

# 载柚皮苷胶原蛋白凝胶对人牙髓干细胞增殖的影响

肖婉鲁 潘爽 侯婷婷 李艳萍 何丽娜 牛玉梅\*

(哈尔滨医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科 黑龙江 哈尔滨 150001)

**[摘要]** 目的:构建柚皮苷/胶原蛋白凝胶复合体,研究其对人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells,hDPSCs)体外增殖的影响。方法:体外分离并培养 hDPSCs,CCK-8 实验检测不同浓度的胶原蛋白凝胶对 hDPSCs 增殖的影响,进而筛选出最佳浓度,并以最佳浓度(1 g/L)胶原蛋白凝胶载不同质量的柚皮苷。通过 CCK-8 实验检测载柚皮苷胶原蛋白凝胶对 hDPSCs 增殖的影响。结果:1 g/L 浓度的胶原蛋白凝胶更适合 hDPSCs 的生长;当柚皮苷与胶原蛋白凝胶质量之比为 0.2 : 1 时能更好地促进 hDPSCs 的粘附和生长。结论:一定比例的柚皮苷胶原蛋白凝胶与 hDPSCs 具有良好的生物相容性,可作为一种理想支架材料为 hDPSCs 的生长提供空间。

**[关键词]** 人牙髓干细胞 柚皮苷 胶原蛋白凝胶 细胞增殖

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2019)06—0541—05

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqyxyj.2019.06.008

**Effects of Collagen Gel Encapsulating Naringin on Proliferation of Human Dental Pulp Stem Cells.** XIAO Wan-lu, PAN Shuang, HOU Ting-ting, LI Yan-ping, HE Li-na, NIU Yu-mei\*. Department of Endodontics, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China.

**[Abstract]** **Objective:** Naringin/collagen gel complex was constructed and its effects on the proliferation of human dental pulp stem cells (hDPSCs) were investigated. **Methods:** hDPSCs were isolated and cultured *in vitro*. Proliferation ability of hDPSCs in various concentrations of collagen gel was analyzed using a cell counting kit -8 (CCK-8) assays. hDPSCs and different concentrations of naringin were encapsulated in the collagen gel. CCK-8 assay was used to evaluate the effect of naringin/collagen gel complex on the proliferation of hDPSCs. **Results:** The optimal collagen gel concentration was 1 g/L, which could enhance the adherence and growth of hDPSCs. In addition, the best ratio of naringin to collagen gel was 0.2 : 1, which promoted the growth and proliferation of hDPSCs. **Conclusion:** Naringin/collagen gel complex possesses a good cellular compatibility with hDPSCs. As a scaffold material, it can provide space for hDPSCs to proliferate.

**[Key words]** Human dental pulp stem cells Naringin Collagen gel Cell proliferation

在牙体组织结构中,牙髓是唯一能自我更新修复的软组织。其内含丰富的间充质干细胞-牙髓干细胞,为牙本质的修复再生提供了基础。因此,牙髓干细胞在牙体牙髓疾病的防治以及再生医学研究等方面也逐渐受到重视<sup>[1]</sup>。

在组织工程的研究中,越来越多的干细胞被结合到各种类型的支架材料中,选择一种性能优良的支架材料显得尤为重要。胶原蛋白凝胶在组织工程方面具有一定优势,常被用于组织重建<sup>[2]</sup>,且与 2D 细胞培养环境相比,在 3D 胶原蛋白凝胶中能更早

的出现细胞的矿化和成骨标记基因的表达<sup>[3]</sup>。中药是中华民族国粹之一,在长期的生产应用中发挥了不可忽视的作用,中药作为一种生长因子在很多研究中都有不可替代的价值。中药骨碎补是骨伤科方剂中的常用药,现代药理及临床研究显示,柚皮苷是其最重要的活性成分<sup>[4]</sup>。有研究表明柚皮苷与胶原基质结合能促进局部的新骨形成<sup>[5]</sup>。然而,柚皮苷与胶原蛋白凝胶对人牙髓干细胞的影响尚未见报道,因此本文的目的是研究载柚皮苷胶原蛋白凝胶对人牙髓干细胞增殖的影响。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 DMEM 高糖培养基(Hyclone,美国)、胎牛血清(Gibco,美国)、0.25%胰蛋白酶(Gibco,美国)、Dispase 酶(罗氏,中国);I 型胶原蛋白酶(Sigma,美国);PBS 粉末(博士德生物

**基金项目** 国家自然科学基金(编号:81570963)

**作者简介** 肖婉鲁(1991~),女,山东人,硕士,住院医师,主要研究牙髓干细胞再生的相关研究。

\* 通讯作者 牛玉梅,E-mail:niuym@hrbmu.edu.cn

工程有限公司, 中国); 维生素 K、 $\beta$ -甘油磷酸钠、成脂诱导液 (Cyagen, 美国)、胶原蛋白凝胶 (Coring, 美国); CCK-8 (同仁, 日本); 柚皮苷 (Sigma, 美国); 倒置相差显微镜及照相系统 (Olympus, 日本); 酶联免疫检测仪 (BIO-TEK, 美国)。

**1.2 人牙髓干细胞的分离、培养及鉴定** 选取哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科门诊 18~28 岁因正畸或阻生拔除的健康恒牙, 取材时均已获得家属知情同意。于超净工作台内无菌条件下取出牙髓组织, 3 g/L 胶原酶和 4 g/L Dispase 酶消化牙髓组织 30~45 min, 1500 r/min 离心 1 min, 弃上清, 用含 20% 胎牛血清, 青霉素 10 U/mL, 链霉素 10 g/L 的 DMEM 培养基重悬, 吹打均匀, 接种于直径 3.5 cm 的小皿中, 2 d 后更换新的培养液。当细胞融合至 80% 左右传代并鉴定<sup>[6]</sup>。用 0.25% 胰酶溶液 (含 EDTA) 消化并 1:3 传代标记为 P1。将 P1 代细胞经成骨矿化诱导液 (10% 培养液,  $10^{-8}$  mol/L 维生素 K, 10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠, 1.5 g/L L-维生素 C, 2 mmol/L L-谷氨酰胺) 诱导 7 d 和 21 d, 分别进行 ALP 染色和茜素红染色。将 P1 代细胞经成脂诱导 A 液、B 液 (Cyagen, 美国) 交替诱导 2 个循环后, 进行油红 O 染色。倒置显微镜下观察并拍照。以下实验均选用第 1~5 代细胞。

**1.3 胶原蛋白凝胶的配置** 胶原蛋白凝胶, 在零摄氏度以下成黏液状, 调节 pH 为中性, 经过 37 °C 的温度变化, 胶原可通过自我组装为胶原纤维而形成凝胶。根据说明书的要求, 按比例将胶原蛋白凝胶添加到 1 N NaOH、10×PBS 和蒸馏水中, 配置 0.5、1、2、3 g/L 浓度的胶原蛋白凝胶, 配置好后放在 -6 °C 冰盒中待用。

**1.4 细胞的活性检测** 为检测细胞在胶原蛋白凝胶中的生长情况, 将不同浓度的胶原蛋白凝胶重悬 P1 代人牙髓干细胞, 按每孔  $4 \times 10^4$  个/300  $\mu$ L 接种于 24 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 30 min, 待胶原凝固后每孔补充 1.5 mL 10% FBS 的 DMEM 培养基, 培养 3 d 后, 进行活死染色, 荧光显

微镜下观察。

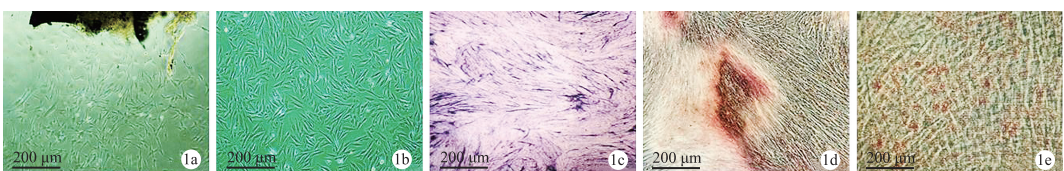
**1.5 细胞的增殖实验** 为选出胶原蛋白凝胶的最佳浓度, 检测不同浓度胶原蛋白凝胶对人牙髓干细胞增殖的影响。将人牙髓干细胞消化, 离心, 重悬于配置好的各浓度组胶原中, 以每孔  $1 \times 10^4$ /100  $\mu$ L 接种到 96 孔板中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 30 min, 待胶原凝固后, 于每孔中加入 100  $\mu$ L 的含 10% FBS 的 DMEM, 放在培养箱中培养。于培养 1、3、5、7 d 后采用 CCK-8 法检测细胞的增殖, 即每 100  $\mu$ L 培养基加入 10  $\mu$ L CCK-8 液, 37 °C 培养箱孵育 4 h 后, 酶标仪 450 nm 波长下读数得 A 值。

**1.6 胶原蛋白凝胶载柚皮苷的制备** 用浓度为 1 g/L 胶原蛋白凝胶作为载体。根据柚皮苷与胶原蛋白凝胶的质量之比, 实验组可以分为 0.1:1; 0.2:1; 1:1; 2:1; 5:1 五个组。将称好的柚皮苷粉末溶解于微量的 NaOH 溶液中, 待溶解完全后, 加入一定比例的 10×PBS 和蒸馏水后, 经过 0.22  $\mu$ m 滤器过滤到高温高压过的 EP 管中, 加入胶原蛋白液, 放在 -6 °C 冰盒中待用。

**1.7 细胞的增殖实验** 为了检测细胞的增殖情况, 将细胞-胶原蛋白支架复合体和细胞-载柚皮苷胶原蛋白复合体接种于 96 孔板, 密度为每孔 100 个/ $\mu$ L, 共培养 1、3、5、7 d 后, 每孔加入 CCK-8 液检测。

**1.8 细胞在胶原蛋白凝胶载体上的生长** 为了检测细胞的生长情况, 将细胞-胶原凝胶和细胞-载柚皮苷胶原蛋白凝胶复合体接种于 24 孔板, 密度为每孔  $4 \times 10^4$  个/300  $\mu$ L, 各组共培养 6 d, 弃液后置于 4% 多聚甲醛液固定 2 h, 70%、80%、90%、95%、100% 乙醇溶液序列脱水; 浸蜡包埋, 常规制作厚度为 5  $\mu$ m 的石蜡切片; 苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色观察各组细胞生长情况。

**1.8 统计学分析** 数据采用 GraphPad Prism 7 软件进行独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。所有实验独立重复 3 次, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。



1a: 原代人牙髓干细胞培养第 5 天形态; 1b: 人牙髓干细胞培养第 20 天形态; 1c: 成骨矿化诱导液诱导 7 d 后 ALP 染色细胞形态; 1d: 成骨矿化诱导液诱导 21 d 后茜素红染色细胞形态; 1e: 成脂诱导 14 d 后油红 O 染色形态

图 1 人牙髓干细胞的形态

Fig. 1 Isolation and culture of hDPSCs.

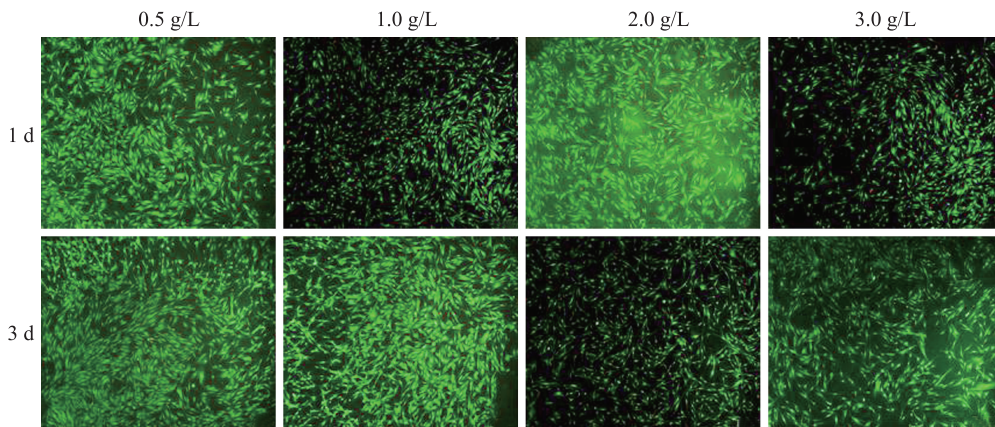
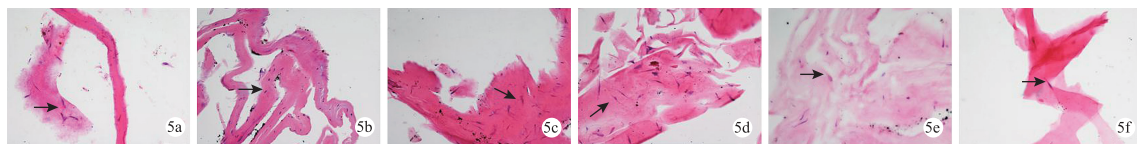


图 2 不同浓度的胶原凝胶对 hDPSCs 活性的影响

Fig. 2 Viability effect of various concentrations of collagen gel on hDPSCs.



5a: 对照组; 5b: 0.1 : 1; 5c: 0.2 : 1; 5d: 1 : 1; 5e: 2 : 1; 5f: 5 : 1

图 5 柚皮苷/胶原凝胶/hDPSCs 复合物苏木精-伊红染色图(×20)

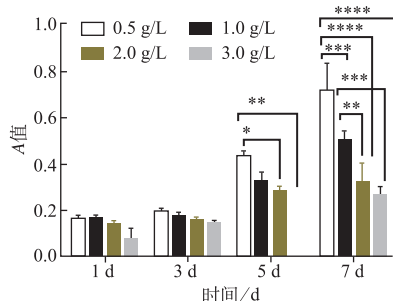
Fig. 5 HE staining on Naringin/collagen gel/hDPSCs composite (×20).

## 2 结果

2.1 人牙髓干细胞体外分离、培养及鉴定 原代培养的人牙髓组织,一般在第 5~7 天开始从组织周边往外爬出细胞,成典型的长梭形或纤维细胞样形态。待 14~20 d 左右细胞逐渐达到融合,细胞排列成“窝璇状”或者束状。经成骨矿化液诱导,ALP 染色后大量的牙髓干细胞被染成蓝色。茜素红染色后诱导的牙髓干细胞也出现了矿化结节。经油红-O 染色后显微镜下可见到红色圆形的小脂滴。

2.2 胶原蛋白凝胶对人牙髓干细胞活性、增殖的影响 为了检测人牙髓干细胞在胶原蛋白凝胶中的活性,培养 3 d 后进行活死染色。如图 2 结果发现培养 24 h 后,细胞在 0.5 g/L 胶原凝胶组中粘附良好,其次是 1 g/L 组,细胞成片状或团状,细胞与细胞之间生长距离密切。细胞活性与细胞密度前两组也较 2 g/L 和 3 g/L 组高。图 2 中 CCK-8 实验表明,从第 5 天开始,0.5 g/L 凝胶组更能促进细胞的增殖( $P < 0.01$ ),其次是 1 g/L 凝胶组,2 g/L 和 3 g/L 组显然未能促进对 hDPSCs 的增殖,无统计学意义( $P > 0.05$ )。由于 0.5 g/L 凝胶组结构较松散,形态较差,后续实验选用 1 g/L 浓度。

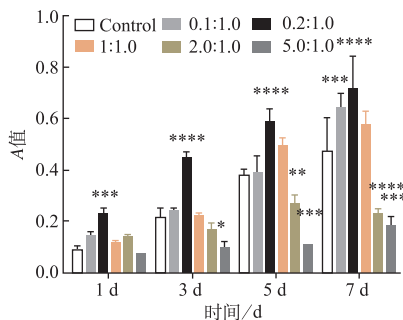
2.3 CCK-8 实验 如图 3 所示,细胞-胶原支架复合体和细胞-载柚皮苷胶原蛋白凝胶复合体共培养 1、3、5、7 d,CCK-8 实验结果表明,实验组和对照组均有不同程度的增长,从第 1~7 天,柚皮苷与胶原



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

图 3 不同浓度的胶原凝胶对 hDPSCs 增殖的影响

Fig. 3 Proliferation effect of various concentrations of collagen gel on hDPSCs.



\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

图 4 不同质量比的载柚皮苷胶原凝胶对 hDPSCs 增殖的影响

Fig. 4 Effect of various ratios of collagen gel containing naringin on the proliferation of hDPSCs.

蛋白质量比为 0.2 : 1 ( $P < 0.05$ ) 时更能促进细胞的增殖,在第 7 天时 0.1 : 1 组增殖较对照组有统计学

意义。随着柚皮苷质量的增加,当柚皮苷大于凝胶质量时并未促进细胞的增殖。在第5天时两者之比为1:1时对细胞增殖有统计学差异。显然当两者之比为2:1和5:1时会抑制细胞的增殖。

**2.4 组织学染色** 为了研究hDPSCs在不同质量比的柚皮苷/胶原蛋白凝胶复合体的生长情况,将培养6d的细胞-胶原蛋白凝胶支架复合体和细胞-载柚皮苷胶原蛋白凝胶复合体制备石蜡切片,苏木精-伊红染色观察各组细胞,发现含有柚皮苷实验组0.1:1;0.2:1;1:1各组中粘附的细胞稍多于纯胶原蛋白组,粘附在柚皮苷胶原蛋白凝胶中的细胞,核仁明显呈淡蓝色,核大而圆,胞浆呈粉红色,形态为长梭形。5:1组中胶原蛋白数量减少,粘附的细胞也相对较少。

### 3 讨论

牙髓组成中除包含丰富的血管,神经外,还富含大量的间充质干细胞-牙髓干细胞。它是由Gronthos等<sup>[7]</sup>于2000年首次从成人牙髓组织中提取出,多向分化能力是其重要的生物学特性之一。本研究对体外培养的hDPSCs进行了成骨、成脂诱导,ALP染色、茜素红染色和油红-O染色均呈阳性。符合干细胞多向分化的潜能。

胶原蛋白凝胶作为天然的生物材料支架因其良好的生物相容性,可降解等优点逐渐受到关注。有学者发现将人牙髓干细胞接种在I型胶原蛋白中有持续性的骨形成。将细胞胶原基质移植至大鼠颅骨缺损处,8周发现有新骨形成<sup>[8]</sup>。也有研究者将人牙髓干细胞,胶原蛋白支架和DMP-1三者结合移植入小鼠模型,6周后经组织学染色发现有牙髓样组织形成,而对照组MTA在修复缺损处并未有组织形成<sup>[9]</sup>。此外,Kim等<sup>[10]</sup>研究表明在胶原、明胶和壳聚糖这3种天然的支架材料中,分别接种人牙髓干细胞,一定时间后发现胶原更能促进干细胞的增殖。可见,胶原蛋白作为一种支架材料在组织再生研究中具有广阔的前景。

中药是中华民族国粹之一,在近年来的研究中也凸显出越来越重要的价值。骨碎补记载于《本草拾遗》,具有补肾、活血、止血等功效,主治肾虚腰痛、耳鸣耳聋、牙痛等,为历代常用药<sup>[11]</sup>。柚皮苷是其最重要的活性成分之一。研究表明,柚皮苷可以促进多种干细胞的增殖和生长<sup>[12-14]</sup>。将其添加到纳米支架中,可促进成骨细胞的功能,抑制破骨细胞的形成,为治疗骨质疏松提供了一定参考<sup>[15]</sup>。也有学者发现柚皮苷包裹在壳聚糖基凝胶中能够抑制实验

性牙周炎的发生<sup>[16]</sup>。

本研究将I型胶原蛋白凝胶,浓度分为0.5、1、2、3g/L四组,对牙髓干细胞的活性以及增殖能力进行了检测。结果显示,0.5g/L组更能促进细胞的活性和增殖,其次是1g/L组。因0.5g/L组的胶原凝胶结构松散,含水量大,形态不佳,所以后续实验选用1g/L组。

根据柚皮苷和胶原蛋白的质量之比分别设为0.1:1;0.2:1;1:1;2:1;5:1五组实验组,对照组为不加柚皮苷的纯胶原蛋白凝胶。细胞增殖实验表明,从第1~7天,0.1:1;0.2:1;1:1组中细胞随着时间的增加吸光度值也在增加,2:1;5:1这两组显然随着时间的增加,并未促进细胞的增殖。HE染色结果表明,hDPSCs在胶原蛋白凝胶以及载柚皮苷胶原凝胶中的生长良好,细胞形态呈典型的长梭形,核浆分明,其中在0.1:1;0.2:1;1:1组中细胞的数量明显多于纯胶原组,基于此,笔者认为当柚皮苷与胶原凝胶质量之比保持在1:1以内时牙髓干细胞有更好的生长趋势,柚皮苷作为一种药物有更充分的释放。当柚皮苷比例增大时,显然柚皮苷对细胞的生长以及对胶原蛋白凝胶产生了抑制作用,不利于细胞的活性和生长。本实验的研究表明,一定比例的载柚皮苷胶原蛋白凝胶对人牙髓干细胞具有良好的生物相容性,可促进人牙髓干细胞的生长,是一种较理想的支架材料。

### 参考文献

- [1] Bakhtiar H, Mazidi SA, Mohammadi Asl S, et al. The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review [J]. Prog Biomater, 2018, 7(4): 249-268.
- [2] Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering [J]. Chem Rev, 2001, 101(7): 1869-1879.
- [3] Matthews BG, Naot D, Callon KE, et al. Enhanced osteoblastogenesis in three-dimensional collagen gels [J]. Bonekey Rep, 2014, 3: 560.
- [4] Wong RW. Effect of naringin collagen graft on bone formation [J]. Biomaterials, 2006, 27(9): 1824-1831.
- [5] 钱前. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 3(35): 186-188.
- [6] 杨典淞, 潘爽, 何丽娜, 等. 整合素  $\alpha 6$  对模拟微重力下人牙髓干细胞粘附能力的影响 [J]. 口腔医学研究, 2016, 32(4): 361-364.
- [7] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-13630.
- [8] Fang TJ, Wang DH, Wang CY, et al. Osteogenic prospective of deriving human dental stem in collagen matrix boost [J]. J Mater Sci Mater Med, 2017, 28(12): 192.

- [9] Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, et al. *In vivo* generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice [J]. *J Endod*, 2008, 34(4): 421-426.
- [10] Kim NR, Lee DH, Chung PH, et al. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009, 108(5):e94-e100.
- [11] 常德有,董福慧.骨碎补的研究概况[J].吉林中医药,2006,26(6):61-62.
- [12] 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.
- [13] Zhao Z, Ma X, Ma J, et al. Naringin enhances endothelial progenitor cell (EPC) proliferation and tube formation capacity through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 286:45-51.
- [14] Chen LL, Lei LH, Ding PH, et al. Osteogenic effect of drynariae rhizoma extracts and naringin on MC3T3-E1 cells and an induced rat alveolar bone resorption model [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(12):1655-1662.
- [15] Ji Y, Wang L, Watts DC, et al. Controlled-release naringin nanoscaffold for osteoporotic bone healing [J]. *Dent Mater*, 2014, 30(11):1263-1273.
- [16] Chang PC, Chao YC, Hsiao MH, et al. Inhibition of periodontitis induction using a stimuli-responsive hydrogel carrying naringin [J]. *J Periodontol*, 2017, 88(2):190-196.

[收稿日期:2019-02-11]

(本文编辑 李四群)

## 《口腔疾病防治》杂志征稿及征订启事

《口腔疾病防治》是国内外公开发行的口腔医学学术类期刊,月刊,CN 44-1724/R,ISSN 2096-1456,CO-DEN KJFOA4,为中国科技核心期刊,被国内外多家重要数据库收录,由南方医科大学口腔医院(广东省口腔医院)、广东省牙病防治指导中心主办,中南大学、郑州大学、南昌大学、重庆医科大学、福建医科大学等五所大学口腔医学院协办;主要报道国内外口腔医学研究新进展和口腔疾病防治新成果、新技术、新经验,服务口腔疾病预防治疗领域学术交流和口腔疾病防控工作。

本刊图文并茂、全铜版纸彩色印刷,设有专家论坛、专家述评、专栏论著、基础研究、临床研究、防治实践、综述等栏目。本刊对录用论文实行免费快速发表,不收取作者任何费用并支付稿酬。

本刊官网及投稿网址为 <http://www.kqjbfz.com>,本刊官网文献实行开放获取(Open Access,OA),免费为读者提供全文服务。《口腔疾病防治》已开设微信公众号,每月推出专家论坛文章及当期全文,读者可通过扫描杂志封面的二维码或者搜索微信公众账号“口腔疾病防治杂志”、微信号“kqjbfz”关注本刊。

本刊没有授权或委托任何其他网站受理作者投稿,谨防诈骗。欢迎广大读者订阅。全国各地邮局均可订阅,邮发代号 46-225。每月 20 日出版,定价为每册 5.00 元,全年 60 元。如错过邮局订阅时间,可直接向编辑部订购。请将款项汇入开户银行:广州市建行昌岗路支行,账号:44001430402050202779,户名:南方医科大学口腔医院,并且将订阅者的邮政编码、详细地址、姓名、联系电话、订阅年度、份数及汇款回执扫描件发送至本刊邮箱(kqjbfz@vip.126.com)。编辑部电话:020-84403311,Email:kqjbfz@vip.126.com。