

# 人乳牙牙髓干细胞的研究进展

张雪芬 刘军权\*

(浙江卫未生物医药科技有限公司, 杭州金域医学检验所, 杭州 310053)

**摘要** 人乳牙牙髓干细胞具有较强的增殖能力及分化成身体各种类型细胞的潜能, 组织来源易得, 处理方便, 是细胞治疗和再生医学所需干细胞的理想来源。该文就其生物学特性、临床前研究及未来前景作一综述。

**关键词** 人乳牙牙髓干细胞; 间充质干细胞; 多向分化; 组织工程; 再生医学

## Research Progress of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth

Zhang Xuefen, Liu Junquan\*

(Zhejiang Weiwei Biomedical Science and Technology Co., Ltd;  
Hangzhou Golden Domain Medical Laboratory Co., Ltd, Hangzhou 310053, China)

**Abstract** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) have strong ability of proliferation and differentiate into various types of somatic cells. At the same time, the advantages of its source are readily available and easy to handle, making it an ideal source of cellular therapy and regenerative medicine. This article reviews its biological properties, preclinical studies and future prospects.

**Keywords** stem cells from human exfoliated deciduous teeth; mesenchymal stem cells; multiple-lineage differentiation; tissue engineering; regenerative medicine

人乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs)由Miura等<sup>[1]</sup>在2003年首次发现并命名, 是人脱落乳牙中分离得到的具有多向分化潜能和高度增殖能力的干细胞。SHEDs具有比恒牙更高的增殖能力和多向分化能力。SHEDs在适宜的体内或体外环境下具有分化为成牙本质细胞、肌细胞、肝细胞、成骨细胞、脂肪细胞、内皮细胞、基质细胞等多种子代组织细胞的能力; 并且SHEDs来自于自然脱落的乳牙, 收集废弃组织再利用, 更容易被人们接受。因此, SHEDs在再生医学的治疗中有很大的潜力。本文就SHEDs研究进展、临床前应用及未来前景作一综述。

### 1 SHEDs生物学特性

SHEDs来源于神经脊, 分布集中于血管周围,

在牙组织内散在分布, 是未分化的间充质干细胞, 具有极强的分化能力, 可分化为外周神经、神经胶质和骨骼肌等神经和外胚层间叶的子代组织。SHEDs表达间充质干细胞表面特异性标志物如CD146、CD90、CD73、CD44、CD105、基质细胞抗原STRO-1及一些蛋白质, 但不表达造血干细胞标志物CD34、CD45、淋巴细胞和白细胞的抗原<sup>[1]</sup>。

#### 1.1 增殖能力

研究显示, SHEDs比DPSCs(dental pulp stem cells)的增殖能力更强<sup>[1]</sup>。Nakamura等<sup>[2]</sup>通过溴脱氧尿苷检测实验证实, SHEDs比BMMSC(bone marrow derived mesenchymal stem cells)及DPSCs的增殖能力更强, 并且发现SHEDs内含有高于DPSCs的大量促进其增殖的生长因子, 其中包括成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)、转化生长

收稿日期: 2017-12-15

接受日期: 2018-02-24

\*通讯作者: Tel: 0571-86690968, E-mail: xzljq19600115@sina.com

Received: December 15, 2017

Accepted: February 24, 2018

\*Corresponding author: Tel: +86-571-86690968, E-mail: xzljq19600115@sina.com

网络出版时间: 2018-05-15 18:12:58

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1812.020.html>

因子- $\beta 2$ (transforming growth factor- $\beta 2$ , TGF- $\beta 2$ )等。

## 1.2 多向分化能力

1.2.1 向肝细胞样方向分化 Ishkitiev等<sup>[3]</sup>将乳牙牙髓分离培养到第三代的SHEDs, 用免疫磁珠分离得到CD117<sup>+</sup>细胞与hdSHED(hepatically differentiated SHED)在加有肝细胞生长相关因子的无血清DMEM中共培养, 随后移植到大鼠的脾脏中, 接着用大鼠脾脏做苏木精-伊红染色, 大鼠肝脏的组织学染色显示, 表达人肝脏标志物的细胞群遍布移植动物的再生器官, 并通过原位杂交证实存在表达最重要的人肝脏标志物白蛋白的细胞。

1.2.2 向成牙本质细胞方向分化 Veis等<sup>[4]</sup>研究发现, 牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)在牙本质中含量仅次于胶原的细胞外基质成分。Butler等<sup>[5]</sup>从老鼠牙本质基质提取物中发现一种特殊酸性糖蛋白, 其与骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)相似, 故而命名牙本质涎蛋白, 这两种蛋白质是SHEDs是否向成牙本质细胞分化的标志蛋白质。涎磷蛋白(DSPP)是DPP和DSP的前体蛋白质, 在牙本质细胞中高表达。

Shi等<sup>[6]</sup>应用原位杂交技术和蛋白质印记技术对DPSCs/SHEDs原代培养细胞进行检测没有发现DSP和DPP, 但是通过免疫组织化学法对DPSCs/SHEDs异种移植中发现, 异位矿化的早期有DSPP的存在。此结果说明, 牙髓来源的细胞在体外未诱导的情况下, 具有未分化的牙源性细胞的表型。SHEDs在体外进行诱导后可形成钙结节, 经免疫组化检测, 牙本质特异性蛋白质DSPP显阳性, 证实其可以分化为成牙本质细胞。他们又将体外扩增的SHEDs与羟基磷灰石/磷酸三钙支架混合植入裸鼠皮下, 发现可形成牙本质样结构, 但与DPSCs不同, SHEDs不能形成牙本质-牙髓复合体, 这一结果表明, SHEDs可在体内外分化成牙本质细胞, 进一步形成牙本质。Casagrande等<sup>[7]</sup>发现, 骨形成蛋白2能诱导SHEDs向牙本质细胞分化, 而阻断骨形成蛋白2信号通路后, SHEDs向成牙本质细胞分化的能力受到抑制。

1.2.3 向成骨方向分化 牙髓干细胞是牙髓组织中较早发育的细胞群, 通过对称和不对称分裂方式进行增殖, 在体外培养, 能分泌形成类牙本质样的矿化结节, 可作为骨组织缺损修复的理想种子。

研究证实, 牙髓干细胞在特定的因子诱导下

可以向成骨方向分化, 其中骨涎蛋白是矿化组织分化的晚期标志物之一, 可以抑制牙髓干细胞增殖并增强其成骨分化和矿化<sup>[8]</sup>。在成骨细胞中, BSP可增加成骨细胞相关基因的表达, 如RUNX2(runt-related transcription factor 2)、OSX(Osterix)及碱性磷酸酶和骨钙素, 最终促进骨组织的增加<sup>[9]</sup>。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种细胞外基质蛋白质, 具有组织特异性, 可以诱导SHEDs选择性分化为成骨细胞, 并且可促进成骨细胞的吸附和分化, 也是早期成骨分化的标志物<sup>[10]</sup>。Chadipirall等<sup>[9]</sup>发现, 视黄酸(retinoic acid)和胰岛素共同诱导SHEDs向成骨方向分化效果最佳, 其诱导后的SHEDs成骨基因的表达和碱性磷酸酶活性均高于地塞米松的诱导。而后, 也有研究者做过优化实验, 用含有不同浓度改良富血小板血浆(modified platelet rich plasma, mPRP)和FBS的培养基矿化诱导SHEDs, 并通过ALP检测细胞活性及实时定量PCR(quantitative Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测RUNX2和骨钙素(osteocalcin, OCN)的mRNA水平, 结果显示, 随着mPRP浓度的上调, SHEDs内RUNX2和OCN mRNA水平也随之上调<sup>[11]</sup>。这说明, 适宜浓度的mPRP对SHEDs的增殖及成骨分化有明显的促进作用<sup>[11]</sup>。

Su等<sup>[12]</sup>的研究表明, 锶可以成为SHEDs成骨的有效诱导剂, 他们将SHED包封在含有磷酸锶的水凝胶中进行实验, 结果表明, 细胞生长良好, SHEDs在水凝胶中增殖。此外, 在SHEDs的成骨分化过程中, 骨相关基因(包括I型胶原、RUNX2、OPN)和骨黏连蛋白(osteonectin, ON)的表达水平均上调。随后, Ba等<sup>[13]</sup>通过研究牙髓干细胞向成骨方向分化的机制发现, 细胞外信号调节蛋白激酶1/2(Erk1/2)和p38丝裂原活化蛋白激酶途径在调节间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)中的成骨和软骨形成分化中起重要作用, 他们的实验结果显示, 抑制Erk1/2能够增强牙髓干细胞的成骨分化, 而p38的抑制作用相反, 这一结果进一步证实了SHEDs具有向成骨方向分化的潜力。

1.2.4 向成脂方向分化 对于SHEDs的成脂分化潜能, 早在2003年, Miura等<sup>[1]</sup>在发现乳牙牙髓干细胞时, 通过成脂分化培养基诱导培养已发现此潜能。而后, Nan等<sup>[14]</sup>将达到70%融合的乳牙牙髓干细胞用成脂分化培养基诱导培养, 两周后进行油红O染色

及逆转录定量PCR(reverse-transcription quantitative PCR, RT-qPCR)分析, 油红O染色结果显示, 诱导两周后存在许多脂质空泡。此外, 与对照细胞相比, RT-qPCR结果显示, 诱导SHEDs中过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 2(peroxsomal proliferator activated receptor  $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 2)和脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)的表达明显增加; 特别是LPL增加到对照细胞的31.7倍。这一结果表明, SHEDs在诱导条件下能够分化为脂肪细胞。

**1.2.5 向神经方向分化** SHEDs是神经脊来源的干细胞, 能分化为神经细胞, 通过神经诱导液诱导培养后可形成神经球, 并且上调神经细胞特异性标志物——骨架蛋白、谷氨酸脱羧酶和神经元特异性核蛋白, 但是神经胶质细胞表面标志物表达无变化<sup>[1]</sup>。

Morszeck等<sup>[15]</sup>通过实验比较SHEDs、DPSCs和DFSC向神经方向分化的情况, 发现在自发或是加入诱导剂维甲酸和二甲基亚砷的情况下, SHEDs向神经方向分化的时间比DFSC快4倍左右, 在这3种标准培养基中有相似的生物学形态和干细胞标志物表达, SHEDs表达视网膜干细胞标志物(Pax6), 推测SHEDs有更好的神经细胞分化潜能。此后, 也有学者得出相同的结论<sup>[13]</sup>, 他们通过实验对SHEDs进行两阶段的诱导培养并进行免疫荧光分析发现, 第一阶段, SHEDs细胞形成玫瑰花簇; 第二阶段, 细胞呈现神经元样外观。RT-qPCR结果表明, TUJ1(neuronal class III  $\beta$ -tubulin)和Nestin都明显上调了。此外, 对神经元特异性标记TUJ1和GFAP进行免疫荧光染色, 结果显示这些神经元形细胞中TUJ1和GFAP高表达。所有这些结果表明, SHEDs能够分化成神经元样细胞。

Gazarian等<sup>[16]</sup>发现, 在特定的培养条件下神经脊基因p75、Hnk-1(human natural killer-1)和SOX10可以在SHEDs中被激活。他们用改良培养基, 补充了不同浓度(低于10%)的FBS或使用无血清的培养基, 加入表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)以补充缺少的血清生长因子, 并且在实验中添加BIO+REPSOX作为神经脊细胞生长的需求。结果发现, 在FBS浓度等于或低于2%时, 间充质SHEDs培养物含有可变数目的上皮样细胞, 加入不同浓度FBS的培养基, 诱导培养的SHEDs, 所表达的细胞表面标志物差异较大, 表达p75和Hnk-1的上皮

样细胞出现在无血清和含1% FBS的培养基中培养的SHEDs, 通过流式细胞术测定标志物发现, 细胞中p75和Hnk-1的表达比例较高。结果显示, 在无血清培养基中, SHEDs是表型上皮-间质细胞群, 含有高达58%的p75和34%的Hnk-1。同时, 结果分析显示, 这些细胞能共表达上皮细胞标志物p75和间充质细胞标志物CD73、CD105, 且约94%的细胞对于这些标志物是阳性的。

成纤维细胞样间充质细胞群在常规富含血清(10% FBS)的扩增培养基培养的SHEDs中, 超过94%细胞表达CD73、CD105和CD90; 神经脊标志物p75和Hnk-1仅有约2%是阳性的。多能干细胞分化的神经脊细胞已被证明在相似的血清富集条件下失去了上皮细胞标志物。这些实验的结果显示, 由于调节形态特征的基因的表达不稳定, 导致细胞转变成上皮样或成纤维细胞样表型。标志物和表型的变化都表明, 富含FBS扩增培养基更有利于细胞上皮-间质转换(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)。细胞的形态在FBS存在时是成纤维细胞样的, 而在神经脊介质中是上皮样的, 他们通过实验得出结论: 神经脊细胞和具有上皮表型的牙细胞共同表达神经脊(p75和Hnk-1)和间充质(CD73和CD105)基因, 可能促进间质-上皮转换(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)和上皮-间质转换之间的转变。

**1.2.6 向血管生成方向分化** 牙髓是高度血管化的疏松结缔组织, 近年来, 被证明能向血管方向分化, 这为组织工程化血管、组织损伤修复和组织再生提供了理想种子来源。

据报道, 牙髓干细胞起源于血管周围区域<sup>[1]</sup>, 而牙髓是高度血管化的组织, 说明体内血管生成对牙髓成功再生有着重要意义。Kim等<sup>[17]</sup>证实了SHEDs具有血管周围细胞的特征, 在体内微血管形成期间作为血管周围细胞的功能作用。他们通过定量PCR实验发现, SHEDs能表达血管周细胞标志物, 如NG2、 $\alpha$ -SMA( $\alpha$ -smooth muscle aorta)、PDGFR $\beta$ (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ )和CD146。还有一些研究者将细胞在含有100单位/mL青霉素、100 mg/mL链霉素和200 mmol/L L-谷氨酰胺并补充有10%热灭活的AB-HS(human serum)的Dulbecco's改良伊格尔培养基(DMEM)的基础生长培养基中培养, 发现培养出的细胞表达高水平的血管内皮生长因子(VEGF)和血

小板衍生生长因子-A(PDGF-A)等血管生成基因<sup>[18]</sup>。这些重要的发现证明, SHEDs具有向血管生成方向分化的潜能。

**1.2.7 向肌细胞方向分化** Xu等<sup>[19]</sup>利用TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )家族的两种细胞因子, 转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4), 诱导SHEDs分化为平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs), 通过分析SMCs特异性标志物的表达:  $\alpha$ -SMA(Alpha-smooth muscle actin)、SM22 $\alpha$ 、Calponin和SM-MHC(smooth muscle-myosin heavy chain), 证实了TGF- $\beta$ 1可诱导SHEDs分化为SMC。体外基质胶原血管生成测定显示, SHEDs分化的SMC和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)产生的血管结构与血管稳定性方面与原发性SMC和HUVEC相当。纤维蛋白凝胶测定显示, SHEDs分化而来的SMCs具有更强的促进血管形成的能力。纤维蛋白凝胶中蛋白质表达的进一步分析显示, 含有SHEDs分化的SMCs的培养物表现出比SMC组更高的纤连蛋白(fibronectin, FN)水平。此外, 还证实了SHEDs分化的SMCs具有功能性收缩性。当给予SB-431542特异性ALK5抑制剂时, TGF- $\beta$ 1刺激不能诱导SHEDs分化为SMCs, 说明SHEDs与SMCs的分化与TGF- $\beta$ 1-ALK5信号通路有某种关系。这一结果表明, SHEDs可以成功诱导用于血管组织工程的功能性SMC, 并且该过程可以通过ALK5信号通路调节, SHEDs是有希望的血管组织工程候选细胞类型。

## 2 SHEDs在临床前疾病治疗应用进展

### 2.1 SHEDs与肝脏疾病

相关学者研究表明, SHEDs能表现出更多肝细胞特征和更高的尿素代谢和糖原合成能力<sup>[20]</sup>。Ishkitiev等<sup>[21]</sup>将由SHEDs分化的肝细胞注射到大鼠发生肝硬化的肝脏中, 发现改善了大鼠的肝功能并提高了存活率。Yamaza等<sup>[22]</sup>报道, 移植的SHEDs改善了四氯化碳诱导的肝纤维化模型小鼠的肝功能障碍, 改善了炎症和纤维化。接着, Matsushita等<sup>[23]</sup>在研究右旋半乳糖胺导致的急性肝衰竭的小鼠模型实验中发现, 通过静脉注射SHEDs或培养SHEDs的无血清培养基到模型鼠体内, 可以显著改善受伤的肝脏并且提高存活率。通过少量的SHEDs和培养SHEDs

的无血清培养基的实验对比发现, 两者达到的治疗效果相似, 说明逆转ALF是通过SHEDs的旁分泌机制以抗炎方式发挥作用。这些研究者们再次证明, SHEDs治疗肝脏疾病的功效。

### 2.2 SHEDs与急性肾损伤

有研究者发现, 骨髓来源的干细胞分泌的细胞因子可以改善急性肾小管损伤后的肾功能<sup>[24]</sup>。而后, Hattori等<sup>[25]</sup>发现, SHEDs也能治疗急性肾损伤, 并且它的治疗作用归功于抗炎作用、抗细胞凋亡作用和旁分泌作用。他们在缺血性肾损伤的小鼠模型中发现, SHEDs肾上腺荚膜注射能对模型鼠的肾脏起保护作用, 并成功证明SHEDs的给药能减少炎症变化和组织损伤并改善急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)肾功能。研究者在划痕伤口愈合实验中, 证明了SHEDs有促进伤口愈合的作用, SHEDs分泌的因子促进细胞增殖和迁移的潜能。实验中, 向SHEDs-CM(conditioned medium from stem cells from human exfoliated deciduous teeth)中加入抗HGF抗体, 结果TEC伤口愈合显著减少。实验结果表明, SHEDs产生和分泌HGF(hepatocyte growth factor), 促进TEC的恢复。此研究表明, SHEDs可以降低免疫反应性胰岛素引起的AKI炎症细胞因子水平并改善肾功能。SHEDs分泌因子降低MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)表达且增加HGF的表达, 并能促进伤口愈合。这些结果表明, SHEDs作为一种新型的干细胞资源, 可用于治疗缺血性肾损伤。

### 2.3 SHEDs与糖尿病

Lv等<sup>[26]</sup>在研究SHEDs在患有糖尿病足溃疡的Sprague-Dawley大鼠模型中的作用机制发现, SHEDs给药类似于间充质干细胞(MSCs), 可以加速伤口愈合, 促进血管生成并抑制糖尿病溃疡大鼠模型的炎症反应。他们分别用SHEDs、MSC和PBS对糖尿病溃疡大鼠进行处理, 通过ELISA检测SHEDs和MSC组大鼠模型中血清VEGF、IL-1 $\beta$ 、TNF-1 $\alpha$ 和IL-10水平。实验结果表明, SHEDs和MSCs移植均可以缓解炎症的严重性并同时加快大鼠模型中糖尿病引起的慢性伤口的愈合。

Kim等<sup>[27]</sup>研究结果表明, 锌补充有助于将SHEDs转化为SHED- $\beta$ 细胞。此外, 锌增加与SHED- $\beta$ 细胞中ZIP8(Zrt- and irt-like protein 8)的表达增加密切相关。另一项研究得出结论, ZIP6和ZIP7在人胰岛和 $\beta$ 细胞系中维持锌的稳态<sup>[12]</sup>。因此, ZIP8可能是参与

调节胰岛素生成和分泌的转运蛋白质。这一结果证实, ZIP8可能是SHED- $\beta$ 细胞中重要的功能转运蛋白质, 通过细胞内锌水平的调节对胰岛素的产生至关重要, 并发现ZIP8的增加和锌的上调是SHEDs分化为SHED- $\beta$ 细胞分化过程的重要因素。他们通过实验发现, 随着SHEDs分化为SHED- $\beta$ 细胞, ZIP8表达也随之增加, 并且锌的补充能增加大多数胰腺 $\beta$ 细胞标志物的水平, 特别是胰岛素和葡萄糖转运蛋白2(GLUT2), 从而证实SHED- $\beta$ 细胞能够成功产生胰岛素。此外, 锌的补充增加了胰岛素分泌, SHED- $\beta$ 细胞中ZIP8转运蛋白质也明显升高。他们通过这一研究得出四点结论: (1)当SHED转化为SHED- $\beta$ 细胞时,  $\beta$ 细胞分化标志物出现; (2)随着SHED分化为SHED- $\beta$ 细胞, ZIP8表达增加; (3)锌补充增加了SHED- $\beta$ 细胞的胰岛素分泌; (4)通过ZIP8的升高能增加胰岛素分泌。

#### 2.4 SHEDs与自身免疫性脑脊髓炎

有学者通过研究发现, SHEDs可以产生抗炎因子并在体内起平衡作用, 有助于恢复由炎症反应、感染或损伤而产生的紊乱环境的平衡, 并推测SHEDs可以作为自身免疫和炎症疾病临床免疫治疗的潜在细胞<sup>[28]</sup>。而后, Shimojima等<sup>[29]</sup>通过研究SHED-CM在治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠脊髓炎(myelitis, MS)模型中的疗效的实验中发现, SHED-CM和ED-Siglec-9具有治疗自身免疫性疾病的潜力。他们通过单次注射SHED-CM治疗EAE小鼠, 结果显示, 减少了脱髓鞘和轴突损伤, 并降低了脊髓中炎症细胞浸润和促炎细胞因子的表达。SHED-CM还抑制髓鞘少突胶质细胞糖蛋白特异性CD4<sup>+</sup> T细胞的增殖及其在体外产生促炎细胞因子。他们通过用分泌的唾液酸结合胞外域的EAE小鼠处理SHED-CM的主要成分的Ig样凝集素-9, 证实了SHED-CM治疗的效果。实验数据表明, SHED-CM和分泌唾液酸结合Ig样凝集素-9的胞外域可能是自身免疫性疾病如MS的新型治疗方法。他们还发现, 它们可能是具有长期作用的高效治疗。SHED-CM显示, 在EAE小鼠中具有独特的免疫调节能力; 它抑制炎症并诱导抗炎微环境。此外, SHED-CM在其他炎症模型中显示出治疗功效, 包括大鼠脊髓损伤模型和新生小鼠缺血缺血性脑损伤。与临床使用十年的MSC治疗相比, SHED-CM和ED-Siglec-9可能代表

更安全的非细胞治疗, 但该治疗的长期致瘤风险尚未进行评估。

自身免疫性脑脊髓炎(autoimmune encephalomyelitis, EAE)是由CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞所介导的自身免疫性疾病, 其中EAE复愈的机制之一是中枢神经系统中浸润的单个核细胞减少凋亡进而被清除。Rossato等<sup>[30]</sup>发现, 人的SHEDs具有很大的治疗潜力, 他们首先评估了EAE实验模型的免疫调节作用, 并调查了使用Foxp3 GFP<sup>+</sup>转基因小鼠(C57Bl/6-Foxp3GFP)的EAE模型中SHED给药对临床体征和细胞模式的影响。结果表明, SHED输注后, 改善了EAE临床评分, 使中枢系统中浸润的单个核细胞明显减少, 其中包括IFN- $\gamma$ 阳性的CD8<sup>+</sup> T细胞, IL-4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>、IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和IL-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T细胞。此外, 还观察到, SHED促进了EAE受影响动物脾脏CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T细胞群体的显著增加。综上结果表明, SHED可以周期调节CD4<sup>+</sup> T细胞反应, 证实SHED将作为与中枢神经系统(central nervous system, CNS)相关的自身免疫疾病的细胞治疗效应细胞。

#### 2.5 SHEDs与自其他疾病

血管再生是缺血性心脏病的潜在治疗方法, Iohara等<sup>[31]</sup>研究发现, 牙髓细胞的侧群体(side population, SP)具有血管发生的性质。他们从牙髓中分离出高度血管生成的SP细胞亚群, 并且标志基因CD31和CD146显阳性。因此, 他们进一步提出, 这些SP细胞是干细胞的新来源, 其刺激组织中的血管发生, 并可用于缺血性心脏病治疗<sup>[32]</sup>。

牙周炎是一种慢性炎症性疾病, 导致牙槽骨破坏, 由于牙周病变、细菌的感染以及某些遗传或环境因素导致牙齿脱落。相关报道表明, SHEDs是有效的免疫调节剂, 它们非常适合组织再生<sup>[33]</sup>。Ikeda等<sup>[34]</sup>通过将牙胚细胞移植到失去的牙齿区域的牙槽骨中, 成功地在成年小鼠中再生并植入了完整功能的牙齿, 且表现出正常的牙齿结构、硬质矿化组织、对机械应力及疼痛等有害刺激的充分反应。Kim等<sup>[17]</sup>报道, 用2种不同孔径的丝素蛋白制成的支架培养大鼠牙芽细胞, 将支架置于免疫缺陷的无胸腺成年大鼠的网膜中20周, 在两个支架中形成组织, 经组织学分析揭示了矿化的骨质疏松样组织存在。虽然大多数牙组织可再生, 但是为了实现天然牙齿的正确布置, 成功率仅为15%~20%。需要进一步的研究才能实现适合人类使用的可复制和结构合适

的牙齿。

乳牙牙髓干细胞起源于神经脊, 具有强大的神经源性及免疫抑制活性, 这些属性使它们成为治疗神经变性疾病的更好候选者。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是导致痴呆和智力下降的最常见的神经退行性疾病之一, 其病理特征主要是 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )沉积形成的细胞外老年斑和Tau蛋白过度磷酸化形成的神经细胞内神经原纤维缠结。Ahmed等<sup>[35]</sup>评估了牙髓干细胞分泌物对AD的治疗潜力, 他们的研究表明, 牙髓干细胞分泌的活性因子能够降低A $\beta$ 1-42对神经母细胞瘤细胞的毒性作用, 分泌物中的A $\beta$ 降解酶抑制了A $\beta$ 1-42诱导的细胞凋亡反应; 并且证实了牙髓干细胞能分泌VEGF(vascular endothelial growth factor vascular endothelial growth factor)、RANTES(regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted)、FRACTALKINE、FLT-3(Fms-like tyrosine kinase 3)和MCP-1等可能参与减少神经毒性的重要生长因子和细胞因子过程。他们实验结果表明, 牙髓干细胞分泌物能够有助于清除大脑中积累的A $\beta$ , 推测牙髓干细胞的分泌物可治疗AD。总之, 牙髓干细胞分泌物在神经衰退性疾病中具有很高的治疗潜力。目前, 国内外实验数据都基于动物模型基础上获得, 对于临床应用报道少见。所以临床用量、临床适应症以及疗效监测点都未知。我们实验室已从人脱落乳牙分离培养出干细胞和定向诱导分化成不同类型的干细胞, 一颗乳牙髓经3周培养可使干细胞扩增1 000~10 000倍。

### 3 展望

上述研究表明, 乳牙牙髓干细胞具有较强的增殖能力及多向分化的潜能, 安全性高。大量的临床前动物模型已证实, SHEDs在治疗肝脏疾病、肾脏疾病、神经系统疾病、免疫系统疾病、伤口愈合、糖尿病、缺血性心脏病及牙周炎等有显著疗效, 并且SHEDs免疫原性低, 来源方便。因此, 在未来对于这些疾病的细胞治疗上, SHEDs可能具有巨大的潜力。同时, SHEDs在治疗骨和牙组织再生、再生医学及组织工程领域有广泛的应用前景。随着SHEDs研究的不断进展, 它们的应用将随着技术的进步而扩大。未来乳牙干细胞将成为一种成熟的干细胞来源被广泛应用。

### 参考文献 (References)

- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(10): 5807-12.
- Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod* 2009; 35(11): 1536-42.
- Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Fushimi N, Mitev V, Okada M, *et al.* Novel management of acute or secondary biliary liver conditions using hepatically differentiated human dental pulp cells. *Tissue Eng Part A* 2015; 21(3/4): 586.
- About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation *in vitro* of human pulp cells into odontoblasts. *J Biomed Mater Res* 2002; 63(4): 418-23.
- Butler WT, Bhowm M, Dimuzio MT, Linde A. Noncollagenous proteins of dentin. Isolation and partial characterization of rat dentin proteins and proteoglycans using a three-step preparative method. *Coll Relat Res* 1981; 1(2): 187-99.
- Shi S, Bartold P M, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005; 8(3): 191-9.
- Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 2010; 89(6): 603-8.
- Xia B, Wang J, Guo L, Jiang Z. Effect of bone sialoprotein on proliferation and osteodifferentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Biologicals* 2011; 39(4): 217-23.
- Gordon J, Hunter G, Goldberg H. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by bone sialoprotein regulates osteoblast differentiation. *Cells Tissues Org* 2009; 189(1/2/3/4): 138-43.
- Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, Murray PE, *et al.* Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res* 2010; 340(2): 323-33.
- 文 军, 段建民, 李洪涛, 李斯翰, 李 鑫, 吴补领. 改良富血小板血浆促进乳牙牙髓干细胞成骨分化作用研究. *实用口腔医学杂志* (Wen Jun, Duan Jianmin, Li Hongtao, Li Sihan, Li Xin, Wu Buling. Modified platelet-rich plasma promotes the osteogenic differentiation of stem cells from human deciduous teeth. *Journal of Practical Stomatology*) 2014; 30(6): 805-8.
- Su WT, Chou WL, Chou CM. Osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth induced by thermosensitive hydrogels with strontium phosphate. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 52: 46-53.
- Ba P, Duan X, Fu G, Lv S, Yang P, Sun Q. Differential effects of p38 and Erk1/2 on the chondrogenic and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Mol Med Rep* 2017; 16(1): 63-8.
- Zhang N, Chen B, Wang W, Chen C, Kang J, Deng SQ, *et al.* Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Mol Med*

- Rep 2016; 14(1): 95-102.
- 15 Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, *et al.* Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation *in vitro*. Clin Ora Inv 2010; 14(4): 433-40.
- 16 Gazarian KG, Ramírezgarcía LR. Human deciduous teeth stem cells (SHED) display neural crest signature characters. PLoS One 2017; 12(1): e0170321.
- 17 Kim JH, Kim GH, Kim JW, Pyeon HJ, Lee JC, Lee G, *et al.* In vivo angiogenic capacity of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with human umbilical vein endothelial cells. Mol Cells 2016; 39(11): 790-6.
- 18 Paino F, Noce ML, Giuliani A, De Rosa A, Mazzoni S, Laino L, *et al.* Human DPSCs fabricate vascularized woven bone tissue: a new tool in bone tissue engineering. Clin Sci (Lond) 2017; 131(8): 699-713.
- 19 Xu JG, Zhu SY, Heng BC, Dissanayaka WL, Zhang CF. TGF- $\beta$ 1-induced differentiation of SHED into functional smooth muscle cells. Stem Cell Res Ther 2017; 8(1): 10.
- 20 Ishkitiev N, Calenic B, Aoyama I, Yaegaki K, Imai T. Hydrogen sulfide increases hepatic differentiation in tooth-pulp stem cells. J Breath Res 2012; 6(1): 017103.
- 21 Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Fushimi N, Mitev V, *et al.* Novel management of acute or secondary biliary liver conditions using hepatically differentiated human dental pulp cells. Tissue Eng Part A 2015; 21(3/4): 586-93.
- 22 Yamaza T, Alatas FS, Yuniartha R, Yamaza H, Fujiyoshi JK, Yanagi Y, *et al.* *In vivo* hepatogenic capacity and therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in liver fibrosis in mice. Stem Cell Res Ther 2015; 6(1): 171.
- 23 Matsushita Y, Ishigami M, Matsubara K, Kondo M, Wakayama H, Goto H, *et al.* Multifaceted therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for acute liver failure in rats. J Tissue Eng Regen Med 2017; 11(6): 1888-96.
- 24 Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. J Am Soc Nephrol 2007; 18(9): 2486-96.
- 25 Hattori Y, Kim H, Tsuboi N, Yamamoto A, Akiyama S, Shi Y, *et al.* Therapeutic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in models of acute kidney injury. PLoS One 2015; 10(11): e0143561.
- 26 Lv Y, Ge L, Zhao Y. Effect and mechanism of SHED on ulcer wound healing in Sprague-Dawley rat models with diabetic ulcer. Am J Transl Res 2017; 9(2): 489-98.
- 27 Kim G, Shin KH, Pae EK. Zinc up-regulates insulin secretion from  $\beta$  cell-like cells derived from stem cells from human exfoliated deciduous tooth (SHED). Int J Mol Sci 2016; 17(12): 2092.
- 28 Silva Fde S, Ramos RN, de Almeida DC, Bassi EJ, Gonzales RP, Miyagi SP, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. PLoS One 2014; 9(5): e98050.
- 29 Shimojima C, Takeuchi H, Jin S, Parajuli B, Hattori H, Suzumura A, *et al.* conditioned medium from the stem cells of human exfoliated deciduous teeth ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2016; 196(10): 4164-71.
- 30 Rossato C, Castro SB, Camara NO, Brandão WN, de Almeida DC, Maranduba CM, *et al.* Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth reduce tissue-infiltrating inflammatory cells improving clinical signs in experimental autoimmune encephalomyelitis. Biologicals 2017; 49: 62-8.
- 31 Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, *et al.* A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. Stem Cells 2008; 26(9): 2408-18.
- 32 Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: applications in futureregenerative medicine. World J Stem Cells 2015; 7(5): 839-51.
- 33 Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, *et al.* Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. J Physiol Pharmacol 2014; 65(3): 327-39.
- 34 Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, *et al.* Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. J Physiol Pharmacol 2014; 65(3): 327-39.
- 35 Ahmed Nel-M, Murakami M, Hirose Y, Nakashima M. Therapeutic potential of dental pulp stem cell secretome for Alzheimer's disease treatment: an *in vitro* study. Stem Cells Int 2016; 23: 1-11.