells had significant differences between A groups and another two groups after the fourth, eighth, twelfth week ($P < 0.01$). **Conclusion** Autologous BMSCs composites PRF applied to rabbit alveolar bone defects can effectively promote new bone formation.

Key words Bone marrow stem cells; Platelet-rich fibrin; new bone formation; X-ray; Bone histomorphometry

牙周病、外伤、龋病等各种原因导致的牙齿的缺失,不仅影响患者的咀嚼和发音功能,还会导致面容的改变,甚至改变牙槽骨的高度、宽度及密度,以致于影响活动和种植义齿修复的效果^[1,2]。牙槽骨缺损的成功修复与以下 4 个因素紧密相关:①血供充足;②活性极强成骨前体细胞;③具有骨诱导性的生长因

子;④具有骨传导性的细胞外基质。临床上常采用牙槽嵴水平骨扩增、垂直骨扩增、引导骨组织再生术以及上颌窦提升术等外科治疗的方法增加骨量,重建牙槽嵴形态。但这些常规治疗方法均不能满足以上 4 个要素,从而限制了临床上的广泛使用^[3]。骨组织工程技术是利用种子细胞、支架材料和细胞因子机制产生新骨的一项新技术。骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)为目的细胞取材容易并且具有低免疫原性,可以连续传代,扩增超过 10 亿倍时仍具有很强的成骨潜能^[4,5]。富血小板纤维蛋白(platelet-rich fibrin, PRF)能够刺激成骨细胞的增殖

基金项目:新疆维吾尔自治区青年科学基金资助项目(2013211B53)

作者单位:830063 乌鲁木齐,新疆医科大学第二附属医院口腔科

通讯作者:尼加提·吐尔逊,硕士生导师,电子信箱:kqnijate@

126.com;李淑慧,电子信箱:lshgongzuozy@Sina.com

和分化。血小板还分泌纤维蛋白原,增强间充质细胞的迁移的组织再生^[6]。PRF 的制备简单,无添加任何化学试剂,只需抽取动物自体外周血离心即可得到。

笔者利用 X 线观察和灰度值测量并结合组织学分析研究 BMSCs 复合 PRF 对兔拔牙窝骨缺损新骨形成的促进作用,以为后期骨缺损的修复提供最佳治疗方案。

材料与方法

1. 实验材料:(1)动物:健康雄性新西兰兔(2月龄,2.5~3.5kg,27只),购自新疆医科大学动物实验中心。(2)仪器:HQY-G 型固定式牙科 X 线机(芬兰海青公司);Digora Optime 牙片数字成像系统(芬兰 Soredex 公司);倒置相差显微镜(美国 Thermo 公司);细胞培养孵箱(美国 Thermo 公司);CO₂ 孵箱(美国 Thermo 公司);超净工作台(中国博讯公司);低速离心机(合肥中佳公司)。(3)药品:DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司);青链霉素(美国 Hyclone 公司);美国胎牛血清(Hyclone 公司);胰酶细胞消化液(美国 Hyclone 公司);3%戊巴比妥。

2. 实验分组:将 2 月龄健康雄性新西兰兔 27 只,随机分 3 组,每组 9 只。A 和 B 组分别植入 BMSCs 复合 PRF 和单一 PRF, C 组为空白对照。

3. 实验过程:(1)BMSCs 的体外培养:手术者持 16 号骨髓穿刺针与股骨轴线垂直刺入骨髓腔,抽取 5ml 骨髓,细胞密度梯度离心法在超净工作台内分离收集细胞。在 37℃、50ml/L CO₂ 饱和湿度的孵育条件下,采用 DMEM 液(含 100ml/L 胎牛血清、100U/L 青霉素、100mg/L 链霉素)培养细胞。首次换液 48h 后,每间隔 2~3 天换液 1 次。显微镜下示细胞生长融合达 90% 以上后,用 0.25% 胰酶消化细胞 2min 后离心 5min(1200r/min)。按照常规比例 1:2 传代、扩增;取第 3 代细胞用于实验。(2)PRF 的制备:从新西兰大白兔耳缘抽取 10ml 动脉血,置于无菌采血管中,以 3000r/min 离心 15min 后,管内出现分层。由下至上依次为红细胞层、白色凝胶状 PRF 层、血清层。实验采用中间 PRF 层。(3)BMSCs 与 PRF 的复合及培养:无菌条件下将 PRF 置于 4mm×6mm 的 24 孔板内,用 DMEM 预湿后,紫外线消毒 45min。调整细胞浓度至 6×10^7 /ml,每块接种 20 μ l。每块 PRF 上约有 1.2×10^6 个细胞。在 37℃、50ml/L CO₂ 饱和湿度条件下加培养液 2ml 孵育,间隔 1 天换液,在倒置相差显微镜下每日观察,培养至第 3 天时植入

术区。(4)动物模型制备:动物称重后,按 1ml/kg 剂量采用 3% 戊巴比妥钠注射液通过耳缘静脉麻醉,麻醉起效后,离断牙周韧带后拔牙钳微创拔除下颌左侧中切牙,测量牙槽骨宽度和高度后,A 组拔牙窝内植入 BMSCs 与 PRF 的复合物,B 组拔牙窝内植入单一 PRF, C 组空白对照,3 组均严密缝合创口。按照各时间段取下颌骨缺损的标本后,将组织立即置于 8% 的甲酸溶液脱钙 1 周,梯度乙醇脱水、浸蜡、石蜡包埋,制作厚度为 4 μ m 的组织切片,HE 染色。

4. X 线数据采集:术后第 4、8、12 周处理各组动物并获取标本,利用 HQY-G 型固定式牙科 X 线机分别拍摄。球管置于标本上方约 1cm,将影像板放置于标本下。均在 63kV、8mA、0.2s 条件下,采用平行照射法拍摄 X 线片。每个位点采 3 张片,观察骨缺损区骨质愈合和成骨情况。获得的胶片经扫描转化为数字图像后利用 Adobe Photoshop CS5 软件测量 X 线片上拔牙窝处图像灰度值(mean grey values, MGVS),完全透射区为 0,完全阻射区为 255。

5. 骨计量学观察:在 100 倍光镜下,选择 HE 染色组织切片中骨缺损骨松质区进行骨组织形态计量学分析,并确定缺损区材料植入点。距离材料植入区 100 μ m 的范围内取 6 个视野,放大 200 倍,使用计算机彩色病理图像采集系统采集图像,给出骨计量学参数:骨小梁平均宽度、骨小梁面积比、成骨细胞个数(osteoblastic number, OB. N/每个视野)和破骨细胞个数(osteoclastic Number, OC. N/每个视野)骨量的多少通过测量骨小梁平均宽度(trabecular width, Tb. Wi/ μ m)反映。通过视野内骨小梁面积占相应松质骨面积的百分比计算骨小梁面积比(trabeculae area, Tb. Ar/%)说明当时最大形成骨量。

6. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。比较采用 χ^2 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. X 线观察:(1)术后第 4 周,3 组标本的骨缺损区新形成的骨组织均呈低密度影像,与正常毗邻两端骨组织有比较明显的影像界限(图 1)。A 和 B 组标本 X 线片中的骨缺损区内新生骨组织密度差异不大;空白 C 组标本比前两组骨密度影更低。A 组骨缺损区内新生骨与两端正常骨间有骨融合,但界限清楚,更易辨别区分。(2)各组标本术后第 8 周的 X 线片显示骨缺损区内新生骨密度影像继续增高,新生骨

与周围正常骨之间的影像均开始出现部分融合(图2)。A组新生骨密度影像较高,新生骨和正常两端周围骨组织之间影像界限模糊,可以辨认。B、C组的新生骨组织影像密度明显小于A组,新生骨与正常骨

之间逐渐变模糊,但易辨认。(3)植入 BMSCs 复合 PRF 的 A 组术后第 12 周(图 3),骨缺损区新生骨影像为高密度影。新生骨和两端正常骨组织之间大部分已经融合,其界限模糊,难以辨认。

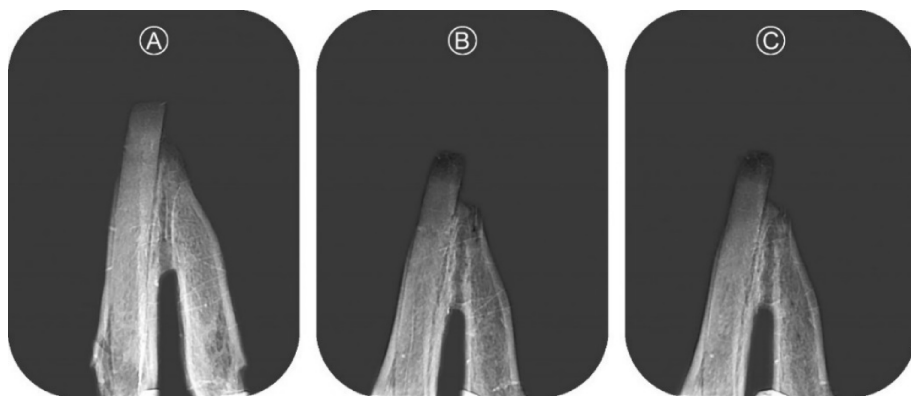


图 1 分别植入 BMSCs 复合 PRF 和单一 PRF 的 A、B 组以及空白对照 C 组第 4 周后的 X 线片
A. 植入 BMSCs 复合 PRF; B. 植入单一 PRF; C. 空白对照

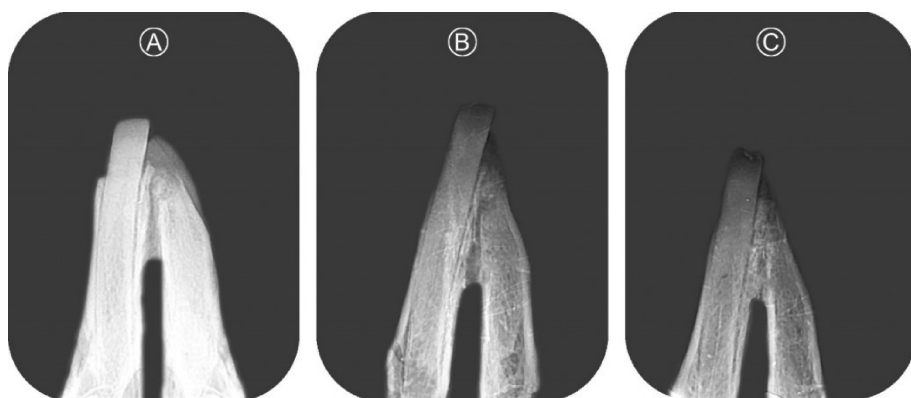


图 2 分别植入 BMSCs 复合 PRF 和单一 PRF 的 A、B 组以及空白对照 C 组第 8 周后的 X 线片
A. 植入 BMSCs 复合 PRF; B. 植入单一 PRF; C. 空白对照

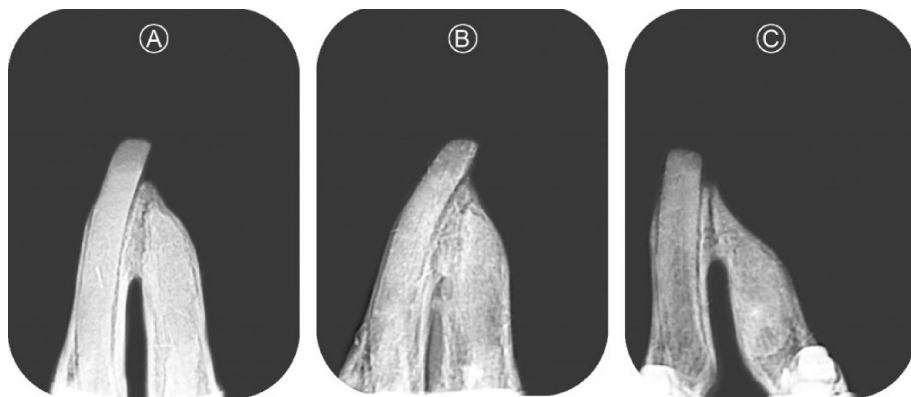


图 3 分别植入 BMSCs 复合 PRF 和单一 PRF 的 A、B 组以及空白对照 C 组第 12 周后的 X 线片
A. 植入 BMSCs 复合 PRF; B. 植入单一 PRF; C. 空白对照

2. HE 染色观察:(1)术后 4 周,A 组成骨细胞较多,骨小梁增厚,呈连续不规则并伴有少量板层状的结构,有新生骨质形成。B 组骨缺损区有少量类骨质和新骨形成,C 组中央为纤维组织,骨小梁较少,罕见成骨细胞。(2)8 周时,骨小梁和新生骨逐渐增加,但

A 组的增加量更大。术后 12 周,A 组缺损区处骨细胞丰富,骨小梁粗大,排列整齐,成熟的板层状骨,B 组较多新生的编织骨及板层骨且逐渐向中央充填骨缺损区,骨小梁连续欠规则,C 组存在大量结构疏松的纤维结缔组织,缺损区有骨样组织少量生成。

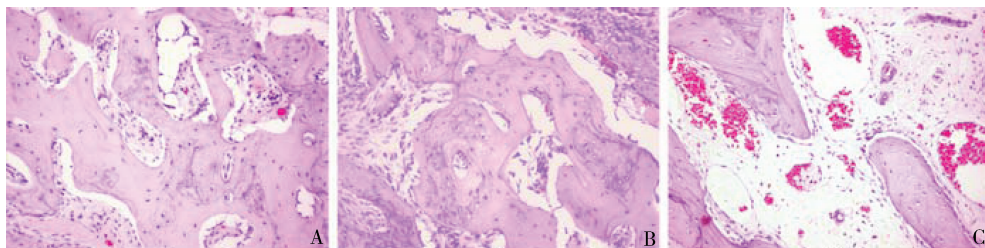


图 4 术后 12 周分别植入 BMSCs 复合 PRF 和单一 PRF 的 A、B 组以及空白对照 C 组的组织切片图(HE, ×20)

A. 植入 BMSCs 复合 PRF; B. 植入单一 PRF; C. 空白对照

3. 骨计量学:对 HE 染色后的组织切片,通过计算机彩色病理图像采集系统,经计算得出骨计量学参

数的变化趋势,如图 5 所示。

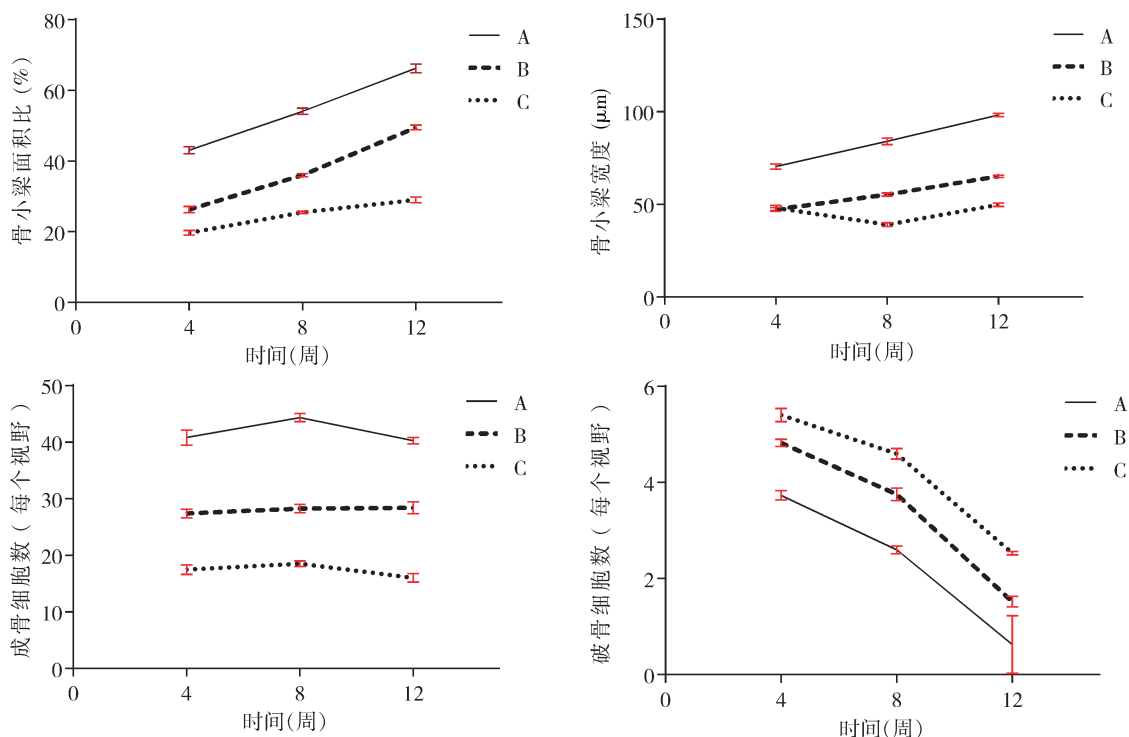


图 5 骨小梁平均宽度、骨小梁面积比、成骨细胞个数和破骨细胞个数的变化

A. 植入 BMSCs 复合 PRF; B. 植入单一 PRF; C. 空白对照

讨 论

骨组织工程技术是一项复合种子细胞与支架材料产生新骨的新技术。本实验选用 BMSCs 为目的细胞,其在骨髓中的含量占有核细胞的 0.001% ~ 0.01%,连续传代体外培养多达 30 次,仍然有活

性^[4,7]。在动物实验中证实采用成骨的特异性诱导因子能使包含有定向和非定向前体干细胞的 BMSCs 的大多数细胞诱导成具有成骨功能的细胞^[8]。骨髓间质干细胞与富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 复合用于治疗软骨发育不全症和先天性胫骨假

关节患者的股骨和胫骨牵张成骨术,结果显示牵张成骨的效果和速度明显^[9]。PRF 被称为第 2 代的小血小板浓缩物,与 PRP 不同,它包含富血小板纤维蛋白基质和白细胞,是一种新型自体来源的生物材料^[6, 10]。利用自体 BMSCs 复合 PRF 进行兔牙槽骨缺损修复,较单独使用 PRF 更利于新骨形成。PRF 呈立体、疏松凝胶网状,具有密布的较大孔隙,利于营养成分和细胞的进入,其所包含的各类生长因子利于诱导干细胞的增殖分化、运动、凋亡和促进骨愈合及改建^[3]。研究表明两者复合可以显著增强定向分化能力,促进成骨指标的表达,改善成骨效果^[11]。在 Moutsatsos 等^[12]研究中,动物体内单纯植入 BMSCs 仅能形成纤维结缔组织。

实验结果证实 A 组植入 BMSCs 与 PRF 复合物,缺损区新生骨组织和正常两端骨组织之间融合好,其界限模糊,12 周后难以辨认。详见图 6。

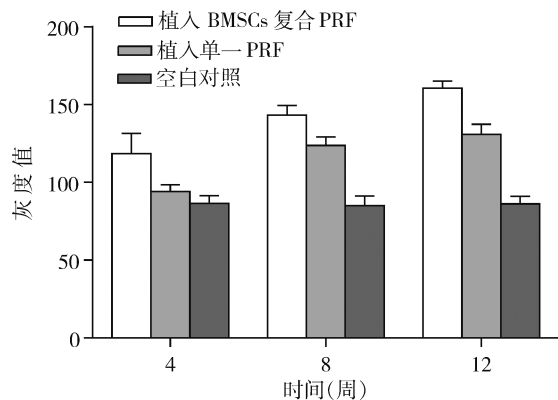


图 6 不同时间点各组骨缺损区新骨形成的灰度值比较

图 6 表明在植入材料术后的第 4、8、12 周, A 组骨缺损区骨密度明显高于 B、C 组 ($P < 0.01$); B 和 C 组骨缺损区骨密度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。骨计量学分析结果显示, A 组中各项指标除破骨细胞数外均明显高于 B、C 组 ($P < 0.01$), 表明 BMSCs 和 PRF 两者复合在兔下颌骨缺损修复中促进骨量增加, 提高骨质的质量。通过自体 BMSCs 复合 PRF 移植到骨缺损区后可产生互补作用, 与单纯植入 PRF 相比, 两者联合应用对骨质量和速度均有明显促进作用。12 周后, B、C 组也有新骨形成, 但 A 组情况最佳。B 组有可能是缺乏 BMSCs 转化为成骨细胞的

能力, 因此未能有效促进骨缺损区新骨的形成和改建的作用。自体 BMSCs 复合 PRF 对兔拔牙窝骨缺损的新骨形成有显著的促进作用。应用骨组织工程方法, 有可能使颌面部骨缺损得到修复, 提高患者的生存质量, 具有广阔的应用前景。

参考文献

- Ehrenfest DMD, Del Corso M, Diss A, *et al.* Three - dimensional architecture and cell composition of a choukroun's platelet - rich fibrin clot and membrane[J]. J Periodontol, 2010, 81(4): 546 - 555
- Chang IC, Tsai CH, Chang YC. Platelet - rich fibrin modulates the expression of extracellular signal - regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts[J]. J Biomed Mater Res Part A, 2010, 95A(1): 327 - 332
- 李强. 富血小板纤维蛋白对兔下颌骨缺损的修复作用[D]. 泸州医学院, 2012
- Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy[J]. Human Gene Therapy, 2011, 22(1): 3 - 17
- 唐雪鹏. 骨髓基质干细胞与牙周膜干细胞膜片在牙周组织再生的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2012
- Honda H, Tamai N, Naka N, *et al.* Bone tissue engineering with bone marrow - derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model[J]. J Artificial Organs, 2013, 16(3): 305 - 315
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy[J]. J Cell Biochem, 1994, 56(3): 283 - 294
- 尹科. 富血小板血浆对骨髓间充质干细胞体外成骨的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2008
- Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, *et al.* Transplantation of marrow - derived mesenchymal stem cells and platelet - rich plasma during distraction osteogenesis - a preliminary result of three cases[J]. Bone, 2004, 35(4): 892 - 898
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, *et al.* Platelet - rich fibrin (PRF): a second - generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates[J]. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, 2006, 101(3): e51 - e55
- 张文丽, 李淑慧, 陈诚, 等. PRF 复合自体骨髓间充质干细胞修复兔牙槽骨缺损的研究[J]. 口腔医学研究, 2015, 4: 336 - 339
- Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou SH, *et al.* Exogenously regulated stem cell - mediated gene therapy for bone regeneration[J]. Mol The, 2001, 3(4): 449 - 461

(收稿日期: 2015 - 07 - 21)

(修回日期: 2015 - 08 - 17)