

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.17.017

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200630.1159.002.html\(2020-06-30\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200630.1159.002.html(2020-06-30))

BMP9 转染的 hPDLSCs 与 HA-TCP 支架复合体促进 牙槽骨再生的实验研究*

裘吉雨¹, 英司奇¹, 刘 湘¹, 张 燕¹, 叶 国^{2△}

(1. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室/重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆 401147; 2. 重庆医科大学附属口腔医院附三院门诊科, 重庆 401147)

[摘要] **目的** 探索骨形成蛋白 9(BMP9)重组腺病毒(Ad-BMP9)转染的人牙周膜干细胞(hPDLSCs)与羟基磷灰石磷酸三钙(HA-TCP)支架材料复合体在牙周组织再生中的研究。**方法** 实验分 3 组, Ad-BMP9 组(转染 Ad-BMP9 载体)、对照组(转染携带 GFP 荧光蛋白的空载体腺病毒 Ad-GFP)和空白对照组(加入 PBS), 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)、Western blot 检测 BMP9 mRNA 及蛋白水平;碱性磷酸酶(ALP)染色、ALP 活性分析、茜素红染色、茜素红半定量分析检测 BMP9 调节 hPDLSCs 的早、晚期成骨分化能力。扫描电镜(SEM)观察 Ad-BMP9 组 hPDLSCs 在 HA-TCP 上的黏附增殖情况。Ad-BMP9/hPDLSCs 复合 HA-TCP 支架材料后,检测 ALP 活性,RT-PCR 检测复合体早、晚期成骨能力。将 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体植入裸鼠皮下及大鼠牙周缺损区,组织学分析新骨形成水平。**结果** Ad-BMP9 转染 hPDLSCs 后,BMP9 表达较其他两组明显升高。ALP 染色、ALP 活性分析、茜素红染色、茜素红半定量分析发现 Ad-BMP9 组的早期和晚期成骨分化能力均明显高于其他两组($P < 0.05$)。SEM 观察结果显示 Ad-BMP9 组 hPDLSCs 能在 HA-TCP 上正常黏附、生长、增殖。与 Ad-GFP/hPDLSCs/HA-TCP 组及 hPDLSCs/HA-TCP 组比较,Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组的 ALP 活性明显增高($P < 0.05$);早期成骨标志物 ALP 中、中晚期成骨标志物骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)表达均明显提高($P < 0.05$)。Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体应用于体内实验,组织学分析证明有更多新骨形成。**结论** Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体能促进新骨形成,修复牙槽骨缺损。

[关键词] 干细胞;牙周组织;骨形成蛋白 9;羟基磷灰石磷酸三钙;成骨分化;牙周组织再生**[中图分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)17-2849-08

BMP9-transfected human periodontal ligament stem cells and HA-TCP scaffold composite promotes alveolar bone regeneration*

QIU Jiyu¹, YING Siqi¹, LIU Xiang¹, ZHANG Yan¹, YE Guo^{2△}

(1. Key Laboratory of Oral Disease and Biomedical Sciences/Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing 401147, China; 2. Department of Outpatient, the Third Affiliated Hospital of Stomatological Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 401147, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) transfected with recombinant adenoviruses expressing BMP9 (Ad-BMP9) and hydroxyapatite tricalcium phosphate (HA-TCP) scaffold composite in periodontal tissue regeneration. **Methods** Three groups were set up in the experiment: the Ad-BMP9 group (transfected with Ad-BMP9 vector), the control group (transfected with empty vector adenoviruses Ad-GFP carrying GFP fluorescent protein) and the blank control group (added with PBS). Real-time PCR (RT-PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of BMP9. Alkaline phosphatase (ALP) staining, ALP activity test, alizarin red staining, and alizarin red semi-quantitative analysis were used to detect the ability of early and advance osteogenic differentiation of hPDLSCs which regulated by BMP9. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the adhesion and proliferation of hPDLSCs on HA-TCP. After Ad-BMP9/hPDLSCs were combined with HA-TCP scaffold material, ALP activity test and RT-PCR were used to detect the early and middle-advanced osteogenesis ability

of the complex. Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP complex was implanted subcutaneously in nude mice and in the periodontal defect area of rats, and the new bone formation level was histologically analyzed. **Results** After Ad-BMP9 transfected with hPDLSCs, the expression level of BMP9 increased significantly when compared with the other two groups ($P < 0.05$). The results of ALP staining, ALP activity test, alizarin red staining, and alizarin red semi-quantitative analysis showed that the early and advanced osteogenic differentiation ability of Ad-BMP9 group was significantly higher than that of the other groups ($P < 0.05$). SEM observed that hPDLSCs in the Ad-BMP9 group could normally adhere, grow and proliferate on HA-TCP scaffold. Compared with the Ad-GFP/hPDLSCs/HA-TCP group and the hPDLSCs/HA-TCP group, the ALP activity of the Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP group was significantly increased ($P < 0.05$), the expression levels of early osteogenic marker ALP, the advanced osteogenic marker osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN) were significantly increased ($P < 0.05$). Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP complex was used in vivo experiments, and histological analysis proved that there was more new bone formation. **Conclusion** Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP complex can promote new bone formation and repair alveolar bone defects.

[Key words] stem cells; periodontium; bone morphogenetic protein 9; hydroxyapatite-tricalcium phosphate; osteogenesis differentiation; periodontal regeneration

牙周炎是一种常见的慢性细菌感染性疾病, 是中国人牙齿脱落最重要的原因, 常常导致包括牙龈组织、牙周膜和牙槽骨等在内的牙周支持组织损伤^[1]。重度牙周炎因严重的牙槽骨破坏, 最终导致牙齿脱落, 严重影响人们的健康和生活质量^[1]。由于牙周组织缺乏自我修复重建能力, 传统的牙周治疗方式, 包含牙周洁治刮治及根面平整、牙周翻瓣术、植骨术等都无法从真正意义上实现牙周支持组织再生。最近, 组织工程技术利用细胞、生长因子和三维支架的结合, 在骨再生领域取得了巨大进展^[2], 同时为牙周组织的再生提供了新思路。

在牙周组织工程中, 人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs) 是一种具有自我更新和多向分化潜能的间充质干细胞 (MSCs)。它具有增殖分化成牙周膜成纤维细胞、成骨细胞和成牙骨质细胞的潜力, 被认为是牙周组织工程的首选“种子”细胞^[3]。骨形成蛋白家族 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族的一员, 在胚胎发育及骨骼形成中扮演着重要的角色。它不仅可促进血管的形成及组织的血管化, 而且有很强的成骨诱导能力, 对多种生长因子均有调节作用, 在组织再生, 尤其是骨组织再生研究中引起国内外学者的广泛关注^[4]。其中骨形成蛋白 9 (bone morphogenetic protein 9, BMP9) 作为诱导成骨分化能力最强的因子之一, 其促进成骨分化作用明显强于其他 BMPs 成员^[5]。羟基磷灰石磷酸三钙 (hydroxyapatite-tricalcium phosphate, HA-TCP) 成分类似于牙齿和骨, 其结构呈多孔疏松状, 与人骨松质相似, 有利于细胞在其表面黏附、生长、增殖, 是较理想的生物支架材料^[6]。

本实验拟构建 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体。将此新型复合体植入裸鼠皮下及 SD 大鼠牙槽骨缺损区, 观察其对骨修复的作用, 并为牙周组织再

生提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

hPDLSCs 来源: 收集经患儿及家长同意因需要矫正而拔除的健康前磨牙。腺病毒载体: BMP9 重组腺病毒 (Ad-BMP9)、带绿色荧光蛋白的空载体腺病毒 (Ad-GFP) 由美国芝加哥大学医学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠。HA-TCP: 四川大学生物材料工程研究中心提供。主要试剂: 地塞米松、抗坏血酸、I 型胶原酶、 β -磷酸甘油 (美国 Sigma 公司); PBS、 α -MEM 培养液 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶、1% 青链霉素双抗溶液 (美国 Gibico 公司); 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Western blot 相关试剂、细胞裂解液、BCIP/NTB 碱性磷酸酶 (ALP) 显色试剂盒、ALP 活性检测试剂盒 (上海碧云天生物技术公司); 戊二醛、4% 多聚甲醛、茜素红染液 (北京索莱宝科技有限公司)。手术器械包。成骨诱导培养基成分: α -MEM、1% 青链霉素双抗、10% FBS、10 mmol/L 地塞米松、50 mg/L 抗坏血酸、100 nmol/L β -磷酸甘油; 完全培养基成分: α -MEM、1% 双抗、10% FBS。

1.2 方法

1.2.1 hPDLSCs 的分离和培养

本研究经重庆医科大学附属口腔医院伦理委员会许可, 与捐赠人签署了知情同意书。hPDLSCs 取自需要矫正的 15 名 (10~25 岁) 患儿的健康前磨牙 (无龋坏, 探诊深度小于或等于 3 mm, 无临床附着丧失, 无明显牙龈红肿或退缩, 无探诊出血)。hPDLSCs 的分离和培养如前课题组文章^[7]所述, 简而言之, 即用无菌刀片刮得根中 1/3 的牙周膜组织并切碎, 37 °C 水浴条件下加入 3 mg/mL 的 I 型胶原酶消化至组织呈絮状, 终止消化后离心, 弃上清液, 重悬细胞后接种于 T-25 培养瓶, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。每 3

天更换 1 次培养基。待细胞达到 90% 以上的融合率后,传代细胞,并在后续实验中使用第 3 代细胞。

1.2.2 转染

取对数生长期的第 3 代 hPDLSCs,加入 Ad-BMP9,轻轻振荡混匀,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养,6 h 后更替为完全培养基,设为 Ad-BMP9 组,另设对照组(加入 Ad-GFP)和空白对照组(加入 PBS)。在转染 24 h 后,荧光显微镜下观察。

1.2.3 RT-PCR

用 RNAiso Plus 提取总 RNA,然后使用 Prime Script™ RT 试剂盒行反转录。使用 TB Green PCR 核心试剂盒对 cDNA 进行实时 PCR 扩增,并在 CFX96 Touch™ 实时系统(美国 Bio-Rad)上进行检测。反应条件如下:95 °C 变性 30 s;接着 95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环。设 GAPDH 为内参因子,用比较 CT 法(ΔΔCT)进行相对定量分析。

表 1 引物序列

基因	引物方向	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
BMP9	正向	CTGCCCTTCTTGTGTGCTT	142
	反向	CCTTACTACTCGTAGGCTTCATA	
ALP	正向	TAAGGACATCGCTACCAGCTC	170
	反向	TCTTCCAGGTGTCAACGAGGT	
OPN	正向	CAGTTGTCCCCACAGTAGACAC	127
	反向	GTGATGTCTCGTCTGTGCATC	
OCN	正向	CTCACACTCTCGCCTATTTG	164
	反向	CTCCAGCCATTGATACAGGTAG	
GAPDH	正向	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	132
	反向	GGCTGTTGTCACTACTTCTCATGG	

OPN:骨桥蛋白;OCN:骨钙素。

1.2.4 Western blot

用蛋白裂解液提取总蛋白,在冰上裂解后离心收集上清液,测量总蛋白浓度后采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE-SDS)分离蛋白,然后将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,封闭液封闭 2 h,加入含一抗(BMP9)的抗体稀释液,4 °C 摇床过夜, TBST 清洗,加入含对应种属二抗的抗体稀释液,室温下孵育 2 h,置于成像仪显影。

1.2.5 ALP 染色和活性定量检测

取各组细胞弃去上清液,4%多聚甲醛固定 15 min,加入 ALP 染色工作液,37 °C 孵育 20 min,观察染色情况并采集图像;活性定量检测在第 3,5,7,9 天做如下处理:取细胞 PBS 清洗 2 遍,每孔加入 150 μL 细胞裂解液,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清液, Beyotime Biotechnology ALP 活性检测试剂盒检测。

1.2.6 茜素红染色和定量检测

取各组细胞弃去培养基,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 清洗 3 次,每孔加入 200 μL 茜素红染液,37

°C 孵育 20 min,观察染色情况并采集图像。半定量检测做如下处理:固定好的细胞将水吸干,并尽可能晾干。加入 1 mL 的 10%茜素红萃取液(CPC),室温下摇床孵育 15 min。将洗脱好的 CPC 转入 96 孔板。用 10% CPC 稀释 20 倍,酶标仪在波长 562 nm 外测定吸光度(A)值。

1.2.7 Ad-BMP9/hPDLSCs 与 HA-TCP 复合

取 Ad-BMP9 组细胞用完全培养基制细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10⁶/mL,吸取细胞悬液缓慢滴加于 HA-TCP 表面(HA-TCP 提前浸泡于完全培养基中 6 h),4 h 后补足完全培养基,每天换液设为 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组。同理,复合 Ad-GFP/hPDLSCs/HA-TCP 和 hPDLSCs/HA-TCP,分别设为 Ad-GFP/hPDLSCs/HA-TCP 组和 hPDLSCs/HA-TCP 组。

1.2.8 扫描电镜(SEM)观察各复合体形态结构

分别取复合 1、3、5、7 d 的细胞支架复合体,PBS 清洗 2 遍,放入戊二醛固定,梯度乙醇脱水,乙酸异戊醋置换,干燥后喷金,SEM 观察并拍照记录。

1.2.9 裸鼠皮下异位成骨实验

取裸鼠 8 只,2%戊巴比妥钠腹腔麻醉,于背部中线两侧前后各做一条约 0.5 cm 切口,潜行分离至皮下,分别植入 HA-TCP、hPDLSCs/HA-TCP、Ad-GFP/hPDLSCs/HA-TCP、Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP,缝合皮肤,术后裸鼠正常饮食。在术后 6 周处死裸小鼠,取标本,4%多聚甲醛固定。

1.2.10 SD 大鼠原位成骨实验

20 只 SD 大鼠分(植入 HA-TCP)4 组,每组 5 只,分别为空白组(无植入);HA-TCP 组(植入 HA-TCP);hPDLSCs/HA-TCP 组(植入 hPDLSCs/HA-TCP 复合体);Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组(植入 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体),2%戊巴比妥钠腹腔麻醉,无菌条件下,切开一侧下颌骨下缘皮肤,分离筋膜及肌肉直达牙槽骨骨面,在第一、第二磨牙根尖区制备 4 mm×3 mm×2 mm 的牙槽骨缺损,将复合体植于牙槽骨缺损区域,表面覆盖 6 mm×5 mm 的胶原膜,并拉拢各层组织复位缝合,术后软食进食 2 周后正常饮食,1 周后拆线。在术后 6 周处死,取标本,4%多聚甲醛固定。

1.2.11 苏木素-伊红(HE)染色

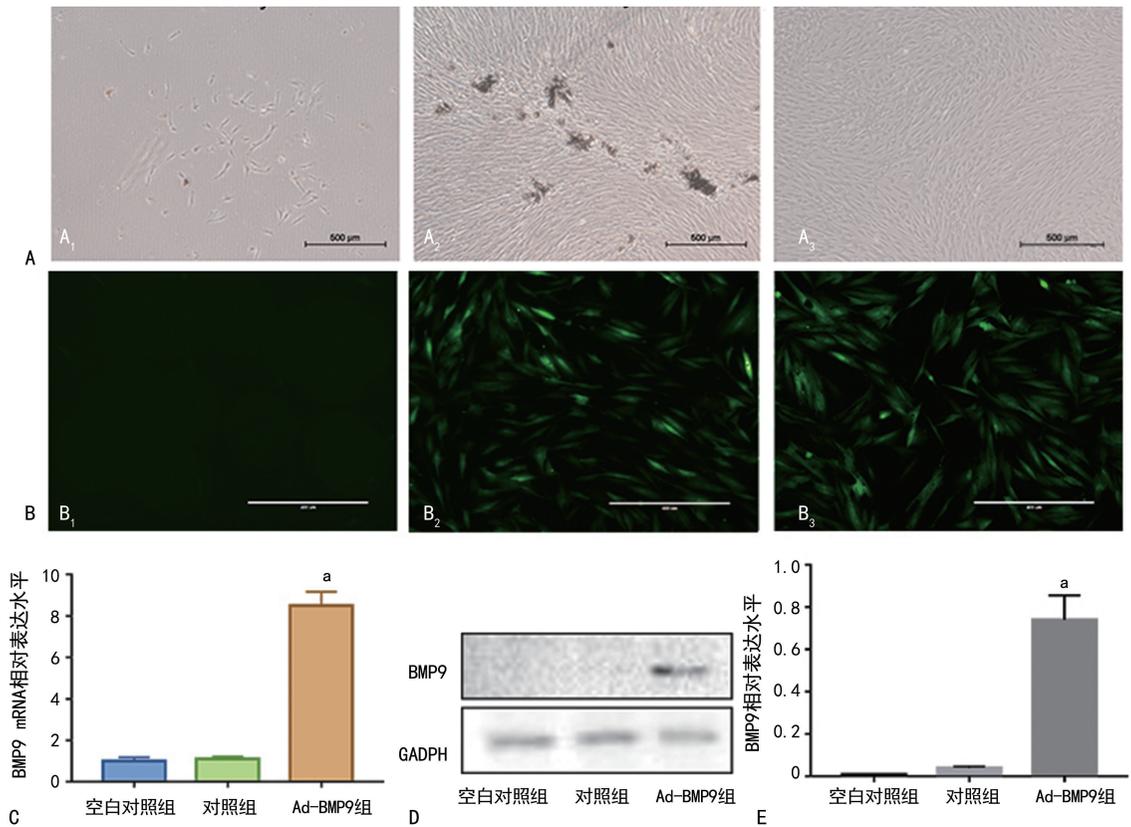
梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切成 4 μm 厚度薄片,常规 HE 染色,中性树脂胶封片,在光学显微镜下观察组织病理学改变。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 4.0 软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hPDLSCs 分离及培养



A₁~A₃ 分别为原代 hPDLSCs 第 3 天(普通光学显微镜×40)、原代 hPDLSCs 第 8 天(普通光学显微镜×40)、第 3 代 hPDLSCs(普通光学显微镜×40);B₁~B₃ 分别为空白对照组、对照组、Ad-BMP9 组 hPDLSCs 24 h 荧光表达(×100);C: BMP9 mRNA RT-PCR 分析结果;D、E: Western blot 检测 BMP9 蛋白表达及分析结果;^a: $P < 0.05$, 与对照组及空白对照组比较。

图 1 转染效果验证

用组织块法和酶消化法消化人牙周膜组织,组织块贴壁后 3 d,细胞逐渐从组织块中爬出。第 8 天时,细胞增殖形成细胞集落,爬满瓶底约 80%。经过梯度消化离心后,第 3 代时,hPDLSCs 细胞呈单层排列于皿底,形态多呈长梭形、纺锤形,见图 1A。

2.2 腺病毒转染 hPDLSCs

用合适滴度的 Ad-GFP 及 Ad-BMP9 转染 hPDLSCs 24 h 后,荧光表达率为 30%~40%,见图 1B₂~B₃。RT-PCR 和 Western blot 实验结果表明 Ad-BMP9 组的 hPDLSCs 不论从基因还是蛋白层面,BMP9 的表达较对照组及空白对照组都明显升高(图 1C~E)。

2.3 Ad-BMP9 促进 hPDLSCs 成骨分化

为测定 Ad-BMP9 对 hPDLSCs 早期和晚期成骨分化能力的影响,在转染第 7 天和第 21 天分别进行 ALP 染色和定量分析,以及茜素红染色和半定量分析。ALP 染色结果显示,空白对照组和对照组染色接近,Ad-BMP9 组染色颜色最深,分析表明 BMP9 可显著提高 ALP 活性,见图 2A、B。茜素红染色结果显示,空白对照组和对照组中,可偶见染成橘红色的钙结节,Ad-BMP9 组可见到大量沉积的钙盐和染成橘红色的钙结节,半定量分析结果也显示 Ad-BMP9 组 A 值明显高于其他两组,见图 2C、D。

2.4 SEM 观察结果

SEM 下观察 HA-TCP 表面形态,可见大量孔隙,其大小为 100~600 μm,孔隙间相互串通,整个 HA-TCP 呈疏松多孔状。Ad-BMP9 组 hPDLSCs 与 HA-TCP 复合培养 1 d 时,见 HA-TCP 表面已有 hPDLSCs 黏附,细胞形态多为不规则形和长梭形,同时可见伪足伸出。复合培养 3、5 d 时,hPDLSCs 增殖长入 HA-TCP 孔隙中,并通过伸出的伪足跨孔生长。复合 7 d 时,hPDLSCs 分泌的细胞外基质开始相互融合,细胞呈片状黏附于 HA-TCP 表面,见图 3。

2.5 复合体 ALP 定量检测及 RT-PCR 检测结果

在复合培养 3、5、7、9 d 时检测各组复合体 ALP 活性,结果显示,与其余两组比较,Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组 ALP 活性明显增高,并在复合后第 7 天达到峰值(图 4A)。于相同时间点用 RT-PCR 检测相关成骨因子表达,对 ALP、骨钙素(OCN)及骨桥蛋白(OPN)基因表达进行分析(OCN 是成骨细胞功能的标志物,ALP 和 OPN 分别为早期和晚期成骨标志物)。RT-PCR 结果显示,Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组成骨因子表达水平明显高于其他两组($P < 0.05$),见图 4B~D。

2.6 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体促进动物牙槽骨再生

为了评估 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体的成骨能力,将体内实验分为裸鼠皮下异位成骨和 SD 大鼠原位成骨。裸鼠皮下成骨 HE 染色镜下观察:在所有组中均可见胶原纤维组织长入 HA-TCP 孔隙中,但在 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组中还可可见新骨形成及成骨细胞排列在新骨的边缘(图 5A)。SD 大鼠原位成骨 HE 染色镜下观察:在空白组

中,缺损周围可见纤维结缔组织和少量新骨组织;在 HA-TCP 组中,可见 HA-TCP 填充于缺损区,HA-TCP 内可见大量纤维结缔组织,但无明显新骨形成;在 hPDLSCs/HA-TCP 组中,可见一定量的幼稚新骨及大量胶原纤维组织;在 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组中,观察到大量的较成熟的新生骨,还可见新生的血管及成骨细胞(图 5B)。

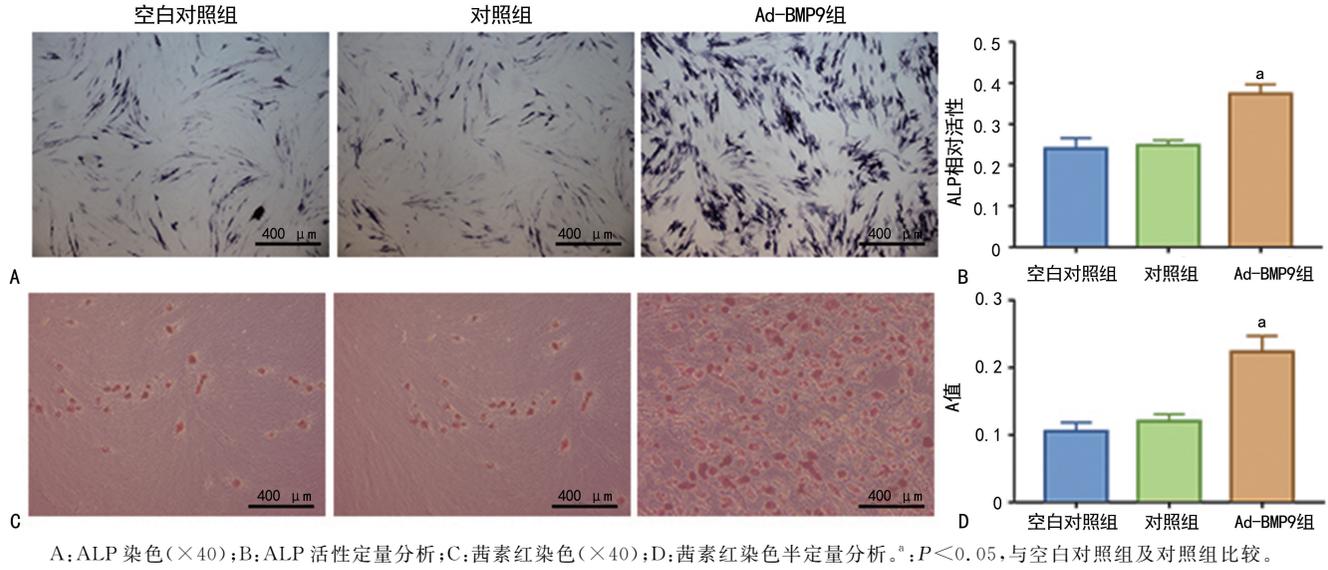


图 2 Ad-BMP9 促进 hPDLSCs 成骨分化

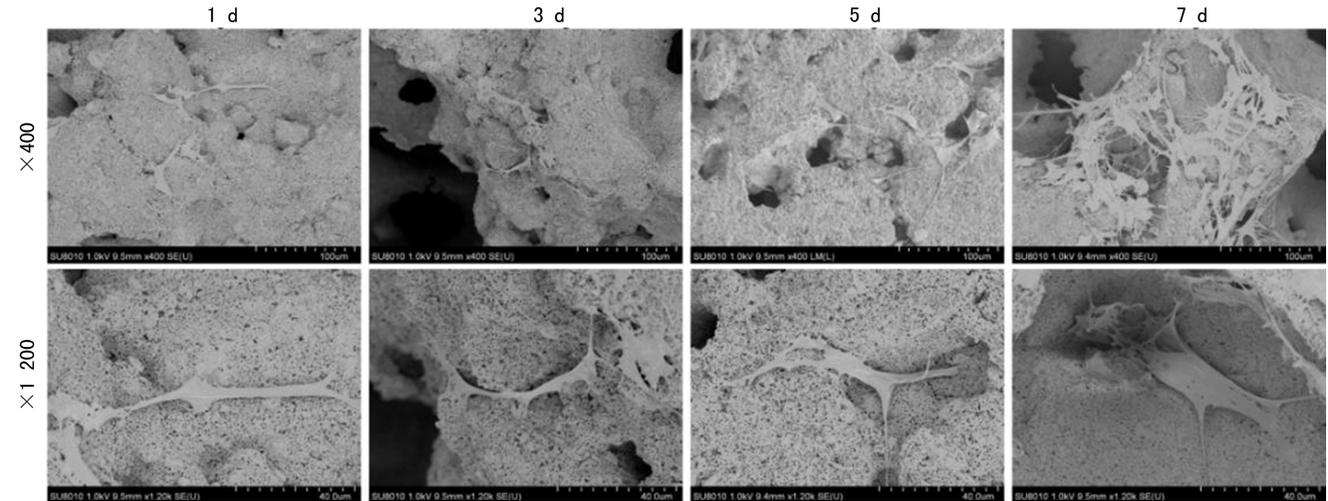


图 3 SEM 观察 Ad-BMP9 组 hPDLSCs 细胞与 HA-TCP 复合培养形态

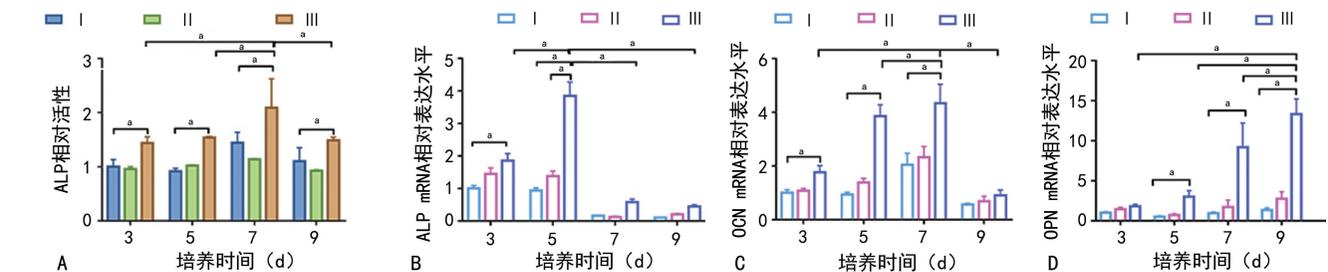
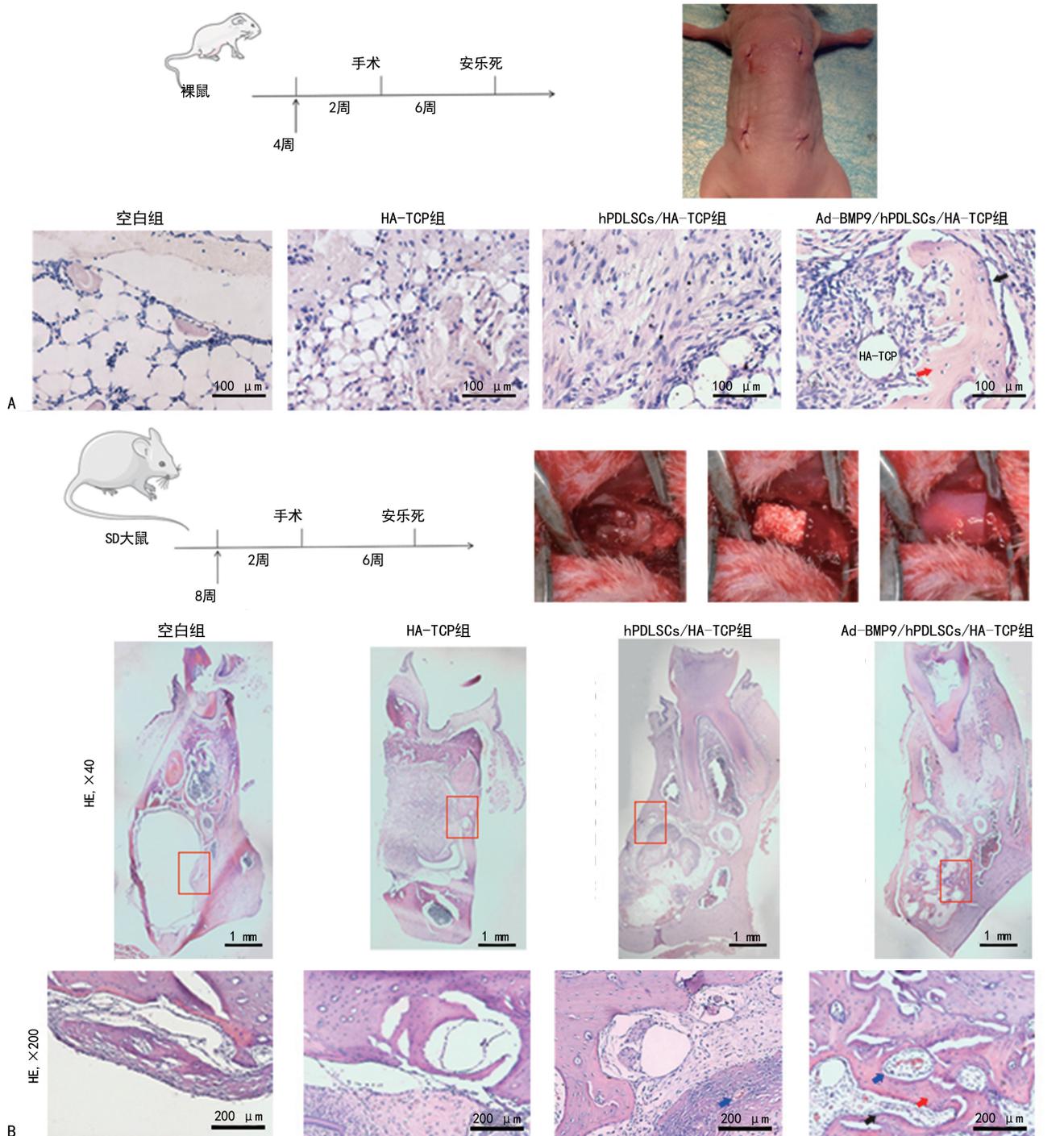


图 4 Ad-BMP9 促进 hPDLSCs 在 HA-TCP 支架材料上成骨分化



A: 裸鼠皮下异位植入复合体手术过程及术后 6 周 HE 染色结果($\times 400$); B: 复合体植入 SD 大鼠牙周缺损区手术过程及术后 6 周 HE 染色结果($\times 40$; $\times 200$)。红色箭头: 新生排列不规则的骨小梁; 黑色箭头: 成骨细胞; 蓝色箭头: 新生血管; 红框: 大鼠 200 倍 HE 染色在 40 倍 HE 染色的对应位置。

图 5 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合物促进动物牙槽骨再生

3 讨 论

牙周炎是临床上较为常见的口腔疾病之一, 具有极高的发病率, 通常是由微生物所引起的龈下感染, 典型的临床症状为牙周支持组织炎症及牙槽骨破坏^[8]。以往临床上多采用牙周序列治疗, 主要方式为彻底清除牙周局部刺激物, 但是治疗效果并不令人满意。现有的治疗方式仅能够维持牙周组织不进一步破坏, 但对于已破坏的组织尤其是骨组织还不能使其再生, 因此临床上亟需一种新的治疗方法来实现牙周

组织再生, 这对提高患者的生活质量具有重大意义^[8]。在本实验中, 笔者证明了 Ad-BMP9 可以促进 hPDLSCs 的成骨作用, hPDLSCs 可以在 HA-TCP 支架材料上黏附、生长和增殖。基于这些发现, 笔者设计了由 Ad-BMP9 转染的 hPDLSCs 和 HA-TCP 组成的新型复合体, 在体外实验中观察其成骨分化能力, 并将该新型复合体应用于体内实验, 评估其牙槽骨再生能力, 为治疗牙周炎引起的骨组织破坏提供新的治疗策略。

hPDLSCs 是一种间充质来源的多能干细胞,具有成骨分化和骨再生的潜能^[4]。BMPs 作为 TGF- β 超家族的一员,主要的生物学功能是促进成骨潜能细胞转化形成软骨和骨组织^[9]。HE^[10] 在体内外比较了 14 种 BMPs,发现 BMP9 促进间充质干细胞的成骨分化能力明显高于其他 BMPs 成员,被评为最强因子之一。近年研究发现 Ad-BMP9 可以诱导 hPDLSCs 早、晚期成骨分化^[11]。本实验分别采用 ALP 染色、ALP 活性分析检测 BMP9 对细胞早期成骨分化的影响;茜素红染色、茜素红半定量分析 BMP9 对细胞晚期成骨分化的影响。研究显示:Ad-BMP9 明显增强 hPDLSCs 早期和晚期成骨分化;Ad-BMP9 组 ALP 染色明显深于其他两组,ALP 活性检测也得到相同结果;Ad-BMP9 组茜素红染色明显高于其他两组,半定量分析也得出相同结果。以上结果均契合 BMPs 促进干细胞成骨分化预期^[12-13]。综上所述可以证明 Ad-BMP9 具有诱导 hPDLSCs 成骨分化的能力。

HA-TCP 是目前应用较为广泛的支架材料,不仅可以为细胞和组织生长提供支持环境,并且与人体生物相容性较好^[14]。闫伟等^[15] 将自体骨髓来源间质干细胞复合 HA-TCP 用于治疗脊柱融合,研究结果表明植入体内的人工骨与患者自体髂骨的临床效果基本相同。胡建中等^[16] 分别将基质细胞、内皮细胞与 HA-TCP 复合培养,结果发现基质和内皮细胞均能很好地附着于复合材料表面,并能向其孔内生长。谢红军^[17] 用骨髓来源间充质干细胞与 HA-TCP 复合培养后回植于动物体内,发现 HA-TCP 适合细胞爬行增殖,对细胞有黏附性,可以作为细胞的良好载体。本实验在 SEM 下观察了 hPDLSCs 在 HA-TCP 表面生长的动态微观情况,发现 HA-TCP 具有良好的生物相容性。

BMP9 是诱导成骨分化的生长因子^[5],HA-TCP 是一种具有良好细胞黏附性并且可以提供结构支撑的多孔支架材料^[6]。LI 等^[18] 将 Ad-BMP9 转染牙囊干细胞与羟基磷灰石体外复合培养后植于动物体内,证明其复合体能够促进新骨形成,加速骨再生,加快骨缺损修复。何锦泉等^[19] 将 BMP9 转染脂肪干细胞与羟基磷灰石复合体植于大鼠下颌骨缺损中,可以加速骨修复进程,促进新生血管与新骨形成。区别于其他干细胞,hPDLSCs 由于其极低的免疫原性和显著的免疫抑制作用,使其成为牙周组织维持稳态、重塑和修复的关键细胞^[20]。本实验应用具有免疫调节作用的 hPDLSCs 作为种子细胞,构建 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体。体外实验中,在不同时间点检测其成骨分化的早、晚期成骨标志物,以判断复合体的成骨分化能力。早期成骨标志物 ALP 染色结果显示 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组 ALP 表达

相对于其他两组明显增高。ALP 基因表达在第 5 天达到峰值,ALP 活性在第 7 天达到峰值,造成此结果的原因可能是基因表达早于细胞外基质的蛋白表达。晚期成骨标志物 OCN、OPN 基因在 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组表达上调,远远高于其他两组。体内实验中,将 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体植于裸鼠皮下及大鼠牙槽骨缺损处,以复合体探究新骨形成和牙槽骨缺损修复能力,HE 染色结果显示 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 组中可见显著的具有良好骨小梁结构的新骨形成和大量新生血管形成,并观察到位于成骨区骨小梁边缘的成骨细胞成行排列。与以往实验比较,本实验基于牙周炎相关的牙槽骨缺损的修复,应用 hPDLSCs 可以更好地实现牙周相关的骨缺损修复。其次,由于 hPDLSC 具有免疫调节作用,因此应用 hPDLSCs 可以更好地探究炎症相关的牙槽骨缺损修复。

综合上述结果可以证明 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 具有促进体外 PDLSCs 成骨分化的能力。本实验利用组织工程技术构建了 Ad-BMP9/hPDLSCs/HA-TCP 复合体,并证实 Ad-BMP9 可以在 HA-TCP 上促进 hPDLSCs 成骨分化。而且该复合体在骨缺损修复中有良好的表现。这些发现可能为临床治疗牙周炎相关的牙槽骨缺损开辟一种新的途径。

参考文献

- [1] KUANG Y C, HU B, FENG G, et al. Metformin prevents against oxidative stress-induced senescence in human periodontal ligament cells [J]. *Biogerontology*, 2020, 21(1): 13-27.
- [2] MENG H F, HUL, ZHOU Y, et al. A sandwich structure of human dental pulp stem cell sheet, treated dentin matrix and Matrigel for tooth root regeneration [J]. *Stem Cells Dev*, 29(8): 521-532.
- [3] COZZOLINO A M, NOCE V, BATTISTELLI C, et al. Modulating the substrate stiffness to manipulate differentiation of resident liver stem cells and to improve the differentiation state of hepatocytes [J]. *Stem Cells Int*, 2016(2016): 1-12.
- [4] SAWAKO F, NAKAMURA T, FURUE K, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-9 potently induces osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts [J]. *Eur J Oral Sci*, 2016, 124(2): 151-157.
- [5] ZHANG B, YANG L J, ZENG Z Y, et al. Leptin potentiates BMP9-induced osteogenic differenti-

- ation of mesenchymal stem cells through the activation of JAK/STAT signaling [J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(8):498-510.
- [6] LI J H, ZHANG F M, ZHANG N, et al. Osteogenic capacity and cytotherapeutic potential of periodontal ligament cells for periodontal regeneration in vitro and in vivo [J]. *PeerJ*, 2019, 7:e6589.
- [7] YE G, LI C H, XIANG X R, et al. Bone morphogenetic protein-9 induces PDLSCs osteogenic differentiation through the ERK and p38 signal pathways [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(10):1065-1072.
- [8] CHO D H, SONG I S, CHOI J, et al. Risk of peripheral arterial disease in patients with periodontitis: a nationwide, population-based, matched cohort study [J]. *Atherosclerosis*, 2020, 297:96-101.
- [9] LOWERY J W, ROSEN V. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4):2431-2452.
- [10] HE T C. Distinct osteogenic activity of BMPs and their orthopaedic applications [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 5(4):363-366.
- [11] WANG P, WANG Y, TANG W Z, et al. Bone Morphogenetic protein-9 enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via the JNK pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1):e0169123.
- [12] 孙强, 邱勇. BMPs 信号通路调控骨髓间质干细胞的成骨分化 [J]. *临床骨科杂志*, 2005, 8(5):471-474.
- [13] JANSEN J H W, VAN DER JAGT O P, PUNT B J, et al. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study [J]. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2010, 11(1):188-200.
- [14] YOUNG S, JONG-SEOK P, SUNG J, et al. Promotion of human mesenchymal stem cell differentiation on bioresorbable polycaprolactone/biphasic calcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Biotech Bioprocess Engineer*, 2014, 19(2):341.
- [15] 闫伟, 杨莉, 凌梅, 等. 自体骨髓富集间质干细胞与羟基磷灰石磷酸三钙材料复合在脊柱融合中的应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(8):1075-1080.
- [16] 胡建中, 毛新展, 吕红斌, 等. 羟基磷灰石/磷酸三钙复合材料成骨细胞载体的体外实验 [J]. *中国临床康复*, 2003, 7(6):916-917.
- [17] 谢红军. 纳米羟基磷灰石复合骨髓基质细胞修复骨缺损的实验研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2008.
- [18] LI N, XIA Y, LIANG D, et al. The healing of alveolar bone defects with novel bio-implants composed of Ad-BMP9-transfected rDFCs and CHA scaffolds [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):63-73.
- [19] 何锦泉, 丁江峰, 欧阳可雄, 等. BMP9 转染脂肪干细胞联合纳米相羟基磷灰石联合修复下颌骨 [J]. *中国医药指南*, 2016, 14(10):50-51.
- [20] HU L, LIU Y, WANG S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration [J]. *Oral Dis*, 2018, 24(5):696-705.

(收稿日期:2020-02-28 修回日期:2020-05-20)