doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.004

豆浆作为脱位牙保存液对牙周膜成纤维细胞活性的影响研究 *

陈富波 祁胜财 张 旭 谢云峰 吴津津 汪饶饶△
(同济大学附属第十人民医院口腔科 上海 200072)

摘要 目的:通过探讨牙周膜成纤维细胞保存在豆浆中对其细胞活性的影响,评价豆浆作为脱位牙保存液的可行性。**方法:**将因口腔正畸而拔除12-18岁青少年的前磨牙进行细胞分离,选用分离出来的牙周膜成纤维细胞进行培养,将其分别置于ViaSpan、DMEM高糖培养基、豆浆、自来水、牛奶、Hank平衡盐溶液这6种液体中进行培养,采用cck-8法测定其在不同保存液中1h、2h、4h、8h、24h五个时间点的细胞活性。**结果:**豆浆组1h、2h、4h、8h、24h细胞残存率都显著高于自来水组(*P<0.01*);豆浆组1h、2h、4h、8h细胞残存率与DMEM组、ViaSpan组比较均无统计学差异(*P>0.05*),在24h时的细胞残存率显著高于DMEM组和ViaSpan组(*P<0.05*);豆浆组2h、8h细胞残存率和牛奶组比较无统计学差异(*P>0.05*),但牛奶组1h、4h、24h细胞残存率显著高于豆浆组(*P<0.05*);豆浆组1h、2h、4h、8h、24h细胞残存率和HBSS组比较均无统计学差异(*P>0.05*)。**结论:**豆浆在保存牙周膜成纤维细胞活性效果等效于Hank平衡盐溶液,是一种有效的脱位牙保存液。

关键词:豆浆;牙周膜成纤维细胞;保存液
中图分类号:R-33;R781 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)08-1416-04

Viability of Human Periodontal Ligament Fibroblasts in Soybean Milk as Storage Media*

CHEN Fu-bo, QI Sheng-cai, ZHANG Xu, XIE Yun-feng, WU Jin-jin, WANG Rao-rao△
(Department of Stomatology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, 200072, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the feasibility of soybean milk as a storage media for avulsed teeth through analyzing the effect of soybean milk on the cell viability of periodontal ligament fibroblasts preserved in soybean milk. **Methods:** Human periodontal ligament fibroblasts cells were isolated from the premolars of 12-18 year-old adolescents after orthodontic extraction and cultured in ViaSpan, DMEM high glucose medium, soybean milk, tap water, milk and Hank balanced salt solution. Then the cell activity was measured by CCK-8 method at 1h, 2h, 4h, 8h, 24h in different storage solutions. **Results:** The cell survival rates of soybean milk group at 1h, 2h, 4h, 8h and 24h were significantly higher than those of tap water group (*P<0.01*). Compared with DMEM and ViaSpan groups, the cell survival rates of soybean milk group at 1h, 2h, 4H and 8h had no significant difference (*P>0.05*), and the cell survival rate at 24h was significantly higher than that of DMEM and ViaSpan groups (*P<0.05*). There was no significant difference between the soybean milk group and the milk group at 2h, 8h (*P>0.05*), but the cell survival rates of the milk group were significantly higher than that of the soybean milk group at 1h, 4h, 24h (*P<0.05*). There was no significant difference in cell survival rate between the soybean milk group and HBSS group at 1h, 2h, 4h, 8h and 24h (*P>0.05*). **Conclusion:** Soybean milk has the same effect as HBSS in maintaining the viability of human periodontal ligament fibroblasts, which can be recommended as a suitable storage media.

Key words: Soybean milk; Human periodontal ligament fibroblasts; Storage media
Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781 Document code: A
Article ID: 1673-6273(2019)08-1416-04

前言

牙齿外伤是儿童和成人的口腔常见病之一,由交通事故、突发事件、外伤等所致的牙损伤逐年增多,恒牙外伤的发生率高达10-35%[1],而在恒切牙外伤中,牙脱位约占0.5%~3%[2]。脱位牙及时有效的保存有助于维持牙周膜细胞的生物学活性,从而提高再植牙的成功率。通常情况下,脱位牙难以即刻再植,为了让脱位牙牙周膜细胞的生物学活性可以维持更久的时间,医务人员应尽快将其浸泡在生理性的平衡介质中进行保存。

美国牙髓病学会推荐Hank平衡盐溶液(简称HBSS),HBSS是一种标准的盐水溶液,广泛的应用于各种细胞的培养,能有效的保存脱位牙牙周膜细胞,是一种较理想的脱位牙保存液,但在牙外伤现场HBSS较难获取。因此,探索一种合适的保存液是目前各学者的研究热点,包括DMEM培养基、Gatorade、自来水、生理盐水、唾液、牛奶、细胞培养基、蜂胶、椰奶、ViaSpan等[3-5],但尚没有发现理想的保存液(或者获取较难

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81500806)
作者简介:陈富波(1984-),男,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:口腔牙外伤的诊治,E-mail: chenfubo@126.com
△ 通讯作者:汪饶饶(1959-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:口腔颌面部修复,E-mail: raoraowang@hotmail.com,电话:021-66301726
(收稿日期:2018-08-23 接受日期:2018-09-18)

等限制)。

豆浆为我国传统饮品,至今已有上千年历史,大豆营养价值高,富含多种营养成分,特别是一些植物蛋白和磷脂是人体生理的必需物质也有较高的含量, 其成分中的维生素 B1、B2、钙、烟酸铁等都是对人体有利的营养物质。同时,豆浆容易获取,其 pH 值和渗透压适合脱位牙的保存。本研究通过体外细胞实验探索了豆浆作为脱位牙保存液的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

豆浆(本次研究中的大豆采用的是产至黑龙江的北大荒黄豆共 50 g,水使用的是 600 mL 蒸馏水,经机器研磨后再加热后制成 检测其 pH值为 6.8),Hank 平衡盐溶液 (Life Technologies,美国,pH=7.2),ViaSpan(Belzer UW-CSS,Dupont Pharmaceuticals),牛奶 (品牌为光明, 品质为优 +, 产地为上海,pH 值为 6.7),DMEM 高糖培养基(厂家为 Thermo Scientific HyClone,产地为美国,pH 值为 7.4),CCK-8 试剂(厂家为 Dojindo,产地为日本),酶联免疫检测仪(厂家为 Bio-Tek,产地为美国)。

1.2 原代细胞培养

1.2.1 前磨牙的选择 年龄 12-18 岁的青少年,因需口腔正畸治疗而拔除,无龋病并且牙周健康。

1.2.2 培养法的选择 采用组织块培养法,具体如下:先从获得的前磨牙中刮取牙齿根中 1/3 的牙周膜,随后使用手术剪刀将取得的牙周膜剪成约长 0.5 mm、宽 0.5 mm、高 0.5 mm 左右的均匀小块,均匀铺于无菌的 25 mL 培养瓶底,加入 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基,然后将培养瓶置于 CO_2 孵箱(浓度为 5%CO_2,温度 37℃)中,放置 2h 时后,对培养瓶进行翻转后继续培养。以后每两天就换一次液,严密观察培养瓶中的牙周膜成纤维细胞生长状况,当细胞的生长达到了预定的汇合点(本次研究选择细胞长满瓶底的 70%-80%即可)后,采用浓度为 2.5 g/L 的胰蛋白酶进行消化传代,传代比例为 1:2,本次实验选取第 6 代细胞进行。

1.3 细胞活性检测

将牙周膜成纤维细胞接种于 96 孔板内,加 100 μL 含 1×10^4 个细胞的细胞液,24 小时后镜下见细胞贴壁后, 弃去细胞培养液后,采用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,随后,分别加入 ViaSpan、DMEM 高糖培养基、豆浆、自来水、牛奶、HBSS 等六种保存液各 150 μL,阴性对照组为自来水组,阳性对照组为 HBSS,分别置于培养箱(浓度 5%CO_2,温度 37℃)中,然后在放置后的 1h、2h、4h、8h 和 24h 这 5 个时间段取出进行细胞残存率测定。测定方法为取出后弃除各种保存液,用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,然后加入 100 μL 含量为 10% cck-8 的 DMEM 培养基检测试剂,再次放置在培养箱中进行保存 2h, 使用酶联免疫检测仪测定其在 450 nm 波长处的吸收度值(OD value)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS19.0 进行统计分析, 两两均数之间比较用 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,$P<0.01$ 表示差异有高度统计学意义。

2 结果

各组保存液经 CCK-8 法测定后吸光值结果见表 1 和图 1。豆浆组 1h、2h、4h、8h、24h 细胞残存率都显著高于自来水组($P<0.01$); 豆浆组 1h、2h、4h、8h 细胞残存率与 DMEM 组、ViaSpan 组比较均无统计学差异($P>0.05$),在 24h 时的细胞残存率显著高于 DMEM 组和 ViaSpan 组($P<0.05$);豆浆组 2h、8h 细胞残存率和牛奶组比较无统计学差异($P>0.05$),但牛奶组 1h、4h、24h 细胞残存率显著高于豆浆组要($P<0.05$);豆浆组 1h、2h、4h、8h、24h 细胞残存率和 HBSS 组比较均无统计学差异($P>0.05$)。

表 1 各组保存液经 CCK-8 法测定后吸光度值结果($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The absorbance value of each group determined by CCK-8

Storage media	Storage time				
	1h	2h	4h	8h	24h
Tap water	0.3810± 0.0016▲	0.2602± 0.0049▲	0.2090± 0.0025▲	0.1970± 0.0120▲	0.1952± 0.0041▲
HBSS	2.9427± 0.1015•	2.6357± 0.0224•	2.4585± 0.0282•	2.1437± 0.0151•	1.7787± 0.0093•
Soybean milk	3.007± 0.0330	2.7365± 0.0080	2.1952± 0.0342	2.0132± 0.0614	1.6882± 0.0029
ViaSpan	2.7097± 0.0420•	2.4975± 0.0645•	2.4002± 0.0038•	2.1022± 0.0069•	1.5675± 0.0089♦
Milk	3.2655± 0.0075♦	2.8730± 0.0312•	2.6935± 0.0090♦	2.2615± 0.0054•	1.8122± 0.0007♦
DMEM	2.6902± 0.0870•	2.5232± 0.0866•	2.3702± 0.0049•	2.0977± 0.0028•	1.5667± 0.0032♦

注:在同一时间点各组保存液和豆浆组比较(▲ $p<0.01$,♦ $p<0.05$,• $P>0.05$)。

Note: each group was compared with soybean milk group at the same time point(▲ $p<0.01$, ♦ $p<0.05$, • $P>0.05$).

3 讨论

牙周膜成纤维细胞在离开人体后, 给予合适的生长环境,虽然大部分还是会死亡,但有一部分的牙周膜成纤维细胞会恢复活性,继续生长。脱位牙保存液的成分、pH 值、渗透压等都会影响脱位牙保存效果。因此,选择一种合适的保存液不但可以使脱位牙上的污染物以及已经死亡的牙周膜成纤维细胞脱离牙根表面,又能为牙周膜成纤维细胞提供其生长所必需的营养物质一直是研究的热点问题[6,7]。

HBSS 的 pH 值为 7.2,渗透压约为 320 mosm/kg,主要含有氯化钠、镁硫化物、葡萄糖、氯化钾、氯化钙、氯化镁、碳酸氢钠、磷酸钠等。相关文献研究表明葡萄糖、钙、镁都是修复牙周膜细

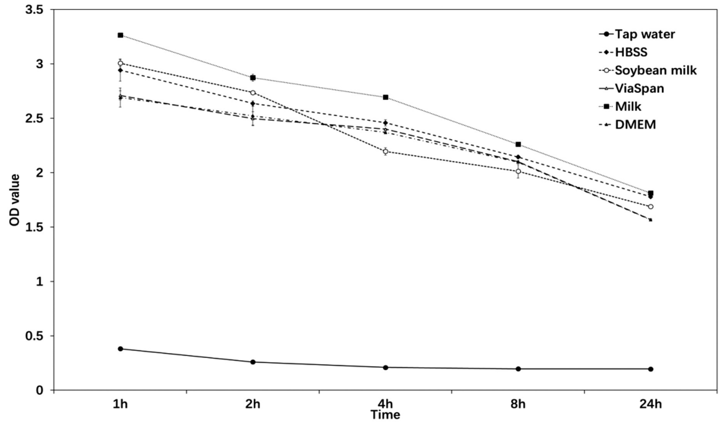

图 1 各种保存液不同时间对牙周膜成纤维细胞增殖活性的影响

Fig.1 Effects of various storage medias on proliferation of periodontal ligament fibroblasts at different time points

胞衰竭结构所需物质。HBSS 与牙周膜细胞生物相容性好，能有效的保存脱位牙牙周膜细胞，恢复变性的牙周膜细胞。Huang [8]等研究表明 HBSS 保存牙周膜细胞 72h 后，仍有 46.8%的细胞具有活性，在细胞活性、有丝分裂和克隆能力 HBSS 都优于 Viaspan[9]、MEM[10]。Ashkenazi[9]等对比 HBSS、细胞培养液(含血清)、培养基、牛奶，ViaSpan 等得提出 HBSS 在保存牙周膜成纤维细胞活性、有丝分裂、克隆能力效果最好。市场上现有专门用于脱位牙保存商品化的 HBSS 保存液，Save-A-Tooth，(Save-A-ToothTM, Inc, Pottstown, PA)，其内部有一个网用于固定保护脱位牙，以使减少在运输过程中对脱位牙的损伤。以往研究表明牛奶因其获取和保存条件优秀，是一种非常优异的脱位牙保存液之一[11]。因为牛奶的 pH 值非常的合适，渗透压也很足。目前，牛奶在经过经过巴氏消毒后，有效的控制其细菌含量的同时，不降低其中对牙周膜细胞的生长非常有利的营养物质，因此使用牛奶作为脱位牙的保存液不仅有利于牙周膜细胞的生长，还不易产生炎症。

DMEM 细胞培养基含有 l- 谷氨酰胺 4 毫升，105 IU/L 青霉素，100 μg/ mL 链霉素，10 μg /mL 的制霉菌素和小牛血清，对于保存牙周膜成纤维细胞的活性很有效果[12]。Ashkenazi[10]等比较了培养基、HBSS、牛奶保存牙周膜细胞活性，细胞在 4℃培养基中活性、有丝分裂和克隆能力最强，但保存时间延长到 24h 时，培养基的保存效果差于 HBSS 和牛奶，这可能和保存液的温度有关，低温能够诱使细胞聚集以及细胞消耗减少。Ashkenazi 等[13]在另一个研究中在保存液中加入了生长因子，对比了 ViaSpan、HBSS 和培养基的保存效果，发现加入生长因子的 HBSS 保存液效果最好，其次是加入生长因子的培养基保存液，都优于 ViaSpan 和没加生长因子的培养基，培养基中加入生长因子更有利于长时间的保存脱位牙。本实验中，在 1h、2h、4h、8h 四个时间点，豆浆和 DMEM 在保存牙周膜成纤维细胞方面没有显著差别，而在 24h 时间点豆浆优于 DMEM。

ViaSpan 是一种用于器官移植中器官运输的保存液，有着适宜细胞生长的 PH 和渗透压[10]，用于保存脱位牙能够降低脱位牙再植后牙根吸收率。Hiltz and Trope[14]对比 ViaSpan、HBSS 和牛奶常温保存牙周膜成纤维细胞，发现 ViaSpan 中细胞存活率最高，24h 后，ViaSpan, HBSS 及牛奶中细胞存活率分别为 76.7%、71.3%和 20.2%。但 Ashkenazi[9]等使用 ViaSpan、HBSS 和牛奶 4℃下保存牙周膜成纤维细胞 24h 后，细胞在 ViaSpan 中有丝分裂(37%-40%)和活性(10-12%)均不如 HBSS 和牛奶。两者相反的结果可能与实验条件不同所导致，例如实验的温度，细胞种类不一致等。使用 ViaSpan 保存牙周膜细胞 8h，其克隆能力优于 HBSS 和牛奶，但保存时间达到 24h 时，细胞克隆能力较 HBSS 和牛奶低约 45%[9]。虽然 ViaSpan 做为脱位牙保存液具有较好的效果，但其价格昂贵，保质期较短，大约只有两个月，且难以获取，只能在少数药店和医院，因此 ViaSpan 很难广泛用于脱位牙的保存[9]。本实验中，ViaSpan 保存牙周膜成纤维细胞效果与 DMEM 相似，在 1h、2h、4h、8h 四个时间点，豆浆和 ViaSpan 在保存牙周膜成纤维细胞方面没有显著差别，而在 24h 时间点豆浆优于 ViaSpan。

豆浆是来自大豆的产品，营养价值高，富含多种营养成分，享有“植物奶”的美誉，性平味甘，含有人体所需的植物蛋白、多种必需的氨基酸和维生素以及钙、铁、磷、锌、硒等微量元素，不含有胆固醇，极富营养和保健价值。豆浆中含有大豆卵磷脂，而卵磷脂是构成人体细胞膜的主要成分，对人体细胞的新生和发育起到着非常良好的促进作用，也是牙周膜成纤维细胞的生长所需的重要营养成分，这些都是非常有利于牙周膜成纤维细胞的保存。相关的研究表明在 pH 值为 7 的环境有利于大多数的生物细胞生长，如果 pH 值的波动出现变动过大，都会影响到细胞的生长，严重时还会造成伤害，细胞一般适宜生存在 pH 值为 6.6-7.8 中，脱位牙保存液的 pH 值也是影响牙周膜细胞生物学活性的重要因素之一，豆浆 pH 值约为 6.5-7.0，适合脱位牙的保存。脱位牙保存的液渗透压也会对牙周膜细胞产生较大的影响，渗透压为 230 mosm/kg - 400 mosm/kg 的溶液最适宜细胞的保存，过高或者过低的渗透压都会严重影响到脱位牙牙周膜细胞的保存，影响脱位牙再植预后，豆浆的渗透压约为 260 mosm/kg，不会对牙周膜细胞造成损害，适合细胞的生长。虽然自来水是获取难度最低的一种保存液，在本次研究结果中，其保存脱位牙牙周膜细胞效果是最差的，这可能与其其渗透压低，会导致生物细胞的快速裂解有很大的关系，自来水的保存效果与干燥保存效果相当[15]。

外伤导致牙齿全脱位发生后，如果能够及时有效的保存和再植，可以获得较理想的效果[16-18]，脱位牙能够长时间的保留，其中保存液非常重要，牙周膜细胞保存的状态对于脱位牙再植

的预后至关重要[19-21]。本研究结果表明采用豆浆保存牙周膜细胞效果等效于 HBSS,保存时间长达 24h。因此,如果发生患牙外伤全脱位的情况,可以将脱位牙保存在豆浆中然后再及时去医院就诊,能有效的维持牙周膜细胞活性,从而提高患者脱位牙再植牙的成功率。

参 考 文 献(References)

[1] Tezel H, Atalayin C, Kayrak G. Replantation after traumatic avulsion [J]. Eur J Dent, 2013, 7(2): 229-232

[2] Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth [M]. 4th edn. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2007, 444

[3] Ghasempour M, Moghadamnia AA, Abedian Z, et al. In vitro viability of human periodontal ligament cells in green tea extract[J]. J Conserv Dent, 2015, 18(1): 47-50

[4] Bharath MJ, Sahadev CK, Ramachandra PK, et al. Comparative evaluation of four transport media for maintaining cell viability in transportation of an avulsed tooth—An in vitro study [J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2015, 5(1): 69-73

[5] Silva EJ, Rollemberg CB, Coutinho-Filho TS. Use of soymilk as a storage medium for avulsed teeth [J]. Acta Odontol Scand, 2013, 71(5): 1101-1104

[6] Ebrahim Jabarifar, Navid Khalighinejad, Abbas Ali Khademi. Histologic evaluation of apical pulp of immature apex following extraction,surface treatment, and replantation in different storage media in dogs[J]. Dent Traumatol, 2015, 1(2): 118-124

[7] Moura CC, Soares PB. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study[J]. Dent Traumatol, 2014, 30(1): 22-26

[8] Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long-lerm exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions [J]. J Endod, 1996, 22: 30-33

[9] Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media[J]. Dent Traumatol, 1999,15: 149-156

[10] Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature[J]. Dent Traumatol, 2000, 16: 63-70

[11] Badakhsh, Samanch, Eskandarian, et al. The use of aloe vera extract as a novel storage media for the avulsed tooth [J]. Iran J Med Sci, 2014, 39(4): 327-329

[12] Chen F, Qi S, Lu L,et al. Effect of storage temperature on the viability of human periodontal ligament fibroblasts [J]. Dental traumatology, 2015, 31: 24-28

[13] Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. *In vitro* viability, mitogenecity and clonogenic capacity of periodontal ligament fibroblasts after storage in four media supplemented with growth factors [J]. Dent Traumatol, 2001, 17: 27-35

[14] Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media[J]. Dent Traumatol, 1991, 7: 69-72

[15] De Souza BD, Lückemeyer DD, Felippe WT, et al. Effect of milk renewal on human periodontal ligament fibroblast viability in vitro[J]. Dent Traumatol, 2012, 28(3): 214-216

[16] Sharma M. *In vitro* periodontal ligament cell viability in different storage media[J]. Brazilian dental journal, 2016, 27: 408-411

[17] Sharma M, Sharma S, Reddy YG, et al. Evaluation of periodontal ligament cell viability in three different storage media: An in vitro study[J]. Journal of dentistry, 2015, 12: 524-531

[18] Nagata JY, Rocha-Lima TF, Gomes BP, et al. Pulp revascularization for immature replanted teeth: A case report [J]. Australian dental journal, 2015, 60: 416-420

[19] Sanghavi T, Shah N. Evaluation and comparison of efficacy of three different storage media, coconut water, propolis, and oral rehydration solution, in maintaining the viability of periodontal ligament cells[J]. Conserv Dent, 2013, 16(1): 71-74

[20] Blokland A, Watt RG, Tsakos G, et al. Traumatic dental injuries and socioeconomic position findings from the children's dental health survey 2013 [J]. Community dentistry and oral epidemiology, 2016, 44(6): 586-591

[21] Souza BD, Alves AM, Santos LG, et al. Fibroblast viability after storage at 20 degrees in milk, hank's balanced salt solution and coconut water[J]. Brazilian dental journal, 2016, 27: 404-407

·重要信息·

《现代生物医学进展》2019 年封面设计说明

此版封面的主体为肿瘤细胞与效应 T 细胞，并特别突出显示了肿瘤细胞表面所表达的免疫抑制受体 PD-L1。众所周知,2018 年诺贝尔生理学或医学奖授予了美国科学家詹姆斯·艾利森和日本科学家庶佑,以表彰他们所发现的抑制免疫负调节的癌症疗法——“免疫检查点疗法”，而 PD-1/PD-L1 通路正是该疗法所针对的一条十分重要的免疫抑制性信号通路。近年来,新兴的肿瘤免疫疗法蓬勃发展,PD-1/PD-L1 抑制剂作为其重要代表,一经问世就朝着靶向治疗,精准治疗的方向不断前行,为癌症治疗开创了全新的免疫治疗思路。

2019 年度杂志封面选择新型的肿瘤免疫疗法为主题,紧跟诺贝尔获奖热点,所表现内容辨识度高,符合《现代生物医学进展》的办刊主旨和特色。