

牙周膜干细胞 BMP-2-PSH 复合膜修复新西兰兔牙槽骨缺损

周 静¹⁾, 熊 萍²⁾, 刘超峰²⁾, 陈丽琼²⁾, 张永辉²⁾, 史 珂²⁾, 聂 焱²⁾, 刘 彦²⁾

(1)昆明医科大学附属延安医院口腔科, 云南 昆明 650100; 2)昆明医科大学
附属口腔医院第二门诊部, 云南 昆明 650100)

[摘要] **目的** 拟构建新西兰兔牙周缺损模型, 确定 hPDLSCs-BMP-2-PSH 膜的生物安全性和其体内成骨修复作用。**方法** 在确定 BMP-2-PSH 膜没有细胞毒性后将培养好的 hPDLSCs 细胞膜片复合至 BMP-2-PSH 膜上。分别在每只新西兰兔下颌左中切牙牙槽骨缺损内植入 hPDLSCs/PSH 复合膜作为实验组, 右中切牙牙槽骨缺损内植入对照性多孔纤维膜材料作为对照组(或不植入任何材料作为对照), 然后全瓣复位, 缝合。术后即刻和每 3 周(连续观察 12 周)进行影像学(CT)检查, 观察骨缺损愈合情况; 同时, 分别在术后第 4、8、12 周观察 PDLSCs/BMP-2 双膜材料的吸收度和各组样本新骨形成量和新骨形态。**结果** 不同浓度 PSH 膜和 BMP-2-PSH 膜浸提液对 hPDLSCs 细胞不具有细胞毒性, hPDLSCs 细胞能够成功复合到 BMP-2-PSH 膜上; CBCT 及组织形态学分析显示, hPDLSCs/PSH 复合膜能够有效促进牙槽骨缺损修复再生。**结论** hPDLSCs/PSH 复合膜具有良好生物安全性, 有利于修复新西兰兔牙周缺损。

[关键词] 牙周膜干细胞; BMP-2-PSH 复合膜; 牙周再生

[中图分类号] R781.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2021)05-0012-06

Periodontal Ligament Stem Cell BMP-2-PSH Composite Membrane in Repairing Alveolar Bone Defect in New Zealand Rabbits

ZHOU Jing¹⁾, XIONG Ping²⁾, LIU Chao-feng²⁾, CHEN Li-qiong²⁾, ZHANG Yong-hui²⁾,
SHI Ke²⁾, NIE Yan²⁾, LIU Yan²⁾

(1) Dept. of Stomatology, Yan'an Hospital Affiliated of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650100; 2) The 2nd clinic, The Affiliated Stomatology Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650100, China)

[Abstract] **Objective** It is planned to build a New Zealand rabbit periodontal defect model and determine the biological safety of hPDLSCs-BMP-2-PSH membrane and its in vivo osteogenic repair effect. **Methods** After confirming that the BMP-2-PSH membrane was not cytotoxic, the cultured hPDLSCs cell membrane was compounded to the BMP-2-PSH membrane. Respectively, hPDLSCs/PSH composite membrane was implanted into the alveolar bone defect of mandibular left incisor in each New Zealand rabbit as the experimental group, and the controlled porous fiber membrane material was implanted into alveolar bone defect of the right central incisor as the control group (or not implanted any material was used as a control), then the whole flap was reset and sutured. Imaging (CT) examination was performed immediately after the surgery and every 3 weeks (observed continuously for 12 weeks) to observe the healing of bone defects; meanwhile, the absorbance of PDLSCs/BMP-2 double membrane materials, the amount of new bone formation and new bone morphology of samples in each group were

[收稿日期] 2021-01-29

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 [2018FE001-(274)]

[作者简介] 周静(1983~), 女, 云南昆明人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事口腔牙周正畸临床研究工作。

[通信作者] 刘彦, E-mail: lydyc@aliyun.com

observed at 4, 8 and 12 weeks after the surgery. **Results** Different concentrations of PSH membrane and BMP-2-PSH membrane extracts were not cytotoxic to hPDLSCs cells, hPDLSCs cells could be successfully compounded to BMP-2-PSH membranes; The analysis of CBCT and histomorphology showed that hPDLSCs/PSH composite membranes can effectively promote the repair and regeneration of alveolar bone defects. **Conclusion** The hPDLSCs/PSH composite membrane has the good biological safety and is beneficial to repair periodontal defects of New Zealand rabbits.

[**Key words**] Periodontal ligament stem cells; BMP-2-PSH composite membrane; Periodontal regeneration

牙周病是常见的一类口腔疾病, 有较高发病率, 严重危害广大民众的口腔和系统健康, 是导致成年人牙齿缺失的主要原因之一^[1], 其最主要的病理变化就是牙周组织的吸收破坏^[2]。

近年来随着支架材料和种子细胞研究的深入, 具有成骨能力或骨诱导(Osteoinduction)能力的组织工程骨(含有具有成骨能力细胞的骨替代物)的研究也取得了一些进展, 是一种很有前景的骨缺损修复策略。因此, 在牙周组织工程构建和实施过程中, 种子细胞和生物支架材料以及生长因子的选择至关重要。迄今为止, 牙周膜干细胞(PDLSCs)依然是牙周组织工程最常用的种子细胞^[3-5]。以往的研究显示, PDLSCs可以分化成为牙骨质细胞、成骨细胞, 进而修复牙槽骨缺损, 促进牙周组织再生^[6-7]。此外, 作为细胞膜片支撑的生物材料的选择对于牙周缺损修复也至关重要。理想的修复材料应该具备良好的生物相容性和骨引导性等。单纯的羟基磷灰石作为人工骨替代材料脆性大、韧性差、强度低, 只能勉强应用于非承力部位, 本课题组拟, 构建一种新的hPDLSCs/PSH复合膜(人牙周膜干细胞/PVA-SiO₂-HA), 探讨其诱导牙周成骨的可能性和相关作用机制, 为牙周组织工程的探索和应用提供新的思路和技术基础, 为牙周病的临床管理和治疗提供新的理论依据和治疗方向。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年新西兰兔 15 只, 体质量 2.5 kg, 实验前由昆明医科大学动物实验中心饲养。hPDLSCs/PSH 复合膜, 3% 戊巴比妥钠, BMP-2、HE 染色剂, hPDLSCs, 75% 酒精, 棉球, 纱球, 持针器, 镊子, 剪刀, 超声骨刀等。

1.2 PSH 膜细胞毒性检测

购买 hPDLSCs 细胞, 并制备含 BMP-2 的 PSH 生物膜。将不同质量 PSH 膜或 BMP-2-PSH 膜用

双蒸水浸泡 24 h, 制备不同浓度 BMP-2-PSH 膜浸提液。在 hPDLSCs 培养液中分别添加不同浓度 PSH 膜、BMP-2-PSH 膜浸提液, 培养 24 h 后 CCK-8 检测各组细胞增殖活力来验证此膜是否具有细胞毒性。按照细胞增值率判断该 PSH 膜的细胞毒性^[8]: 大于 100% 时, 细胞毒性为 0 级; 99% ≤ 细胞增殖率 ≤ 75% 时, 细胞毒性为 1 级; 74% ≤ 细胞增殖率 ≤ 50% 时, 细胞毒性为 2 级; 49% ≤ 细胞增殖率 ≤ 25% 时, 细胞毒性为 3 级; 24% ≤ 细胞增殖率 ≤ 1% 时, 细胞毒性为 4 级; 细胞增殖率 ≤ 0% 时, 细胞毒性为 5 级。0 级和 1 级被认为没有细胞毒性, 2 级为轻度细胞毒性, 3 级和 4 级为中度细胞毒性, 5 级为明显的细胞毒性。在确定 PSH 膜及 BMP-2-PSH 膜均没有细胞毒性后将培养好的 hPDLSCs 细胞膜片复合至 BMP-2-PSH 膜上, 通过扫描电镜观察 hPDLSCs 是否能够成功复合至 BMP-2-PSH 膜上。

1.3 实验动物分组及动物模型的建立

全麻下在兔下颌中切牙的膜龈联合处翻瓣, 暴露牙槽骨骨壁, 在 2 个中切牙的远中牙槽骨上使用高速外科手术囊并辅以大量无菌生理盐水冲洗制备 10 mm × 5 mm × 4 mm 的 U 型牙槽骨缺损, 刮净周围的牙周膜和牙根表面的牙骨质; 每只兔左下中切牙牙槽骨缺损内植入 hPDLSCs/PSH 复合膜作为实验组, 右中切牙牙槽骨缺损内植入对照性多孔纤维膜材料作为对照组。全瓣复位, 缝合。术后密切观察新西兰兔一般状态并每天肌肉注射氨苄青霉素 1 g 预防感染, 连续 3 d。主要过程见图 1。

1.4 牙周再生形态学分析

1.4.1 影像学(CT)检查 术后即刻和每 3 周(连续观察 12 周)进行 CT 检查, 观察骨缺损愈合情况。

1.4.2 组织病理学染色, 观察新骨形成量和新骨形态 分别在术后第 4、8、12 周末麻醉处死 2 只新西兰兔, 取材(缺损/修复部位), 40 g/L 多聚甲醛固定之后弃去固定液, 流水冲洗 2 小时后, 阶梯脱水 1 周, 包埋固定 1d, 切片, 厚度 60 μm, HE 染色, 显微镜下观察各组样本新骨形成量和新骨形态。

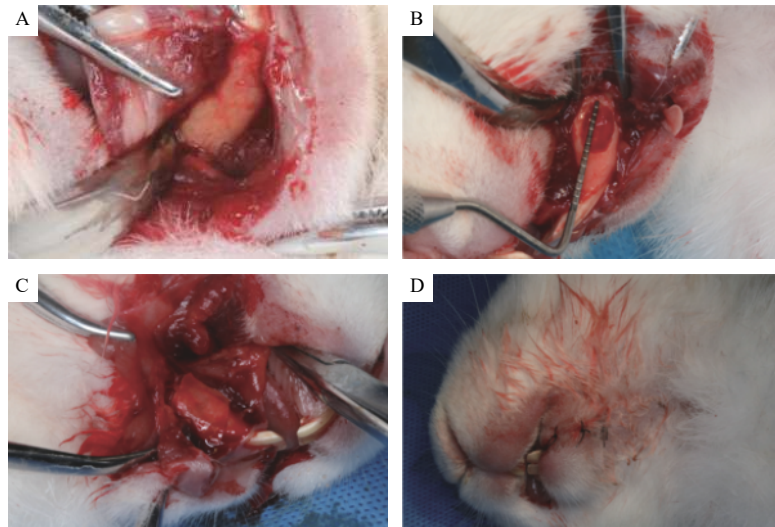


图 1 牙槽骨缺损的形成和 PDLSCs/PSH 复合膜的移植示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the formation of alveolar bone defect and the transplantation of PDLSCs/PSH composite membrane alveolar bone defect

A: 暴露的兔牙槽骨; B: 使用高速外科手术囊制备的骨缺损 (10 mm × 5 mm × 4 mm); C: 在牙槽骨缺损内移植 PDLSCs/PSH 复合膜材料; D: 缝合缺损外皮瓣。

2 结果

2.1 成功合成 PVA-SiO₂-HA 纤维膜

由图 2 可见, PSH 纤维膜纤维表面光滑, 但直径粗细不均匀而且有粘连现象, 这是因为在羟

基磷灰石的表面有许多的羟基基团与聚乙烯醇中羟基形成氢键, 随着羟基磷灰石含量的提高氢键的作用力增强导致纤维间交联性增强, 从而使纺丝液黏度增大, 不易拉伸造成纤维粘连在一起, 获得的薄膜形貌完整且不破损, 有望应用于过滤、吸附和缓释等领域。

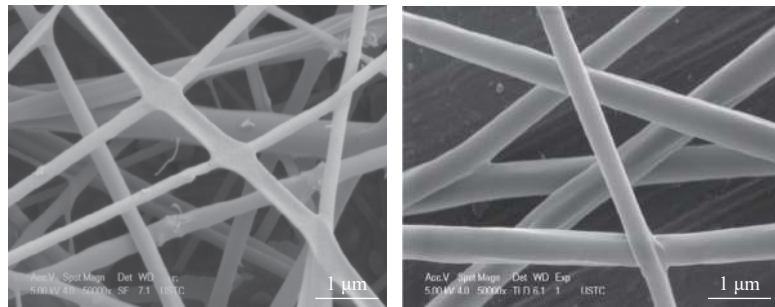


图 2 PSH 纤维膜电镜形貌 (×50000)

Fig. 2 Electron microscopic morphology of PSH fiber membrane (×50000)

2.2 BMP-2-PSH 膜不具有细胞毒性, 并能成功复合 hPDLCs 细胞

PSH 膜细胞毒性检测结果表明, 不同浓度 PSH 膜和 BMP-2-PSH 膜浸提液对 hPDLCs 细胞不具有细胞毒性 (图 3), 扫描电镜结果显示, hPDLCs 细胞能够成功复合到 BMP-2-PSH 膜上 (图 4)。

2.3 hPDLCs/PSH 复合膜能够有效促进新西兰兔牙周成骨

2.3.1 形态学检查 大体标本观察结果显示, 在 3 周末实验组牙槽骨缺损已经明显有新生组织生成, 而对照组几乎还未开始修复 (图 5A); CT 检

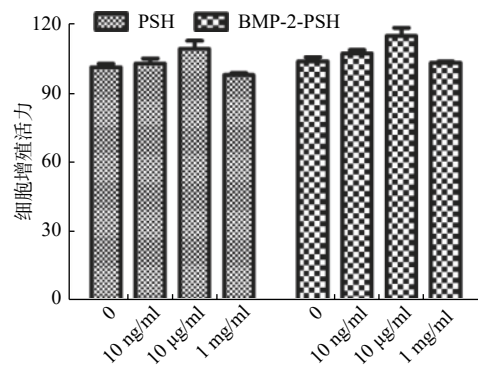


图 3 hPDLCs 细胞增殖活力

Fig. 3 Cell proliferation activity of hPDLCs

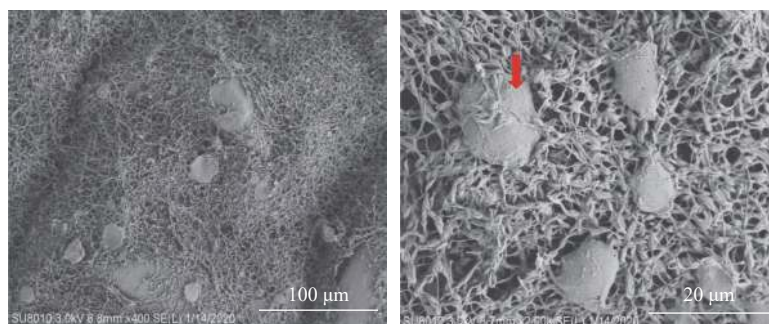


图4 BMP-2-PSH膜及复合在其上的hPDLSCs细胞(红色箭头所示)(×2 000)

Fig. 4 BMP-2-PSH membrane and hPDLSCs cells compounded on it (shown by the red arrow)(×2 000)

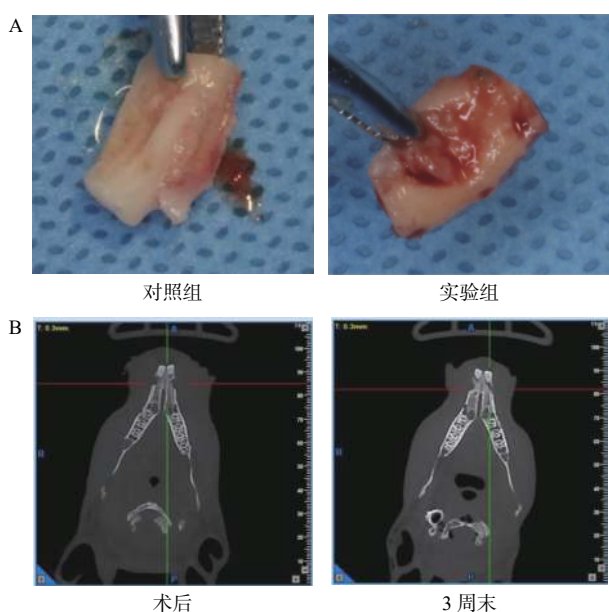


图5 大体标本、CT观察

Fig. 5 Gross specimen, CT observation

查结果显示, hPDLSCs/PSH复合膜能够有效促进牙槽骨缺损修复再生(图5B)。

2.3.2 组织学检查 牙槽骨缺损处及牙周组织进行HE染色,结果显示对照组尚无新生骨小梁形成(图6A);实验组牙槽骨缺损处有新生骨小梁形成(图6B,蓝色箭头所示),此外,在牙周软组织中,对照组较少(图6C),实验组有大量骨胶原产生(黑色箭头所示,图6D),说明hPDLSCs/PSH复合膜能有效促进牙周成骨。

3 讨论

组织工程的一个独特方面是研究细胞与可吸收支架材料以及与组织形成有关的环境因素(包括力学负载)的相互作用;细胞对这些相互作用的反应包括细胞增殖和基质的生物合成。作为细胞膜片支撑的生物材料的选择对于牙周缺损修复也

至关重要。理想的修复材料应该具备良好的生物相容性和骨引导性等。单纯的羟基磷灰石作为人工骨替代材料脆性大、韧性差、强度低,只能勉强应用于非承力部位;二氧化硅具有大的吸附性和高的比表面积,是公认的性能优异的抗菌材料;聚乙烯醇是一种人工合成的水溶性高分子,因具有无毒、良好的成型性、生物相容性好、生物可降解性等特性而被广泛用于骨、软骨、人工角膜、药物缓释等生物医学领域。由于静电纺丝技术所制得的纤维材料具有直径小、孔径小、孔隙率高、均一性较好等优点,因此,本研究尝试以聚乙烯醇为载体,用静电纺丝法制备了一种含有羟基磷灰石和二氧化硅的纤维膜(PVA-SiO₂-HA,简称PSH膜),此膜可以模拟天然的细胞外基质的结构和生物功能;具有很好的生物相容性及可降解性,可作为载体进入人体,并容易被吸收。目前尚未见将PSH膜应用在牙周组织缺损再生方面的报道。本实验结果说明不同浓度PSH膜和BMP-2-PSH膜浸提液对hPDLSCs细胞不具有细胞毒性。在3周末,通过肉眼观察,CBCT检查和HE染色均发现hPDLSCs/PSH复合膜移植组牙槽骨缺损已经明显有新生组织生成,而对照组几乎还未开始修复,说明hPDLSCs/PSH复合膜能够有效促进牙槽骨缺损修复再生。目前,临床上牙周病的治疗方法是机械方式和化学药物方式去除菌斑,而使用全身或局部抗菌药物治疗牙周炎出现一定耐药性情况,PSH膜含有二氧化硅成分,具有良好的抗菌性能,或许能够抑制牙周菌斑的形成,营造良好的牙槽骨形成的微环境,在后续的本课题组将进一步研究牙周生物材料诱导牙周成骨的同时具有抗菌性能。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)又称骨形成蛋白,是一组具有类似结构的高度保守功能蛋白,属于TGF-β家族,BMP能刺激DNA的合成和细胞的复制,从而促进间充质细

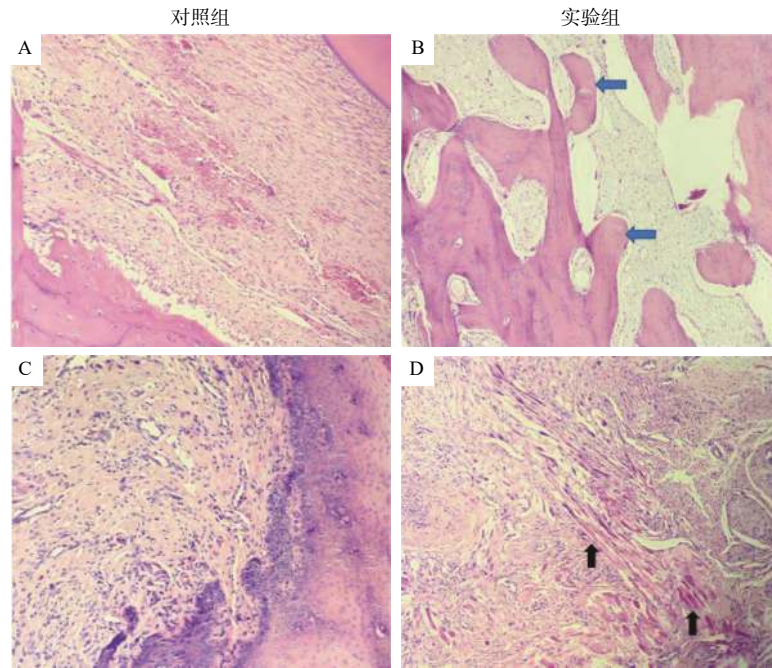


图 6 实验组和对照组家兔牙槽骨缺损处 HE 染色 ($\times 400$)

Fig. 6 HE staining of alveolar bone defect in experimental and control rabbits ($\times 400$)

A: 无新生骨小梁; B 新生骨小梁形成(蓝色箭头示); C: 胶原纤维较少; D 大量胶原纤维(黑色箭头示)。

胞定向分化成为成骨细胞, 是体内诱导骨和软骨形成的主要因子^[9]。研究表明, 体外过表达 PDLSCs 细胞 BMP-2 基因能够增强种植体周围缺损的新骨形成和骨整合^[10], 此外, 有研究尝试将 BMP-2 和另外一种生物活性因子 SDF-1 复合在超分子水凝胶中, 可有效促进牙周骨再生^[11]; 这提示将 BMP-2 作为应用于牙周组织工程生物材料构建中的复合生长因子的可能性。本课题实验组发现牙槽骨缺损处新生骨小梁形成较对照组快, 验证了 BMP-2 有效促进牙槽骨缺损区的新骨形成。

本研究也存在一些局限之处。首先是样本量较少, 其次临床上常见的牙周缺损通常是由于细菌导致的牙周组织炎症伴随牙槽骨缺损, 本实验选用健康牙周组织的新西兰兔是为了保证 hPDLSCs/PSH 复合膜在不受太多局部干扰因素影响情况下发挥骨诱导形成的性能。我们后期实验会选择有牙周炎症的动物建模, 更好地模拟临床。

由于牙槽骨缺损多是由牙周组织的慢性炎症损伤引起的, 因此炎症信号在牙周病的病理过程及修复过程中发挥重要作用。研究表明, 许多炎症相关信号通路, 如 Wnt/ β -catenin 信号和 NF- κ B 信号^[12-13]、p38-MAPK 和 JNK 信号^[14]、Akt/Nrf2 信号^[15]、TGF- β 1/Smad3 信号和 HIF- α 信号等^[16-17] 均参与调控 PDLSCs 成骨分化能力。本实验构建 hPDLSCs 细胞膜片/BMP-2-PSH 膜复合材料, 能够在牙槽骨缺损愈合过程中被机体完全

吸收, 并且能够有效促进新西兰兔牙槽骨缺损修复, 但是, PDLSCs/PSH 复合膜促进体内促进牙周成骨的能力以及相关作用机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Nazir M A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention[J]. Int J Health Sci (Qassim), 2017, 11(2): 72-80.
- [2] Kinane D F, Stathopoulou P G, Papapanou P N. Periodontal diseases[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3(1): 17038.
- [3] Han J, Menicanin D, Gronthos S, et al. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration[J]. Australian Dental Journal, 2013, 59(s1): 117-30.
- [4] Lin N H, Gronthos S, Bartold P M. Stem cells and future periodontal regeneration[J]. Periodontology, 2009, 51(1): 239-251.
- [5] Chen F M, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: Current approaches and expanding opportunities[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2010, 16(2): 219-255.
- [6] Zhao L R, Mao J Q, Zhao B J, et al. Isolation and biological characteristics of exosomes derived from periodontal ligament stem cells[J]. Shanghai Kou Qiang Yi Xue, 2019,

- 28(4): 343-348.
- [7] Liu J, Chen B, Bao J, et al. Macrophage polarization in periodontal ligament stem cells enhanced periodontal regeneration[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 320.
- [8] 黄涛, 陈汉. 纳米羟基磷灰石牙体修复材料的生物性能[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(34): 5045-5050.
- [9] Toth F, Gall JM, Tozser J, et al. Effect of inducible bone morphogenetic protein 2 expression on the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro[J]. *Bone*, 2019, 132(12): 115214.
- [10] Park S Y, Kim K H, Gwak E H, et al. Ex vivo bone morphogenetic protein 2 gene delivery using periodontal ligament stem cells for enhanced re- osseointegration in the regenerative treatment of peri- implantitis[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015, 103(1): 38-47.
- [11] Tan J, Zhang M, Hai Z, et al. Sustained release of two bioactive factors from supramolecular hydrogel promotes periodontal bone regeneration[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(5): 5616-5622.
- [12] Zheng DH, Wang XX, Ma D, et al. Erythropoietin enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Drug design, Development and Therapy*, 2019, 13(6): 2543-2552.
- [13] Liu H, Zheng J, Zheng T, et al. Exendin-4 regulates Wnt and NF- κ B signaling in lipopolysaccharide-induced human periodontal ligament stem cells to promote osteogenic differentiation[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 75(9): 105801.
- [14] Yan W, Cao Y, Yang H, et al. CB1 enhanced the osteo/dentinogenic differentiation ability of periodontal ligament stem cells via p38 MAPK and JNK in an inflammatory environment[J]. *Cell Proliferation*, 2019, 52(6): e12691.
- [15] Jia L, Xiong Y, Zhang W, et al. Metformin promotes osteogenic differentiation and protects against oxidative stress-induced damage in periodontal ligament stem cells via activation of the Akt/Nrf2 signaling pathway[J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 386(2): 111717.
- [16] Liu Z, Guo L, Li R, et al. Transforming growth factor- β 1 and hypoxia inducible factor-1 α synergistically inhibit the osteogenesis of periodontal ligament stem cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 75(8): 105834.
- [17] Xu Q, Liu Z, Guo L, et al. Hypoxia mediates runt-related transcription factor 2 expression via induction of vascular endothelial growth factor in periodontal ligament stem cells[J]. *Molecules and Cells*, 2019, 42(11): 763-772.