

牙髓源性干细胞在口腔颅颌面组织工程领域的研究进展

黄文燕 葛立宏* 曾素娟*

(广州医科大学附属口腔医院 广州口腔疾病研究所 口腔医学重点实验室 广东 广州 510140)

[摘要] 牙髓和根尖乳头等牙髓源性组织中存在间充质干细胞即牙髓源性干细胞,在体外能被成功分离、培养和扩增,并证实具有自我更新、多向分化的潜能,在体内可实现包括牙本质、骨等多种组织的再生。牙髓源性干细胞来源易得,伦理争议低,有望成为组织工程学中最有潜质的种子细胞来源。本文就牙髓源性干细胞的成骨性能、体外成骨系统、在骨组织工程中的部分应用等作一综述。

[关键词] 牙髓源性干细胞 组织工程 三维支架

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)03—0218—03

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.03.005

Research Progress of Dental Pulp Derived Stem Cells in Oral Craniofacial Tissue Engineering. HUANG Wen-yan, GE Li-hong*, ZENG Su-juan*. Key Laboratory of Oral Medicine, School and Hospital of Stomatology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China.

[Abstract] Recent evidences have shown that a variety of mesenchymal stem cells located in dental pulp-derived tissues such as the dental pulp and apical papilla. It is known that these stem cells have the potential to differentiate into several cell types, including odontoblasts, osteoblasts, and chondrocytes. These stem cells can be isolated and grown under defined tissue culture conditions, and are potential cells for use in tissue engineering, including dental tissues and bone regeneration. This article reviews the osteogenic properties of dental pulp stem cells, osteogenic system *in vitro*, and their applications in tissue engineering.

[Key words] Dental pulp derived stem cells Tissue engineering Three-dimensional scaffold

牙髓源性干细胞包括牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)^[1]、乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)^[2]、根尖乳头干细胞(stem cells from the apical papilla, SCAP)^[3],可从牙髓组织中分离,是一种非造血多能干细胞,具有自我更新及多向分化能力,在低温条件下可长期储存,复苏及传代后仍能高表达干细胞特性,伦理及法律争议少^[4],符合由国际干细胞治疗协会规定的间充质干细胞最低标准^[5],其在骨组织工程中的应用是非常有前景的。本文就牙髓源性干细胞的成骨性能、体外成骨系统、在骨组织工程中的应用等作一综述。

1 牙髓源性干细胞的成骨性能

牙髓源性干细胞被认为起源于外胚层神经嵴,可表达间充质干细胞和神经外胚层干细胞的多种标志物,在牙髓组织中位于血管周围,具有良好的成血管性能^[6]。DPSCs、SHED、SCAP均表达碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,

ALP)、I型胶原、骨粘连蛋白、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和骨钙素(osteocalcin, OCN)等成骨相关标记物,在体外经含有L-抗坏血酸-2磷酸盐、地塞米松、无机磷酸盐等矿化培养液诱导后,成骨标记物表达上调,茜素红染色有钙结节形成,证明牙髓源性干细胞具有体外形成矿化组织的能力。

在成骨分化过程中,相对于DPSCs, SHED表达更高水平的OCN和ALP, SHED移植至体内后未直接分化为成骨细胞,而是通过诱导体内的成骨细胞来参与新骨形成,表现出很强的诱导骨生成能力,这是DPSCs(甚至其它牙体组织来源间充质干细胞)所没有的功能,推测可能是由于乳牙牙根生理性吸收的过程与骨改建的过程类似,乳牙对恒牙的萌出及恒牙萌出时的骨生成起诱导作用^[6]。SCAP和SHED比DPSCs形成更多的矿化基质,但基质结晶度均较低^[7]。相对于骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs),牙髓源性干细胞呈现出更强的增殖能力,组织来源更简单且创伤更少,能够为临床治疗提供足够数量的细胞^[6]。长骨的BMSCs来源于中胚层,牙髓源性干细胞与颌面部骨的BMSCs均来自于外胚层神经嵴,推测牙髓源性干细胞可能更适合应用于口腔颅颌面部骨的组织工程领域^[8]。

2 牙髓源性干细胞的体外成骨系统

细胞成骨性能体外研究大多数是在二维单层培养环境,

基金项目 广州市属高校科研项目(编号:1201610458)

作者简介 黄文燕(1992~),女,广东茂名,硕士在读,研究方向为儿童口腔医学。

*** 通讯作者** 葛立宏, E-mail: gelh0919@126.com

曾素娟, E-mail: 13922265473@163.com

而体内是由复杂的细胞-细胞和细胞-细胞外基质组成的三维立体结构。为了模拟干细胞在体内的原始特性,学者们研发了三维细胞培养系统^[9],包括支架/无支架三维系统。

三维支架系统可设计不同的支架形状,调整细胞种植密度,根据支架的性质和添加生长因子诱导细胞多向分化。Pecci-Lloret 等^[10]将 DPSCs 分别接种于二维和三维丝素蛋白支架上,24 h 后三维支架组可见更多细胞粘附,细胞具有良好的成纤维细胞形态,而后细胞覆盖整个三维支架表面,仅部分覆盖于二维支架表面,表明三维支架更利于细胞粘附增殖。Karadzic 等^[11]分别将 SHED 移植至纯羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)支架或 HA 与聚乳酸-乙醇酸(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)、海藻酸钠和乙烯醋酸乙烯酯复合物上,均能促进 SHED 成骨向分化,认为上述 4 种三维支架均可作为牙髓源性干细胞体外增殖和成骨分化的适宜载体。由此可见,三维支架有利于细胞粘附、增殖及分化。

但三维静态培养时细胞由于重力作用而集中分布在支架底部,未均匀分散于支架内部。同时支架内氧气和营养成分分布不均匀,代谢废物难以从支架内部运出,生长因子难以进入支架内部。因此学者们研发动态培养系统。Li 等^[12]利用细胞旋转培养系统(rotary cell culture system, RCCs)模拟微重力作用建立动态培养,将 DPSCs 接种于 PLGA 支架,分别在含成骨培养基的动态和静态环境下培养 7 d,随后移植入裸鼠背部皮下,4 周后组织学和免疫组织化学结果表明动态环境下 DPSCs 表达更多的细胞增殖核抗原 Ki-67、I 型胶原、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)和牙本质基质蛋白 1(dentin matrix protein 1, DMP1),其增殖和成牙本质能力明显强于静态环境。动态环境下干细胞可获得充足的营养,在体内移植前处于最适活性状态。由此可见,三维动态培养环境更利于维持干细胞表型。

三维支架内部的细胞被人工材料包围,所处环境与体内环境不同,从而引出了无支架三维系统,又称为三维球体培养系统,其不需要支架而使细胞及细胞外基质三维聚集,模拟组织内细胞的生理环境,包括悬滴系统、低附着培养板球体系统、生物反应器和球团培养系统。Yamamoto 等^[13]利用低附着培养板球体系统使永生化小鼠牙乳头细胞球体聚集,诱导成牙本质/成骨表型分化,与单层贴壁细胞相比,细胞球体 DSPP、DMP1、ALP、OCN、骨形态发生蛋白-2 表达明显上调,形成更多矿化结节,组织学可见细胞球体分为细胞密集的外周区和细胞稀疏的核心区,核心区为外周区提供祖细胞,外周区细胞高表达 DMP1、ALP、神经营养蛋白和整合素信号相关蛋白,整合素信号传递给未分化的牙髓干细胞,使桩蛋白(paxillin)和 focal adhesion kinase (FAK)磷酸化,诱导干细胞表达 DMP1 和 ALP。Lee 等^[14]研究发现与单层细胞相比,球体 DPSCs 体外增殖及多向分化能力增强。

3 牙髓源性干细胞的体内成骨系统

多种生物材料可用作骨组织工程的体内支架载体,包括羟基磷灰石-磷酸三钙(hydroxyapatite-tricalcium phosphate, HA/TCP)、水凝胶、胶原等。临床上,支架是细胞粘附和增

殖所必需的,为机体重建提供支撑结构,可生物降解支架最终溶解并消失在体内。牙髓源性干细胞作为组织工程领域中理想的种子细胞,与生物支架结合,可应用于牙周组织再生、颌骨缺损修复等口腔颌面部组织工程领域^[4]。

生物支架可模拟细胞外基质的物理性质,充当细胞粘附、增殖和分化的载体。HA/TCP 目前已作为商业产品广泛应用于临床,具有良好生物相容性、优良的力学性能及生物降解性能。Asutay 等^[15]使用注射式 HA/TCP 与 DPSCs 共培养 24 h 后,移植至大鼠颅骨缺损处,8 周后 micro-CT 及组织学结果显示细胞+支架组骨密度及新生骨面积优于空白组和支架组,证明 DPSCs 负载于 HA/TCP 支架上可应用于骨再生。PLGA 支架可生物降解,具有高度多孔结构,提供容纳细胞的空间结构。Xavier 等^[16]将 SHED 负载于 PLGA 支架,体外成骨诱导 14 d,移植至大鼠颅骨缺损,60 d 后,体外诱导 SHED+支架组骨再生效果明显优于未诱导 SHED+支架组、单独支架组及空白对照组。透明质酸能形成连续的三维蜂窝状网络结构,因其具有良好的生物相容性、机械强度以及可塑性而成为一种理想的骨诱导支架材料。Petridis 等^[17]将 DPSCs 与透明质酸水凝胶复合物植入大鼠颅骨缺损 8 周后,骨再生效果优于空白组或支架组,但骨缺损均未完全愈合,认为细胞外基质样支架包裹干细胞后可构建三维复合体,一定程度上模拟体内环境,但也存在支架内部细胞难以扩散至缺损区域以及支架内部干细胞分布不均匀等问题。胶原等细胞外基质样支架具有良好的生物相容性、可降解性和低抗原性,为细胞粘附、增殖和分化提供良好的环境。Maraldi 等^[18]将 DPSCs 和羊水干细胞结合胶原支架植入大鼠颅骨缺损处,8 周后,组织学染色显示缺损区形成新骨组织,内含血管网络,血管内存在人源性干细胞。Chamieh 等^[19]针对胶原支架强度不足等问题,采用塑形压缩法增加胶原纤维密度,制备致密胶原支架,负载 DPSCs 后移植至大鼠颅骨缺损,5 周后 micro-CT 显示其骨密度和骨微结构相关参数显著增加,组织学观察显示纤维结缔及矿化组织体积显著增加,伴有 I 型胶原、ALP 的表达增加,缺损中心可见纤维与矿化组织同时存在,表明支架内部的细胞同样参与骨缺损修复,证实 DPSCs 负载胶原支架在骨再生领域的应用潜力巨大。

3D 打印是骨组织工程支架制作最有前途的技术之一,其具有多孔性,孔隙结构相互连接,便于输送营养物质和代谢废物,可设计成不同的形状和大小,适合于细胞的粘附和生长。Hilkens 等^[20]将负载 DPSCs 或 SCAP 的 3D 打印 HA 支架移植到免疫低下小鼠背部皮下,12 周后,组织学和 micro-CT 检查均显示形成血管化髓样组织及矿化组织,尽管新生组织的结构与人牙髓组织类似,但胶原含量明显降低。Li 等^[21]将冻干和传统方法制备的富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)包覆 3D 打印聚己内酯(polycaprolactone, PCL)支架来改善支架的生物学性能,体外研究结果表明冻干 PRP 能显著提高 DPSCs 成骨基因 ALP、RUNX2、OCN、OPN 表达水平,移植至大鼠颅骨缺损 5 周后,结果显示冻干

PRP-PCL 支架显著促进骨形成,骨再生面积大于传统 PRP-PCL 支架或 PCL 支架组,表明 3D 打印冻干 PRP 包覆 PCL 支架,可促进 DPSCs 成骨分化,促进骨再生。

然而,支架在降解过程中可能会引起机体炎症反应,特别是 PLGA 溶解使局部形成酸性环境,降低细胞的存活和迁移。同时,支架存在免疫原性和异种感染的可能。无支架三维球体系统可克服再生医学中的这些问题,但此技术在组织工程的临床应用是有限的,仍需要大样本及长时间观察其骨再生潜能。虽然牙髓源性干细胞被认为具有低免疫原性及免疫调节功能,但是免疫系统仍可能对移植的 MSCs 进行反馈调节,影响细胞的存活及分化^[22]。许多颅颌面缺损区域存在大量细菌,细菌本身及其触发的宿主炎症免疫反应,破坏组织平衡及再生,可能影响 MSCs 介导的骨再生^[23]。

4 展望

牙髓源性干细胞在再生医学及组织工程中的应用是非常有前景的。支架/无支架三维培养系统有利于维持干细胞表型,促进干细胞分化。然而支架降解、干细胞本身的免疫原性以及口腔环境中活跃的免疫反应可能影响干细胞的生物学性能,从而影响治疗效果。目前牙髓源性干细胞介导的骨组织工程仍然需要医务及科研工作者更深入研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(10):5807-5812.
- [3] Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study [J]. J Endod, 2008, 34(2):166-171.
- [4] Bakopoulou A, Abou I. Stem cells of dental origin: current research trends and key milestones towards clinical application [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016:4209891.
- [5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4):315-317.
- [6] Ledesma-Martinez E, Mendoza-Nunez VM, Santiago-Orsorio E. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: A review [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016:4709572.
- [7] Volponi AA, Gentleman E, Fatscher R, et al. Composition of mineral produced by dental mesenchymal stem cells [J]. J Dent Res, 2015, 94(11):1568-1574.
- [8] Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine [J]. J Dent Res, 2009, 88(3):249-254.
- [9] Kawashima N, Noda S, Yamamoto M, et al. Properties of dental pulp-derived mesenchymal stem cells and the effects of culture conditions [J]. J Endod, 2017, 43(9S):S31-S34.
- [10] Pecci-Lloret MP, Vera-Sanchez M, Aznar-Cervantes S, et

- al. Analysis of the adherence of dental pulp stem cells on two-dimensional and three-dimensional silk fibroin-based biomaterials [J]. J Craniofac Surg, 2017, 28(4):939-943.
- [11] Karadzic I, Vucic V, Jokanovic V, et al. Effects of novel hydroxyapatite-based 3D biomaterials on proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(1):350-357.
- [12] Li Y, He L, Pan S, et al. Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(2):873-878.
- [13] Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, et al. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells [J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(3):310-317.
- [14] Lee SH, Inaba A, Mohindroo N, et al. Three-dimensional sphere-forming cells are unique multipotent cell population in dental pulp cells [J]. J Endod, 2017, 43(8):1302-1308.
- [15] Asutay F, Polat S, Gül M, et al. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis [J]. Arch of Oral Biol, 2015, 60(12):1729-1735.
- [16] Xavier AG, Bernardi L, Braghirolli DI, et al. Nanofiber scaffolds support bone regeneration associated with pulp stem cells [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2014, 9(4):330-337.
- [17] Petridis X, Diamanti E, Goh T, et al. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold [J]. J Craniofac Surg, 2015, 43(4):483-490.
- [18] Maraldi T, Riccio M, Pisciotto A, et al. Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization [J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3):53.
- [19] Chamieh F, Collignon AM, Coyac BR, et al. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells [J]. Sci Rep, 2016, 6:38814.
- [20] Hilken P, Bronckaers A, Ratajczak J, et al. The angiogenic potential of DPSCs and SCAPs in an *in vivo* model of dental pulp regeneration [J]. Stem Cells Int, 2017, 2017:2582080.
- [21] Li J, Chen M, Wei X, et al. Evaluation of 3D-printed polycaprolactone scaffolds coated with freeze-dried platelet-rich plasma for bone regeneration [J]. Materials (Basel), 2017, 10(7): pii: E831.
- [22] Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration [J]. J Dent Res, 2012, 91(11):1003-1010.
- [23] Yang R, Yu T, Zhou Y. Interplay between craniofacial stem cells and immune stimulus [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):147.

[收稿日期:2018-05-03]

(本文编辑 关隽)