

可注射型富血小板纤维蛋白促进人脐静脉内皮细胞成血管能力的体外实验研究

罗琳涓¹, 潘菁¹, 厉超元², 蒋备战¹

(1. 同济大学口腔医学院·同济大学附属口腔医院儿童口腔科, 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心, 上海 200072;
2. 同济大学口腔医学院·同济大学附属口腔医院种植科, 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心, 上海 200072)

【摘要】目的 探究可注射型富血小板纤维蛋白(injectable platelet-rich fibrin, iPRF)对体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)成血管分化能力的影响。**方法** CCK-8实验检测HUVECs增殖能力并筛选最佳浓度的可注射型富血小板纤维蛋白提取液(injectable platelet-rich fibrin extract, iPRFe);划痕实验和小管形成实验分别检测HUVECs迁移能力和成血管分化能力;实时定量PCR检测成血管相关基因的mRNA表达。**结果** 0.4 mg/mL浓度的iPRFe促进HUVECs增殖效果最佳;iPRFe对HUVECs迁移和小管形成有显著的促进作用,还能明显提高血管生成素(angiotensin, ANG)、C-X-C基序趋化因子受体4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4)、血小板衍生生长因子受体A(platelet-derived growth factor receptor A, PDGFRA)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达水平。**结论** iPRF可以促进HUVECs增殖、迁移和成血管能力,有望成为用于牙髓再生的新材料。

【关键词】 可注射型富血小板纤维蛋白;血管生成;人脐静脉内皮细胞;牙髓再生

【中图分类号】 R788⁺.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2023)05-0634-06

Effect of injectable platelet-rich fibrin on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells *in vitro*

LUO Linjuan¹, PAN Jing¹, LI Chaoyuan², JIANG Beizhan¹

(1. Department of Pediatric Dentistry, Stomatological Hospital and Dental School of Tongji University, Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China; 2. Department of Implantology, Stomatological Hospital and Dental School of Tongji University, Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China)

【Abstract】Objective To explore the effect of injectable platelet-rich fibrin(iPRF) on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) *in vitro*. **Methods** The proliferation ability of HUVECs was detected by the Cell Counting Kit-8(CCK-8) and the optimal concentration of iPRF extract(iPRFe) was selected. The migration ability and angiogenesis capacity of HUVECs were detected by scratch assay and tube formation assay, respectively. Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) was performed to evaluate the mRNA expressions of angiogenic genes. **Results** The iPRFe at 0.4 mg/mL had the best effect on the proliferation of HUVECs. The iPRFe significantly promoted migration and tube formation of HUVECs, and significantly increased the expressions of angiogenin(ANG), C-X-C motif chemokine receptor 4(CXCR4), platelet-derived

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(81901035);上海市卫生健康委员会科研项目(202140357)

作者简介: 罗琳涓(1997—),女,硕士. E-mail: linjuan_luo@163.com

通信作者: 蒋备战. E-mail: jiangbeizhan@tongji.edu.cn

growth factor receptor A (PDGFRA), and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Conclusion** The iPRF can promote the proliferation, migration and angiogenesis of HUVECs, and may be used as a novel material for pulp regeneration.

【Key words】 injectable platelet-rich fibrin; angiogenesis; human umbilical vein endothelial cells; dental pulp regeneration

牙髓再生是治疗牙髓感染或牙髓坏死的一种新方法,其中血管再生可以恢复牙齿的营养供应,被认为是功能性牙髓再生的关键^[1]。可注射型富血小板纤维蛋白(injectable platelet-rich fibrin, iPRF)是第二代血小板浓缩制品富血小板纤维蛋白的新型衍生物,其三维纤维蛋白支架结构中富含I型胶原,一定程度上模拟了细胞外基质的成分和结构,同时含有可以调节细胞增殖、迁移和分化行为的各种生长因子^[2-3]。此外,iPRF还在调节炎症反应、抗菌和促进成骨发生方面发挥作用^[2,4-5],其液体形态便于临床操作,可能是用于诱导牙髓再生的一种理想的支架材料。

但是目前iPRF成血管作用的相关研究较少,因此本研究利用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)探究iPRF促进血管生成的能力,为使用iPRF进行再生性牙髓治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

高糖DMEM不完全培养基、青霉素/链霉素、胰蛋白酶、PBS缓冲液、CCK-8试剂盒(凯基,中国);胎牛血清(Gibco,美国);钙黄绿素(Sigma,美国);Matrigel基质胶、细胞培养皿、离心管、细胞培养板(Coring,美国);滤器(Millipore,日本);血管生成载玻片(ibidi,意大利);TRIzol细胞裂解液、RNA逆转录试剂盒(TaKaRa,日本);低温离心机(Thermo,美国);倒置显微镜(Nikon,日本)。

1.2 可注射型富血小板纤维蛋白提取液(injectable platelet-rich fibrin extract, iPRFe)的制备

本实验经过同济大学伦理委员会批准(伦理审查编号:[2021]-DW-70),所有志愿者知情同意。根据已经报道的实验方案^[6],抽取5名健康男性志愿者(年龄18~35岁,不吸烟,不喝酒,无血液系统疾病,近期没有服用影响血液系统的药物)10 mL静脉血,在4℃条件下离心(离心半径10 cm,700 r/min,3 min),吸取上层黄色液态物质即为iPRF。参考课题组前期研究方案并进行改良^[7],将

iPRF冻干并研磨成粉,每80 mg iPRF粉末用40 mL高糖DMEM不完全培养基浸提24 h。在细胞超净台中使用0.22 μm滤器过滤浸提液后得到iPRFe,保存于-20℃冰箱。

1.3 细胞培养

HUVECs从中国科学院细胞库中获得,常规培养液为添加了10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的高糖DMEM不完全培养基,置37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,每2 d更换1次培养液。

1.4 CCK-8实验检测细胞增殖能力

将iPRFe用高糖DMEM不完全培养基稀释,并添加10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素,使iPRFe的浓度分别为1.6 mg/mL、0.8 mg/mL、0.4 mg/mL和0.2 mg/mL。实验分为5组,对照组为常规培养液,实验组分别另外添加上述4种不同浓度的iPRFe,每组设置5个复孔。将HUVECs以2×10³个/孔接种于96孔板,待细胞贴壁后更换为条件培养液,置细胞培养箱中培养。分别于第1、3、5 d弃去原培养液,加入含有10% CCK-8液的100 μL高糖DMEM不完全培养基避光孵育1 h,用酶标仪测定各孔在450 nm处的吸光度值(A₄₅₀)。

1.5 划痕实验检测细胞迁移能力

实验分为2组,对照组培养液为含有1%青霉素/链霉素的高糖DMEM不完全培养基,实验组另外添加最佳浓度的iPRFe,两组培养液均不含胎牛血清,每组3个复孔。将HUVECs以1×10⁵个/mL接种于6孔板,待细胞完全融合后,用无菌枪头在孔板底部做出划痕标记,各组更换为无血清条件培养液,置细胞培养箱中培养。分别于0、12、24 h在显微镜下拍照,用Image J软件处理图像,比较各组划痕愈合情况。

1.6 小管形成实验检测细胞成血管能力

实验分组同1.5。血管生成载玻片每孔加入10 μL复温可流动的Matrigel基质胶于底部,置细胞培养箱中30 min使其凝固。调整HUVECs密度为2×10⁵个/mL,每孔加入经无血清条件培养液重悬的50 μL细胞悬液于基质胶表面,置细胞培养箱中

孵育。6 h后,弃去原培养液,每孔加入 50 μL 浓度为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的钙黄绿素,避光孵育 30 min, PBS 洗 3 次后荧光显微镜下拍照,用 Image J 软件分析各组小管形成情况。

1.7 实时定量 PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测成血管相关基因的 mRNA 表达水平

实验分组同 1.5。将 HUVECs 以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,待细胞贴壁后更换为无血清条件培养液。分别于 12、24 h 弃去原培养液, PBS 洗 3 次,每孔加入 1 mL TRIzol 裂解细胞,根据试剂盒的说明书提取总 RNA,再使用 TaKaRa 试剂盒逆转录得到 cDNA,检测血管生成素(angiotensin, ANG), C-X-C 基序趋化因子受体 4(C-X-C motif chemokine receptor 4, CXCR4), 血小板衍生生长因子受体 A (platelet-derived growth factor receptor A, PDGFRA) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 的表达水平,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参基因。所用引物序列见表 1。

表 1 用于 RT-qPCR 的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for RT-qPCR analysis

基因名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
ANG	AGATTCTCCTCCTGGG-AGCC	CCAGCACGAAGACCAAC-AAC
CXCR4	ACTACACCGAGGAAATG-GGCT	CCCACAATGCCAGTTAAG-AAGA
PDGFRA	TGGCAGTACCCCATGTC-TGAA	CCAAGACCGTCACAAAA-AGGC
VEGF	GGAGACTCTTCGAGGA-GCACTT	GGCGATTAGCAGCAGAT-ATAGAA
GAPDH	CCAGAACATCATCCCTG-CCTCT	GACGCCTGCTTACCAC-CTT

1.8 统计学处理

所有数据均进行 3 次独立实验,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,由 SPSS 20.0 软件进行 *t* 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 iPRFe 对 HUVECs 增殖能力的影响

用不同浓度的 iPRFe 处理 HUVECs 12 h 后发现,0.4 mg/mL 浓度的 iPRFe 促进细胞增殖效果最佳,0.2 mg/mL 浓度的 iPRFe 也有一定促进作用(图 1A, $P < 0.05$)。24 h 后,所有浓度的 iPRFe 对

HUVECs 增殖能力均有促进作用,其中 0.4 mg/mL iPRFe 组细胞增殖率高于 1.6 mg/mL iPRFe 组和 0.2 mg/mL iPRFe 组,差异具有统计学意义(图 1B, $P < 0.05$)。因此,0.4 mg/mL 浓度的 iPRFe 被认为是促进 HUVECs 增殖的最佳浓度,并被选择用于后续实验。

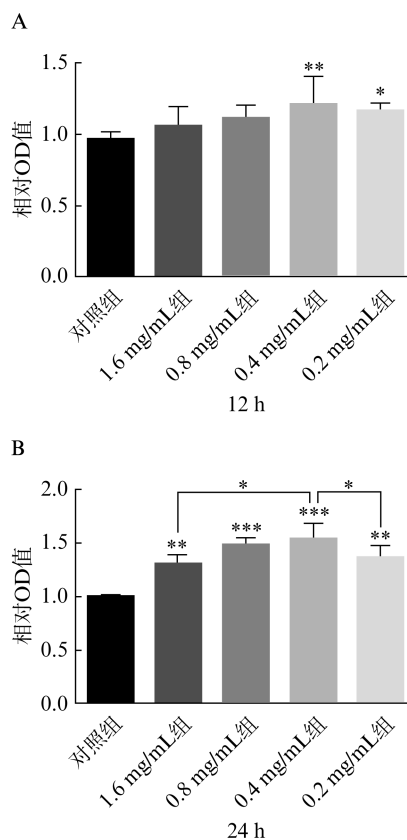


图 1 不同浓度 iPRFe 处理 12 h(A) 和 24 h(B) 后对 HUVECs 增殖能力的影响

Fig. 1 Effect of iPRFe at different concentrations on proliferation of HUVECs after 12 h(A) and 24 h(B) of treatment

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

2.2 iPRFe 对 HUVECs 迁移能力的影响

用最佳浓度的 iPRFe 处理 HUVECs,观察细胞迁移情况。如图 2 所示,培养 12 h 时,iPRFe 组的细胞迁移率均大于对照组,24 h 时差异更为显著,差异具有统计学意义(图 2, $P < 0.05$)。

2.3 iPRFe 对 HUVECs 成血管能力的影响

小管形成实验的结果显示,HUVECs 经 iPRFe 处理 6 h 后形成小管结构的连接点数、分支数、总长度和相对面积均大于对照组,差异具有统计学意义(图 3, $P < 0.05$)。同时,iPRFe 处理 12 h 和 24 h 也明显提高了 HUVECs 中成血管相关基因 ANG、CXCR4、PDGFRA 和 VEGF 的表达水平(图 4, $P < 0.05$)。

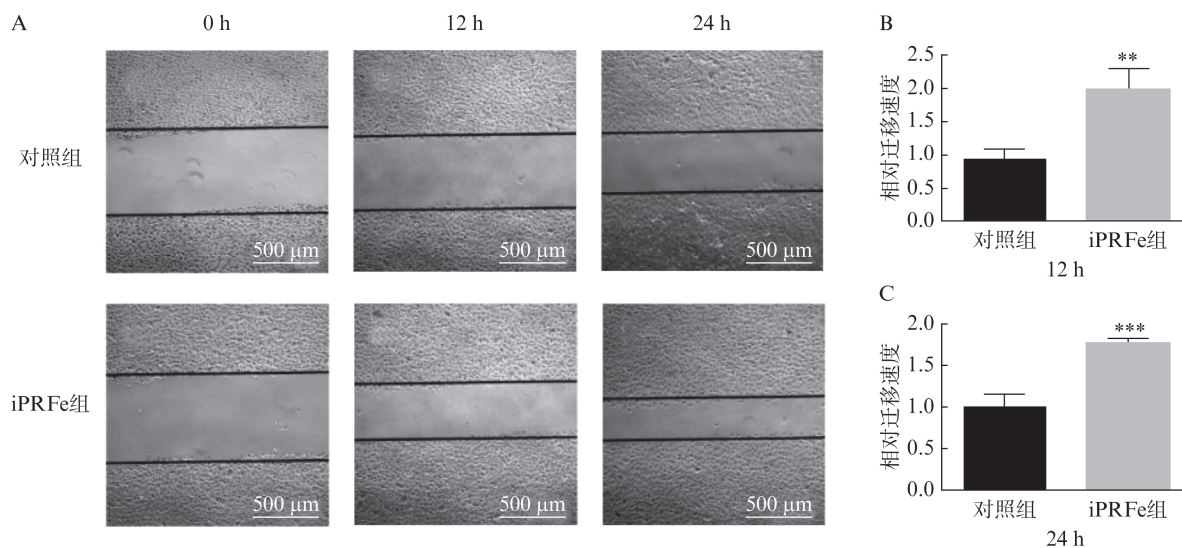


图 2 iPRFe 对 HUVECs 迁移能力的影响
Fig. 2 Effect of iPRFe on migration of HUVECs

A: 细胞迁移实验明场图片; B, C: 12 h 和 24 h 后的细胞相对迁移速度; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

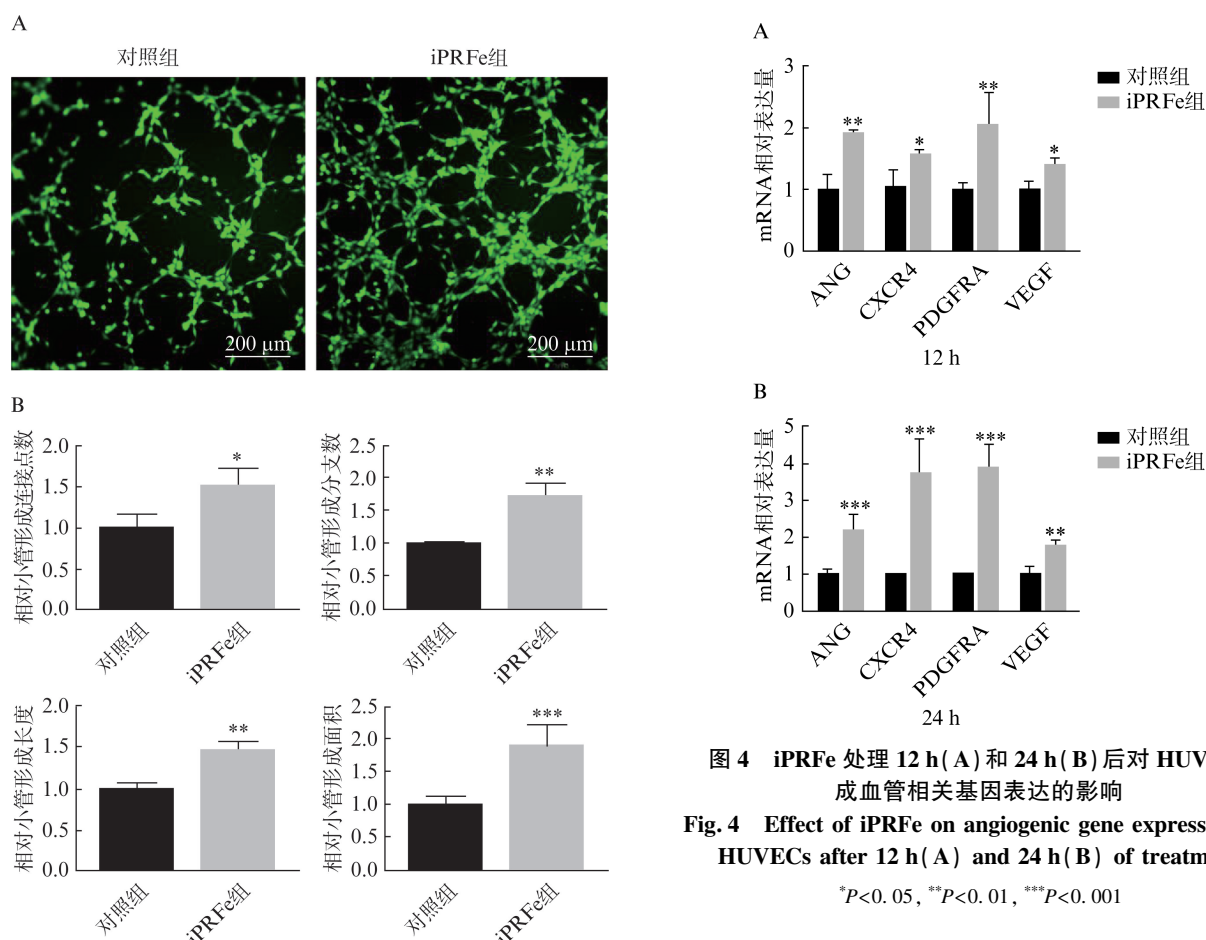


图 3 iPRFe 对 HUVECs 成血管能力的影响

Fig. 3 Effect of iPRFe on angiogenesis of HUVECs

A: 小管形成实验荧光图片; B: 小管形成实验定量分析结果;

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

图 4 iPRFe 处理 12 h (A) 和 24 h (B) 后对 HUVECs 成血管相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of iPRFe on angiogenic gene expressions of HUVECs after 12 h (A) and 24 h (B) of treatment

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

3 讨 论

骨髓再生包括干细胞移植策略和细胞归巢策略,相较于前者,细胞归巢策略不需要在体外培养干

细胞,也避免了可能的免疫排斥反应,因此在临床应用上更具优势,但寻找合适的支架材料和生长因子提高牙髓再生的成功率是需要解决的问题^[8-9]。血小板浓缩制品是一类天然生物支架材料,其交联纤维蛋白网中含有促进干细胞增殖、迁移和分化的生长因子,高浓度的血小板也在伤口愈合过程中充当关键调节剂,已经被用于促进口腔软、硬组织再生^[10]。其中 iPRF 是静脉血经低速、低温离心后得到的新型血小板浓缩制品,其液体形态的优势便于被注射入复杂细小的根管系统,并在室温下逐渐凝固,为再生医学提供了一种实用形式^[11]。

血管生成是胚胎发育、损伤修复和组织再生等生理、病理过程中的重要事件^[12]。牙髓是高度血管化的组织,因此血管再生是恢复牙齿活力,维持牙齿正常发育、免疫防御和自我修复功能的基础^[1]。体内牙髓再生过程中血管化的发生可以由具有成血管潜能的牙源性干细胞直接实现,也可以是牙源性干细胞在生长因子的诱导下分化为血管内皮细胞,再发生增殖、迁移和成血管等一系列程序性事件^[13-14]。本实验选用的 HUVECs 源自人脐静脉内皮,可以较好地模拟生理状态下内皮细胞的特性,常被用于构建体外成血管模型^[12]。因此,本研究拟通过细胞增殖、迁移和成血管分化实验分析 iPRF 对体外培养的 HUVECs 生物学行为的影响,初步评估 iPRF 在再生性牙髓治疗中的应用前景。

以往的研究提出,血小板浓缩制品对细胞生物学行为的影响并不完全表现为浓度依赖性^[15]。同时,课题组前期在研究 iPRF 对人根尖牙乳头干细胞(human stem cells from apical papilla, hSCAPs)生物学行为的影响时也发现 0.4 mg/mL 的 iPRFe 促进 hSCAPs 增殖效果最佳,0.4 mg/mL 的 iPRFe 还能明显提高 hSCAPs 的迁移和矿化能力^[7]。因此,本研究参考前期研究方案并进行改良,设置了 1.6 mg/mL、0.8 mg/mL、0.4 mg/mL 和 0.2 mg/mL 共 4 个浓度梯度用于筛选促进 HUVECs 增殖的最佳浓度。综合分析 12 h 和 24 h 之后各组细胞的增殖情况后,0.4 mg/mL 浓度的 iPRFe 被认为是促进 HUVECs 增殖的最佳浓度。iPRFe 中被检测到许多与细胞增殖、迁移和分化有关的生长因子^[6,16],本实验结果提示适宜浓度的生长因子对细胞增殖的促进效果最佳,过高的浓度反而达不到最好的效果。内皮细胞发生迁移是血管生成的标志行为之一,参与血管生成的早期过程^[12]。划痕实验常用于量度细胞横向 2D 迁移的能力,体外培

养的细胞完全融合后,在无血清的条件下人为制造的划痕愈合情况可以反映细胞的迁移活性。在本研究中,划痕制造 12 h 后 iPRFe 组细胞迁移率明显大于对照组,24 h 后两组差异更为明显,证明 iPRFe 可以有效促进 HUVECs 的迁移能力。然而,既定的细胞行为可能是多种细胞因子和信号通路相互作用的结果,其作用机制有待进一步研究。

本研究通过小管形成实验和成血管相关基因的检测来探究 iPRFe 对 HUVECs 成血管的作用。本实验使用的 Matrigel 基质胶是最简单常用的体外血管生成模型,可以评估细胞在无血清条件下与基质胶中的生长因子和细胞外基质成分相互作用而形成小管样结构的能力^[17]。荧光图片清晰展示了 iPRFe 组形成的小管样结构明显多于对照组,与软件定量分析结果一致。同时,iPRFe 也显著提高 HUVECs 中成血管相关基因 ANG、CXCR4、PDGFRA 和 VEGF 的 mRNA 表达水平。CXCR4 参与细胞内稳态,在血管生成早期招募细胞有助于血管再生^[18];ANG、PDGFRA 和 VEGF 通过激活血管内皮细胞的系列反应刺激血管生成^[19-21]。这些血管生成标志物在 iPRFe 组的高表达也证明了 iPRF 的促血管生成能力。据报道,iPRF 内含有可以调节血管生成的多种生长因子,包括高浓度的血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)和 VEGF 等,可以缓慢释放长达 10 d 以上^[6,16]。以往的一项体外共培养模型也发现,iPRF 可以上调促血管生成因子 VEGF 的表达^[22]。iPRF 联合明胶纳米颗粒也被报道可以促进血管生成和成骨,有利于拔牙后的牙槽嵴保存^[23]。总的来说,iPRF 在促进血管生成的多个事件中都发挥了促进作用,其促血管生成和组织再生的能力得到初步验证。然而,本研究还有很大的局限性,因为 HUVECs 不存在于生理状态下的牙髓组织中,不能完全代表牙髓再生过程中干细胞的生物学行为。因此,基于本研究的结论,本课题组计划进一步探究 iPRF 对牙髓内固有细胞成血管分化能力的影响,更好地阐明 iPRF 用于临床牙髓再生的可行性。

综上所述,本研究结果表明 iPRF 对体外培养的 HUVECs 增殖、迁移和成血管分化能力具有促进作用,为可注射型富血小板纤维蛋白应用于再生性牙髓治疗提供了一定理论基础,但其分子机制及临床转化的效果有待进一步探究。

【参考文献】

- [1] SUI B, CHEN C, KOU X, et al. Pulp stem cell-mediated functional pulp regeneration [J]. *J Dent Res*, 2019,98(1): 27-35.
- [2] CHOUKROUN J, GHANAATI S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors; the first introduction to the low speed centrifugation concept [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2018,44(1): 87-95.
- [3] LITVINOV R I, WEISEL J W. What is the biological and clinical relevance of fibrin? [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2016,42(4): 333-343.
- [4] RAFIEE A, MEMARPOUR M, NAJIBI Y, et al. Antimicrobial efficacy of a novel antibiotic-eluting injectable platelet-rich fibrin scaffold against a dual-species biofilm in an infected immature root canal model [J]. *Biomed Res Int*, 2020,2020: 6623830.
- [5] WANG X Z, ZHANG Y F, CHOUKROUN J, et al. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma [J]. *Platelets*, 2018,29(1): 48-55.
- [6] MIRON R J, FUJIOKA-KOBAYASHI M, HERNANDEZ M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? [J]. *Clin Oral Investig*, 2017,21(8): 2619-2627.
- [7] 潘菁,曹子蔚,管贻,等.可注射型富血小板纤维蛋白对人根尖牙乳头干细胞生物学行为的影响 [J]. *口腔医学*, 2021,41(7): 594-598.
- [8] 邹杰林,毛靖,石鑫.牙髓-牙本质复合体再生的影响因素及其生物学策略 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022,51(3): 350-361.
- [9] 李琳,蔡宇艺,何江峰,等.血小板衍生生长因子-BB对骨髓间充质干细胞多向分化及自噬相关蛋白表达的影响 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2022,43(2): 165-173.
- [10] LIU H, LU J, JIANG Q Z, et al. Biomaterial scaffolds for clinical procedures in endodontic regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2022,12: 257-277.
- [11] FARSHIDFAR N, JAFARPOUR D, FIROOZI P, et al. The application of injectable platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic scoping review of *In vitro* and *In vivo* studies [J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2022,58: 89-123.
- [12] NOWAK-SLIWINSKA P, ALITALO K, ALLEN E, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 425-532.
- [13] FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nat Med*, 1995,1(1): 27-31.
- [14] 王舸,谢利,田卫东.牙髓再生中促进血管化策略的新进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(30): 4904-4911.
- [15] FERNÁNDEZ-MEDINA T, VAQUETTE C, IVANOVSKI S. Systematic comparison of the effect of four clinical-grade platelet rich hemoderivatives on osteoblast behaviour [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(24): 6243.
- [16] THANASRISUEBWONG P, SURARIT R, BENCHARIT S, et al. Influence of fractionation methods on physical and biological properties of injectable platelet-rich fibrin: an exploratory study [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(7): 1657.
- [17] BELOGLAZOVA I, ZUBKOVA E, DERGILEV K, et al. New insight on 2D *in vitro* angiogenesis models: all that stretches is not a tube [J]. *Cells*, 2022,11(20): 3278.
- [18] DÖRING Y, NOELS H, VAN DER VORST E P C, et al. Vascular CXCR4 limits atherosclerosis by maintaining arterial integrity: evidence from mouse and human studies [J]. *Circulation*, 2017,136(4): 388-403.
- [19] WENG C H, DONG H J, MAO J J, et al. Characterization and function of the interaction of angiogenin with alpha-actinin 2 [J]. *Front Mol Biosci*, 2022,9: 837971.
- [20] ZHU L F, DISSANAYAKA W L, ZHANG C F. Dental pulp stem cells overexpressing stromal-derived factor-1 α and vascular endothelial growth factor in dental pulp regeneration [J]. *Clin Oral Investig*, 2019,23(5): 2497-2509.
- [21] SOLINC J, RAIMBAULT-MACHADO J, DIERICK F, et al. Platelet-derived growth factor receptor type α activation drives pulmonary vascular remodeling via progenitor cell proliferation and induces pulmonary hypertension [J]. *J Am Heart Assoc*, 2022,11(7): e023021.
- [22] DOHLE E, BAGDADI K E, SADER R, et al. Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an *in vitro* co-culture model for bone tissue engineering [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018,12(3): 598-610.
- [23] YUAN S, LI Q S, CHEN K W, et al. Ridge preservation applying a novel hydrogel for early angiogenesis and osteogenesis evaluation: an experimental study in canine [J]. *J Biol Eng*, 2021,15(1): 19.