

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01070

· 论 著 ·

## 富血小板血浆与血小板裂解液对大鼠骨髓间充质干细胞增殖影响的比较

郭 静<sup>1</sup>, 勾向博<sup>2</sup>, 张文丽<sup>1</sup>, 李琪佳<sup>1</sup>, 王志强<sup>3\*</sup>

1. 河北联合大学医学实验研究中心, 唐山 063000

2. 河北联合大学基础医学院药理学教研室, 唐山 063000

3. 河北联合大学附属医院骨科, 唐山 063000

**[摘要]** **目的** 通过对比分析富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)与血小板裂解液(platelet lysate, PL)对体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)生长增殖、细胞周期的作用,探讨二者对大鼠BMSCs生长增殖的影响。**方法** 取20只4周龄SD大鼠,采用全骨髓分离培养法扩增传代BMSCs,并采用流式细胞仪鉴定;另取30只12周龄SD大鼠心内采血,梯度离心法获得PRP,采用3次离心结合反复冻融法制备PL。取生长状态良好的第3代BMSCs进行实验,根据培养基成分不同将实验分为7组,普通完全培养基组(A组)、1%PRP条件培养基组(B组)、1%PL条件培养基组(C组)、5%PRP条件培养基组(D组)、5%PL条件培养基组(E组)、10%PRP条件培养基组(F组)及10%PL条件培养基组(G组)。MTT检测BMSCs增殖情况;免疫荧光检测BMSCs中增殖细胞核抗原(PCNA)的表达情况;流式细胞仪检测BMSCs细胞周期的变化;蛋白质印迹检测CyclinD1和p27 Kip1蛋白表达。**结果** 培养24、48、72 h时,1%、5%、10%PRP与1%、5%、10%PL条件培养基组均可以促进BMSCs的增殖,并具有时间、剂量依赖性( $P < 0.05$ );相同浓度的PRP与PL对BMSCs增殖作用的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。免疫荧光检测显示,PRP与PL均可以促进PCNA蛋白表达( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性( $P < 0.01$ )。流式细胞仪检测显示,不同浓度PRP及PL条件培养基组与普通完全培养基组比较, $G_0/G_1$ 期细胞比例逐渐减少, $S/G_2/M$ 期细胞比例逐渐增多,增殖指数(PI)升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),并呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );然而,相同浓度的PRP及PL对BMSCs细胞周期的影响相似,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。蛋白质印迹检测结果显示,5%PRP与5%PL能促进CyclinD1表达上调和p27 Kip1表达下调。**结论** 不同浓度PRP与PL能够通过上调CyclinD1以及抑制p27 Kip1蛋白的表达,加快体外培养的大鼠BMSCs的细胞周期进程,促进BMSCs增殖,并呈现显著的时间、剂量依赖性;BMSCs增殖过程中,相同浓度PL与PRP的促增殖效果相同,PL可能代替PRP促进骨缺损修复。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;富血小板血浆;血小板裂解液;组织工程;细胞周期;细胞增殖**[中图分类号]** R 329.29**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)10-1070-08

### Effects of platelet rich plasma and platelet lysate on proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells: a comparative study

GUO Jing<sup>1</sup>, GOU Xiang-bo<sup>2</sup>, ZHANG Wen-li<sup>1</sup>, LI Qi-jia<sup>1</sup>, WANG Zhi-qiang<sup>3\*</sup>

1. Medical Experimental and Research Center, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China

2. Department of Pharmacology, College of Basic Medical Sciences, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China

3. Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China

**[Abstract]** **Objective** To compare the effects of platelet rich plasma (PRP) and platelet lysate (PL) on proliferation and cell cycle of cultured rat bone marrow stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were obtained from twenty 4-week-old SD rats using the whole bone marrow isolation and cultivation method and were identified with flow cytometry. Blood samples were taken from the hearts of thirty 12-week-old SD rats and gradient centrifugation was used to prepare PRP, and PL was obtained after three times of centrifugation and repeated freezing and thawing. The third generation of BMSCs with good growth state

**[收稿日期]** 2013-07-02**[接受日期]** 2013-07-22**[基金项目]** 唐山市科技局重点实验室建设项目(10140201A-12). Supported by Key Laboratory Construction Project of Tangshan Science and Technology Bureau (10140201A-12).**[作者简介]** 郭 静, 硕士, 讲师, E-mail: guojing\_email@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0315-3726369, E-mail: wzhqde@163.com

were divided into seven groups according to different culture media: ordinary complete medium (A group), 1% PRP-conditioned medium (B group), 1% PL-conditioned medium (C group), 5% PRP-conditioned medium (D group), 5% PL-conditioned medium (E group), 10% PRP-conditioned medium (F group), and 10% PL-conditioned medium (G group). The proliferation of BMSCs was assessed by MTT assay. The PCNA protein expression was assessed by immunofluorescence method. Cell cycle of BMSCs was tested by flow cytometry. Western blotting analysis was used to analyze CyclinD1 and p27 Kip1 protein expression of BMSCs. **Results** The proliferation of BMSCs was significantly promoted by 1%, 5%, 10% PRP- and 1%, 5%, 10% PL-conditioned media after cultured for 24 h, 48 h, and 72 h in a time- and dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ), with the effect of PRP and PL being similar at the same concentration ( $P > 0.05$ ). Immunofluorescence assay showed that PRP and PL both significantly promoted PCNA protein expression in a dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Flow cytometry showed that different concentrations of PRP- and PL-conditioned media, compared with the ordinary complete medium, resulted in gradually reduced cells in  $G_0/G_1$  phase, gradually increased cells in S,  $G_2/M$  phase, and significantly increased PI ( $P < 0.05$ ), with the changes in a dose-dependent manner. However, the effects of the same concentration of PRP and PL on cell cycle were not significantly different ( $P > 0.05$ ). Western blotting analysis showed that 5% PRP and 5% PL significantly up-regulated CyclinD1 and down-regulated the expression of p27 Kip1. **Conclusion** Different concentrations of PL and PRP can accelerate cell cycle progression of cultured rat BMSCs by up-regulation CyclinD1 and inhibiting p27 Kip1, promoting the proliferation of BMSCs in a time- and dose-dependent manner. PL and PRP at the same concentration have the same proliferation-promoting effect, indicating that PL may be used as an alternative of PRP to promote the repair of bone defects.

[**Key words**] bone marrow mesenchymal stem cells; platelet-rich plasma; platelet lysate; tissue engineering; cell cycle; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10):1070-1077]

近年来, 血液系统不同成分在骨再生和修复过程中所发挥的重要作用引起越来越多的关注。已有众多研究关注凝血机制与骨再生修复之间的联系以及血小板成分对骨再生的促进作用<sup>[1-2]</sup>。创伤等原因激发了凝血机制后, 被激活的血小板将释放出多种生物活性物质, 如凝血因子、促血管活性因子和生长因子等, 对早期伤口愈合和组织修复起着重要的调节作用<sup>[3]</sup>。富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 是通过梯度离心自体全血后而得到的血液制品, 其本质是血小板的浓缩物, 含有大量的生长因子。研究表明, 不但血小板及其细胞成分具有促丝裂原作用, 而且血小板裂解后的上清液同样可显著促进成骨细胞的增殖<sup>[4-5]</sup>。血小板裂解液 (platelet lysate, PL) 是 PRP 经细胞裂解后进一步提纯的产物, 不仅去除了残余细胞结构, 降低了免疫原性, 而且还保留了其中的多种生长因子, 可为异体或异种移植创造条件<sup>[6]</sup>。因此, 如作为构建组织工程骨的潜在选择, PL 可能有比 PRP 更优越的应用前景。本研究旨在利用大鼠全骨髓体外培养的骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs), 检测在不同浓度 PRP 和 PL 条件培养基培养下, BMSCs 增殖及生长周期变化情况, 分析 PRP 与 PL 促进体外培养的大鼠 BMSCs 生长增殖效果, 为

临床治疗骨损伤与修复提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器 4 周龄 SD 大鼠 20 只, 体质量 80~100 g, 雌雄不限; 12 周龄 SD 大鼠 30 只, 体质量 250~300 g, 雌雄不限, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK (京) 2005-0013。

低糖 DMEM 干粉 (Gibco 公司, 美国); 胎牛血清 (中国医学科学院血液病研究所科技公司); MTT (Sigma 公司, 美国); 增殖细胞核抗原 (PCNA) 多克隆抗体工作液 (福州迈新生物技术开发有限公司); FITC 标记的山羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司); CD34、CD44、CD45、CD90、CD14、CD29、CD105、HLA-DR (BD 公司, 美国);  $\beta$ -actin、CyclinD1 和 p27 Kip1 单克隆抗体 (Cell Signaling 公司, 美国)。生物安全柜 (海尔集团有限公司); 倒置相差显微镜 (Nikon 公司, 日本); 酶标仪 (Bio-Rad 公司, 美国); FACS Calibur 型流式细胞仪 (BD 公司, 美国); FV1000 激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司, 日本)。

1.2 大鼠 BMSCs 分离培养 4 周龄 SD 大鼠断颈处死, 无菌条件下取双侧股骨和胫骨, 剥离两端软骨并显露骨髓腔, 用含双倍双抗 (青、链霉素) 的

DMEM培养基反复冲洗骨髓腔,直至髓腔发白为止。将骨髓悬液以1 000 r/min离心10 min(离心半径为12 cm),弃上清后加入含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的完全培养基反复吹打制成单细胞悬液,放入37℃、含5% CO<sub>2</sub>饱和湿度孵箱中培养。原代接种后48 h首次全量换液,以后每隔2~3 d换液,倒置相差显微镜观察细胞形态,待原代细胞长满瓶底90%时传代培养。

1.3 PRP制备 12周龄SD大鼠15只,0.2%戊巴比妥钠麻醉,每只大鼠心内采血7~8 mL,3.8%柠檬酸钠抗凝,室温下150×g离心10 min。取上清和血小板层细胞室温下1 500×g再次离心10 min,吸弃管内上层3/4上清液,将剩余液体摇匀即为PRP,0.22 μm无菌滤膜过滤备用,储存于-80℃冰箱中。在加入细胞培养基之前,将PRP与10%氯化钙(1 mL氯化钙内含1 000 U凝血酶)10:1比例混合。

1.4 PL制备 参照Soffer等<sup>[7]</sup>方法,采用3次离心结合反复冻融法制备PL。另取12周龄SD大鼠15只,按上述方法制备的PRP连续反复冻融(-80℃/37℃)3次,每次间隔约10 min,于4℃以8 000×g离心30 min,去除血小板膜和其他细胞残片后,取上清液0.22 μm无菌滤膜过滤,-80℃冻存备用。

1.5 实验分组 根据培养基成分不同将实验分为以下7组:普通完全培养基组(A组)为L-DMEM培养基、10%FBS;1%PRP条件培养基组(B组)为L-DMEM、10%FBS及1%PRP;1%PL条件培养基组(C组)为L-DMEM、10%FBS及1%PL;5%PRP条件培养基组(D组)为L-DMEM、10%FBS及5%PRP;5%PL条件培养基组(E组)为L-DMEM、10%FBS及5%PL;10%PRP条件培养基组(F组)为L-DMEM、10%FBS及10%PRP;10%PL条件培养基组(G组)为L-DMEM、10%FBS及10%PL。1%、5%、10%代表体积分数。

## 1.6 观测指标

1.6.1 细胞形态学观察 取对数生长期的第3代BMSCs,按每瓶 $4 \times 10^4$ 个数量接种于7个50 mL培养瓶中,分别加入7组培养基中连续培养,每2 d换液1次,倒置相差显微镜下持续动态观察细胞形态变化和生长状况。

1.6.2 BMSCs鉴定 对数生长期的第3代BMSCs分别于7组培养基培养48 h,用含0.25%胰酶的消化液消化,以1 500 r/min(离心半径10 cm)离心10 min后,每组分别取 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞,以100 mL PBS重悬细胞,加入荧光标记抗体CD34-FITC、CD44-FITC、CD45-PE、CD90-PE、CD14-FITC、CD29-FITC、CD105-PE和HLA-DR-FITC,用抗大鼠FITC-IgG及抗大鼠PE-IgG作同型对照;室温避光放置30 min,4℃预冷的PBS冲洗3次,300 μL PBS重悬细胞。流式细胞仪检测,以配套Cellquest软件分析阳性细胞百分比。

1.6.3 MTT检测细胞增殖 取生长状态良好、对数生长期的第3代BMSCs常规消化后,细胞计数板调整细胞密度为 $1 \times 10^4$ 个/mL,接种于3块96孔培养板,每孔细胞体积为200 μL,置于37℃、含5% CO<sub>2</sub>饱和湿度孵箱中培养24 h后弃上清,按实验设计分别予以7组培养基培养,每组重复6孔。以等量的无血清培养基为阴性对照,以未加细胞的孔为空白对照。分别于24、48、72 h后各取出一块板,每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL),37℃继续孵育4 h,终止培养。小心吸弃孔内上清液,每孔再加入200 μL DMSO,避光振荡15 min,使结晶物充分溶解。全自动酶标仪测定490 nm波长处各孔光密度(D)值,取均值。

1.6.4 PCNA蛋白表达 取生长状态良好的第3代BMSCs,胰蛋白酶消化后以 $3 \times 10^4$ 个/孔密度接种于孔底预先置入无菌盖玻片的6孔板,分别以7组培养基培养48 h后,PBS洗涤3次,用4%多聚甲醛固定40 min后,PBS冲洗,每组各取6张细胞爬片进行免疫细胞荧光染色检测PCNA表达。细胞爬片滴加50 μL 0.1% Triton X-100室温下孵育15 min,PBS冲洗后滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温下孵育10 min,PBS冲洗后加入50 μL 5%正常山羊血清封闭液室温下孵育20 min,甩干后滴加50 μL PCNA多克隆抗体,4℃湿盒过夜;PBS代替一抗作为阴性对照。PBS冲洗后滴加浓度为1:50的FITC标记的山羊抗兔IgG,37℃孵育30 min,PBS冲洗后甘油封片,激光扫描共聚焦显微镜下观察,用波长为488 nm氩离子激光激发FITC荧光染料产生绿色荧光,于相同的取图参数下扫描各组BMSCs的PCNA蛋白表达,用共聚焦显微镜应用分析软件FV10-ASW对各组PCNA表达图像进行D值

测定, 每张细胞爬片随机选取 5 个高倍视野( $\times 400$ ), 取其均值作为蛋白颗粒密度。

1.6.5 流式细胞术检测细胞周期变化 取对数生长期的第 3 代 BMSCs 经无血清培养基同步化培养 24 h 后, 分别于 7 组培养基培养 48 h, 收集各组细胞, 弃培养液, 用含 0.25% 胰酶的消化液消化并收集消化下来的细胞, 用 PBS 调整密度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 用 4℃ 预冷的 70% 乙醇固定 48 h, 离心后弃上清, PBS 漂洗 3 次, 弃上清, 37℃ 以 200  $\mu$ L 浓度为 1 mg/mL 的 RNA 酶处理 30 min, 加入 0.5 mL 浓度为 10 mg/mL 的碘化丙啶(PI)4℃ 避光染 30 min, 上流式细胞仪检测细胞周期, 用其自带 Multicycle 软件分析  $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$  期细胞比例, 实验重复 3 次。计算增殖指数 (proliferation index, PI) 表示细胞增殖活性。PI =  $(S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M)$ 。

1.6.6 蛋白质印迹检测 CyclinD1 和 p27 Kip1 蛋白表达 对数生长期的第 3 代 BMSCs, 分别于 A、D、E 三组培养基培养 48 h, 提取每组细胞总蛋白, 并测定蛋白含量, 行 SDS-PAGE、转膜、封闭, 加入一抗 (以  $\beta$ -actin 作为内参), 4℃ 过夜, 用 TBST 洗膜, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 清洗后进行化学发光、显影和定

影, 采用 Quantity One 软件进行分析。实验重复测量 3 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 BMSCs 形态学观察 BMSCs 原代培养 2 d 呈梭形或短棒性, 部分伸出伪足(图 1A); 7 d 形成细胞集落, 大部分细胞伸出伪足, 呈多角形(图 1B); 传代后细胞形态单一, 第 3 代细胞形态基本趋于长梭形或成纤维细胞样, 有突起, 漩涡状密集生长, 增殖活跃(图 1C)。

各组培养基培养 48 h 后, 倒置相差显微镜下观察 BMSCs 形态无明显差异, 均呈长梭状, 有较长突起, 紧密排列, 类似于成纤维细胞形态(图 1D~1H)。10% PRP 及 10% PL 条件培养基组与其他培养基组相比, BMSCs 生长速度明显增快(图 1G、1H), 5% PRP 及 5% PL 条件培养基组次之(图 1E、1F)。

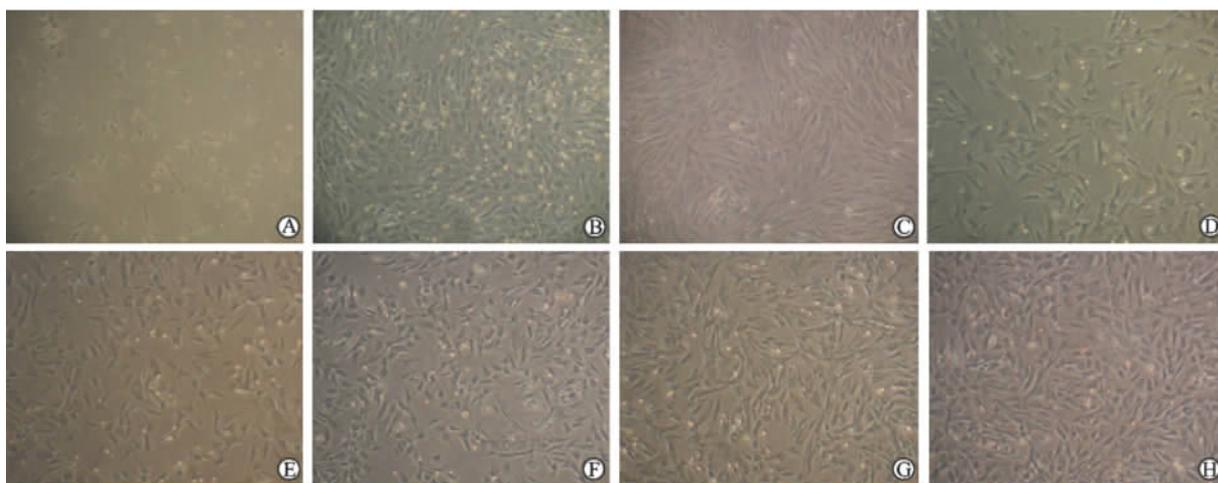


图 1 骨髓间充质干细胞形态学观察

Fig 1 Morphological observation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs)

A: Primary BMSCs cultured for 2 days; B: Primary BMSCs cultured for 7 days; C: BMSCs at passage 3 cultured for 4 days; D: Ordinary medium cultured for 48 hours; E: 5% platelet rich plasma-conditioned medium cultured for 48 hours; F: 5% platelet lysate-conditioned medium cultured for 48 hours; G: 10% platelet rich plasma-conditioned medium cultured for 48 hours; H: 10% platelet lysate-conditioned medium cultured for 48 hours. Original magnification:  $\times 100$

2.2 BMSCs 鉴定 流式细胞仪分析结果显示, 各组培养基培养的第 3 代 BMSCs 均高表达特异性标记 CD44、CD90、CD29、CD105, 而不表达造血系干细

胞表面标记 CD34、CD45、CD14 及 HLA-DR。

2.3 MTT 检测 培养 BMSCs 24 h 时与 A 组比较, D~G 组  $D$  值均增加, 差异有统计学意义 ( $P <$

0.05),即 5%、10%PRP 与 5%、10%PL 条件培养基可以促进 BMSCs 的增殖;培养 48、72 h 时与 A 组比较,B~G 各组 *D* 值均增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),即 1%、5%、10%PRP 与 1%、5%、10% PL 条件培养基均可以促进 BMSCs 的增殖。并且,PRP 与 PL 的增殖效应具有一定的时间、剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ),相同浓度的 PRP 与 PL 对 BMSCs 增殖作用的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 2。

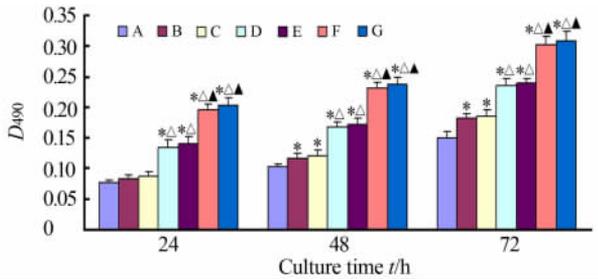


图 2 各时间点 MTT 检测各组细胞 *D* 值结果

Fig 2 MTT absorbance value of the cells in each group

PRP: Platelet rich plasma; PL: Platelet lysate. A: Ordinary complete medium group; B: 1% PRP-conditioned medium group; C: 1% PL-conditioned medium group; D: 5% PRP-conditioned medium group; E: 5% PL-conditioned medium group; F: 10% PRP-conditioned medium group; G: 10% PL-conditioned medium group. \*  $P < 0.05$  vs A group;  $\Delta P < 0.05$  vs B or C group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs D or E group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.4 PCNA 蛋白表达检测 PCNA 蛋白阳性表达产物分布于胞核,免疫荧光染色后,胞核呈现绿色荧光颗粒或明亮的绿色荧光团块。阴性对照无阳性表达(图 3A~3G)。激光扫描共聚焦显微镜检测 A~G 组 PCNA 蛋白表达的 *D* 值依次为  $93.62 \pm 8.74$ 、 $115.46 \pm 9.24$ 、 $118.29 \pm 11.77$ 、 $163.59 \pm 10.92$ 、 $167.38 \pm 12.69$ 、 $221.84 \pm 15.17$ 、 $226.95 \pm 15.36$ 。对各组 *D* 值进行统计学分析可见,B~G 各组细胞表达的 PCNA 较 A 组增强,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );并且,随 PRP 与 PL 浓度的增加 PCNA 蛋白表达量增多 ( $P < 0.01$ );而相同浓度的 PRP 与 PL 条件培养基组间 PCNA 蛋白表达差异则均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.5 流式细胞仪检测细胞周期变化 对各组中  $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$  期细胞比例进行统计学分析,结果显示:不同浓度 PRP 及 PL 条件培养基组与普通完全培养基组(A 组)比较, $G_0/G_1$  期细胞比例逐渐减少,S、 $G_2/M$  期细胞比例逐渐增多,增殖指数(PI)升高,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。并且,PRP 及 PL 对 BMSCs 细胞周期中各期的细胞比例以及 PI 的影响具有剂量依赖性 ( $P < 0.05$ );然而,相同浓度的 PRP 及 PL 对 BMSCs 细胞周期的影响相似,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

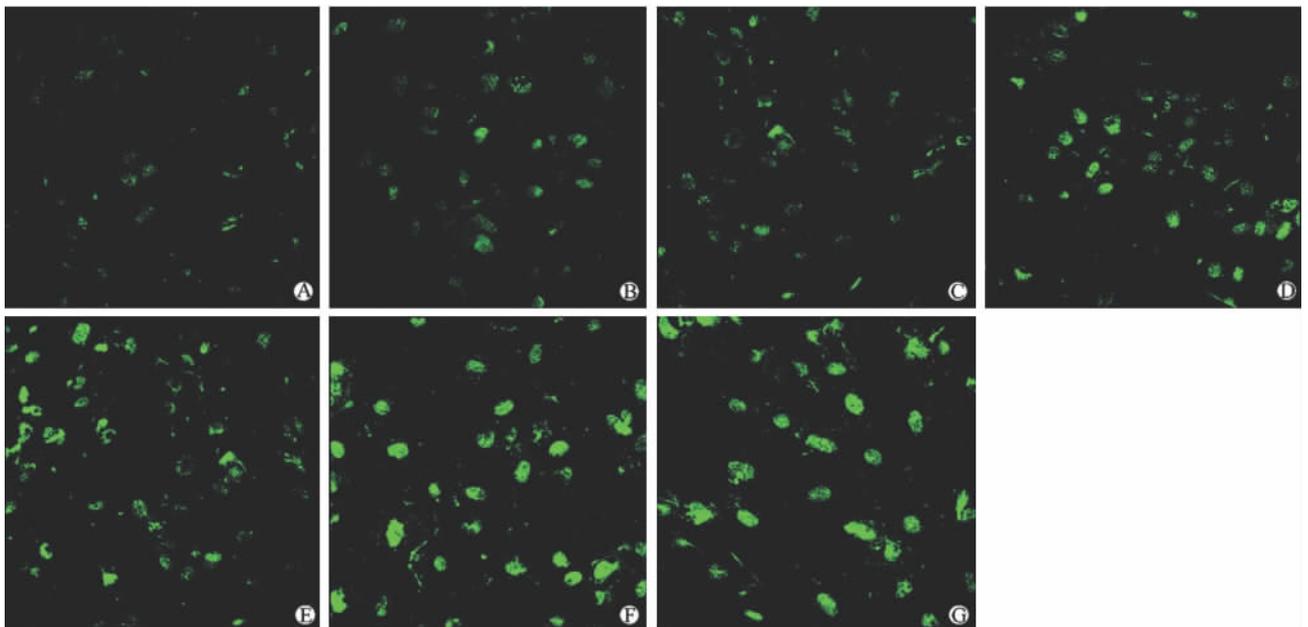


图 3 激光扫描共聚焦显微镜检测各组增殖细胞核抗原蛋白表达

Fig 3 Expression of proliferating cell nuclear antigen protein as detected by laser scanning confocal microscope in 7 groups

PRP: Platelet rich plasma; PL: Platelet lysate; A: Ordinary complete medium group; B: 1%PRP-conditioned medium group; C: 1%PL-conditioned medium group; D: 5%PRP-conditioned medium group; E: 5%PL-conditioned medium group; F: 10% PRP-conditioned medium group; G: 10%PL-conditioned medium group. Original magnification:  $\times 400$

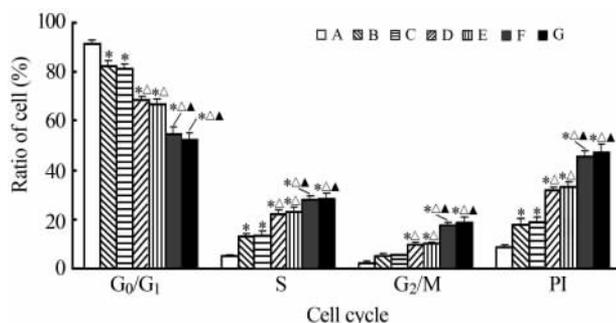


图 4 流式细胞仪检测各组细胞周期分布

Fig 4 Flow cytometry detection of cell cycle of bone marrow mesenchymal stem cells in each group

PRP: Platelet rich plasma; PL: Platelet lysate; PI: Proliferation index. A: Ordinary complete medium group; B: 1% PRP-conditioned medium group; C: 1% PL-conditioned medium group; D: 5% PRP-conditioned medium group; E: 5% PL-conditioned medium group; F: 10% PRP-conditioned medium group; G: 10% PL-conditioned medium group. \*  $P < 0.05$  vs A group;  $\Delta P < 0.05$  vs B or C group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs D or E group.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.6 蛋白质印迹检测 CyclinD1 和 p27 Kip1 蛋白表达 BMSCs 分别于 A、D、E 三组培养基培养 48 h 后, 结果见图 5。与 A 组相比, D、E 组 (5% PRP 与 5% PL 条件培养基组) 的细胞周期相关蛋白 CyclinD1 表达增高, 而 p27 Kip1 表达降低。

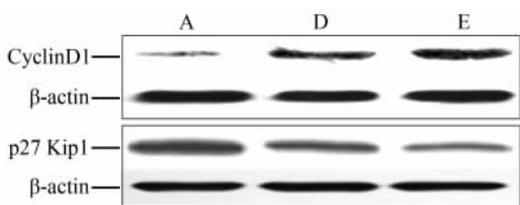


图 5 蛋白质印迹检测 CyclinD1 和 p27 Kip1 蛋白表达

Fig 5 Western blotting analysis of CyclinD1 and p27 Kip1 protein expression

PRP: Platelet rich plasma; PL: Platelet lysate. A: Ordinary complete medium group; D: 5% PRP-conditioned medium group; E: 5% PL-conditioned medium group

### 3 讨论

种子细胞、支架材料和组织构建是骨组织工程的三要素。理想的种子细胞应具有取材方便、扩增能力强、表型稳定等特点<sup>[8-10]</sup>。BMSCs 来源于中胚层, 具有良好的多向分化潜能, 在体外不同培养条件

下可以诱导成各种组织细胞, 如内皮细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成骨细胞、肌肉细胞及神经细胞等。因其具有干细胞的共性和很强的自我增殖能力、取材方便、涉及伦理问题较少和对机体损伤小的特点, 近年来成为组织工程研究的热点种子细胞<sup>[11-12]</sup>。

生长因子在骨组织修复中一直是研究的热点, PRP 内含多种自体生长因子而广泛应用于骨组织修复。PRP 作用的发挥有赖于其浓缩血小板脱颗粒后产生高浓度的各类生长因子及纤维蛋白原所形成的纤维网状支架, 这些因子包括血小板源性生长因子、转化生长因子- $\beta$ 、血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子等, 是诱导组织生长所不可或缺的, 纤维蛋白原所形成的纤维网状支架可支持生长因子所诱导生成的新生组织。有关 PRP 的实验表明, 不但血小板及其细胞成分具有促丝裂原作用, 对多种细胞活性和组织修复也有显著的促进作用<sup>[13-14]</sup>。但因 PRP 存在较强的免疫原性, 目前多用于自体移植<sup>[15-16]</sup>。PL 是凝血机制被激发后, 被激活的血小板进一步裂解后所获得的液体成分, 是 PRP 经细胞裂解后衍生而来, 不仅去除了残余细胞结构, 降低了免疫原性, 而且还保留了其中的多种液态生长因子。因此, PL 能够促进各种细胞的分裂和增殖、增加胶原合成、激发血管长入和诱导细胞分化, 对骨的修复与再生至关重要, 为用于异体或异种移植创造条件<sup>[17-20]</sup>。本实验通过 MTT 法证实, 各组培养基培养 BMSCs 48 h 时, 1%、5%、10% PRP 与 1%、5%、10% PL 条件培养基均可以促进 BMSCs 的增殖, 而且其增殖效应呈一定的时间和剂量依赖性, 相同浓度的 PRP 与 PL 对 BMSCs 增殖效果相同。并且倒置相差显微镜下观察到各组 BMSCs 形态无明显差异, 均呈长梭状, 有较长突起, 紧密排列, 类似于成纤维细胞形态。

PCNA 是一种仅在增殖细胞中合成和表达的相对分子质量为 36 000 的多肽。在增殖细胞中的含量变化有明显的周期性, 在 G<sub>0</sub> 期基本无表达, G<sub>1</sub> 晚期开始增加, 在 S 期达高峰, G<sub>2</sub> 期迅速下降, 这种变化恰好与细胞内 DNA 复制的时相变化相一致。作为增殖期细胞的标记物, 是一种优于溴化脱氧尿嘧啶等测定细胞增殖能力的方法。本实验采用免疫荧光检测各组 BMSCs 的 PCNA 蛋白表达, 结果表明: 随 PRP 与 PL 浓度的增加, PCNA 蛋白表达量明显

增多,呈现一定的剂量依赖性,而相同浓度的 PRP 与 PL 条件培养基组间 PCNA 蛋白表达量差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。进一步证明相同浓度的 PL 与 PRP 对体外培养的 BMSCs 增殖作用相同。

细胞周期和细胞增殖是细胞生物学行为的两个重要方面,细胞增殖是靠细胞周期来推动的。本实验通过流式细胞术对各组细胞周期测定结果,更进一步证明了 PRP 及 PL 促进体外培养的 BMSCs 的增殖作用:与普通完全培养基组比较,经过 1%、5%、10% PRP 与 1%、5%、10% PL 条件培养基孵育后,随着 PRP 及 PL 作用于 BMSCs 浓度的增加,处于  $G_0/G_1$  期的细胞比例逐渐减少,相反处于 S 期以及  $G_2/M$  的细胞比例则大幅提高,PI 升高,呈现明显的剂量依赖性。这说明不同浓度的 PRP 与 PL 缩短了 BMSCs 由  $G_0/G_1$  期到 S 期,继而进入  $G_2/M$  期的进程,即 PRP 与 PL 可促进 BMSCs 通过  $G_1/S$  及  $S/G_2$  期限制点,能够加快细胞周期进程,从而促进了 BMSCs 的增殖。然而,1% PRP 与 1% PL、5% PRP 与 5% PL 及 10% PRP 与 10% PL 条件培养基组之间, $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$  期细胞比例以及 PI 间差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),证明相同浓度的 PL 与 PRP 对 BMSCs 细胞周期的影响效果一样。作为承载多因子的复杂体系,PL 或 PRP 所发挥的作用并不等同于单因子作用的简单叠加,而有赖于多种因子之间的网络调节<sup>[21]</sup>。Ben Azouna 等<sup>[22]</sup> 研究发现,人血小板裂解液(HPL)不仅可以维持人 BMSCs 的免疫表型,而且能够促进人 BMSCs 的成骨、成脂、成软骨及成血管平滑肌等细胞谱系的分化能力,并且 HPL 对人 BMSCs 强大的促增殖作用可以替代 FBS 在体外快速扩增至临床所需数量的 BMSCs。

我们进一步检测了 PRP 与 PL 对细胞周期相关蛋白的作用,对比蛋白质印迹检测结果,发现与普通完全培养基组比较,5% PRP 与 5% PL 条件培养基组细胞中显示出 CyclinD1 表达上调和 p27 Kip1 表达下调。细胞周期分布具有严格的调控机制,细胞周期调控蛋白在调节与控制细胞周期进程中发挥关键的作用。Cyclin 蛋白是一类重要的细胞周期调控蛋白,在 Cyclin 家族中,CyclinD1 蛋白的主要功能是促进细胞增殖,在调节细胞由  $G_0/G_1$  期到 S 期转变中起到至关重要的作用<sup>[23-24]</sup>。而 p27 Kip1 作为细胞周期的负调控因子,具有阻止细胞通过  $G_1/S$

期转换的作用,从而抑制细胞的增殖<sup>[25-26]</sup>。因此,PRP 与 PL 通过上调 CyclinD1,并且抑制 p27 Kip1 蛋白的表达,从而促进 BMSCs 由  $G_0/G_1$  期向 S 期转变,加快了细胞周期的进程。此结果与 MTT、PCNA 蛋白表达及细胞周期测定结果相一致。

综上所述,本研究证明 PRP 与 PL 能够通过上调 CyclinD1 以及抑制 p27 Kip1 蛋白的表达,加快体外培养的大鼠 BMSCs 的细胞周期进程,促进 BMSCs 增殖,并呈现显著的时间、剂量依赖性;然而相同浓度的 PRP 及 PL 对 BMSCs 的促增殖作用相同,表明 PL 可能代替 PRP 促进骨缺损修复。PL 在去除血小板表面抗原的基础上承载了大量生长因子,制备容易,可能成为用于骨组织工程中生长因子的重要来源,可作为构建组织工程骨的潜在选择,将会在成骨不全等骨组织缺陷或损伤疾病的治疗与修复中发挥作用。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Soffer E, Ouhayoun J P, Meunier A, Anagnostou F. Effects of autologous platelet lysates on ceramic particle resorption and new bone formation in critical size defects: the role of anatomical sites[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006, 79: 86-94.
- [2] Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y, Izumi Y. Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation[J]. J Periodontal Res, 2006, 41: 455-462.
- [3] Bhanot S, Alex J C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery[J]. Facial Plast Surg, 2002, 18: 27-33.
- [4] Gruber R, Varga F, Fischer M B, Watzek G. Platelets stimulate proliferation of bone cells; involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes[J]. Clin Oral Implants Res, 2002, 13: 529-535.
- [5] Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer M B, Watzek G. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells[J]. J Orthop Res, 2003, 21: 941-948.
- [6] Centeno C J, Schultz J R, Cheever M, Freeman M, Faulkner S, Robinson B, et al. Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-ex-

- panded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2011, 6:368-378.
- [7] Soffer E, Ouhayoun J P, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2004, 15:581-588.
- [8] Zhao Q, Qian J, Zhou H, Yuan Y, Mao Y, Liu C. *In vitro* osteoblast-like and endothelial cells' response to calcium silicate/calcium phosphate cement[J]. *Biomed Mater*, 2010, 5:35004.
- [9] Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering; basic science to clinical translation[J]. *Int Biochem Cell Biol*, 2011, 43:286-289.
- [10] Lee W D, Hurtig M B, Kandel R A, Stanford W L. Membrane culture of bone marrow stromal cells yields better tissue than pellet culture for engineering cartilage-bone substitute biphasic constructs in a two-step process[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17:939-948.
- [11] Unger R E, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated *in vitro* with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature[J]. *Biomaterials*, 2010, 31:6959-6967.
- [12] Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells; a user's guide[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19:1449-1470.
- [13] Lucarelli E, Fini M, Becheroni A, Giavaresi G, Di Bella C, Aldini N N, et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, 435:62-68.
- [14] Yokota K, Ishida O, Sunagawa T, Suzuki O, Nakamae A, Ochi M. Platelet-rich plasma accelerated surgical angiogenesis in vascular-implanted necrotic bone; an experimental study in rabbits[J]. *Acta Orthop*, 2008, 79:106-110.
- [15] Lee CY, David T, Nishime M. Use of platelet-rich plasma in the management of oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw; a report of 2 cases[J]. *J Oral Implantol*, 2007, 33:371-382.
- [16] Kinoshita K, Hibi H, Yamada Y, Ueda M. Promoted new bone formation in maxillary distraction osteogenesis using a tissue-engineered osteogenic material[J]. *J Craniofac Surg*, 2008, 19:80-87.
- [17] Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate[J]. *Biomaterials*, 2010, 31:270-278.
- [18] Dozza B, Di Bella C, Lucarelli E, Giavaresi G, Fini M, Tazzari P L, et al. Mesenchymal stem cells and platelet lysate in fibrin or collagen scaffold promote non-cemented hip prosthesis integration[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29:961-968.
- [19] Salvade A, Della Mina P, Gaddi D, Gatto F, Villa A, Bigoni M, et al. Characterization of platelet lysate cultured mesenchymal stromal cells and their potential use in tissue-engineered osteogenic devices for the treatment of bone defects[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16:201-214.
- [20] Ranzato E, Boccafoschi F, Mazzucco L, Patrone M, Burlando B. Role of ERK1/2 in platelet lysate-driven endothelial cell repair[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110:783-793.
- [21] Lange C, Cakiroglu F, Spiess A N, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander A R. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213:18-26.
- [22] Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, Berraies L, Ben Othman T, Ducroq E, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow; comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3:6.
- [23] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer; a changing paradigm[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9:153-166.
- [24] Shiomi K, Kiyono T, Okamura K, Uezumi M, Goto Y, Yasumoto S, et al. CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential[J]. *Gene Ther*, 2011, 18:857-866.
- [25] Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, Caldarelli I, Cucciolla V, Tramontano A, et al. Targeting p27Kip1 protein; its relevance in the therapy of human cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15:677-693.
- [26] Hoellein A, Graf S, Bassermann F, Schoeffmann S, Platz U, Hölzlwimmer G, et al. Cks1 promotion of S phase entry and proliferation is independent of p27Kip1 suppression[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32:2416-2427.