

综述

应用牙源干细胞进行组织损伤修复的研究进展

邓琴南^{1,2} 张彬^{2,3} 高君宇³ 韩发彬^{2,3*}¹Dr. Samuel QN. Deng Dental Clinic, San Francisco, CA94123, USA;²聊城市人民医院/泰山医学院聊城临床学院, 山东省口腔颌面医学生物学重点实验室, 聊城 252000;³聊城市人民医院/泰山医学院聊城临床学院, 干细胞与再生医学重点实验室, 聊城 252000)

摘要 牙源干细胞是由人类牙齿及其周围相关组织中分离出的间充质干细胞。自2000年从牙髓组织中发现和分离出牙髓干细胞以来, 已有7种牙源干细胞被分离和鉴定。近年来, 学者不但对这些干细胞的分离、鉴定、生物学特征和功能进行了大量基础方面的研究, 而且对其临床应用也作了广泛的探讨。该文对牙源干细胞在口腔科学领域的应用, 如牙体、牙髓和牙周组织的修复和再造的最新研究进行综述, 并对它们在全身疾病的治疗潜能方面作概括的介绍, 如在治疗脑血管意外损伤、脊髓神经损伤、帕金森氏病、心肌梗死、糖尿病和免疫缺陷性疾病等方面的研究, 以促进牙源干细胞在基础与临床应用方面的深入研究。

关键词 牙源干细胞; 牙髓干细胞; 口腔颌面; 牙周组织; 组织修复

The Research Advance in Application of Dental Stem Cells for Repairing Injured Tissues

Deng Qinnan^{1,2}, Zhang Bin^{2,3}, Gao Junyu³, Han Fabin^{2,3*}

¹Dr. Samuel QN. Deng Dental Clinic, San Francisco, CA94123, USA; ²Shandong Provincial Key Laboratory for Oral & Facial Medical Biology, Liaocheng People's Hospital/the Affiliated Liaocheng Hospital, Taishan Medical University, Liaocheng 252000, China; ³Center for Stem Cells and Regenerative Medicine, Liaocheng People's Hospital/the Affiliated Liaocheng Hospital, Taishan Medical University, Liaocheng 252000, China)

Abstract Dental stem cells (DSCs) are mesenchyme stem cells isolated from human teeth and the associated tissues around the teeth. Since the isolation of dental pulp stem cells (DPSCs) from dental pulp of teeth in the year of 2000, seven kinds of dental stem cells have been isolated and characterized. In recent years, researches on the characterization and biological functions of DSC have been widely investigated in the basic and clinical application of DSC. This review summarized the recent progress in using DSC to repair the teeth and teeth-associated tissues. In addition, the research applications of DSC in stroke, spinal cord injury, Parkinson's disease, cardiac infarction, diabetes and immune-deficient disorders are discussed in this review.

Key words dental stem cells; dental pulp stem cells; oral-facial tissues; soft periodotal tissues; tissue srepairing

收稿日期: 2014-09-01 接受日期: 2014-10-11

山东省科技发展计划项目(批准号: 2012GGA15049)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0635-8278427, E-mail: hanfabin2@gmail.com

Received: September 1, 2014 Accepted: October 11, 2014

This work was supported by the Developmental Fund of Shandong Science and Technology Department of Shandong Province (Grant No.2012GGA15049)

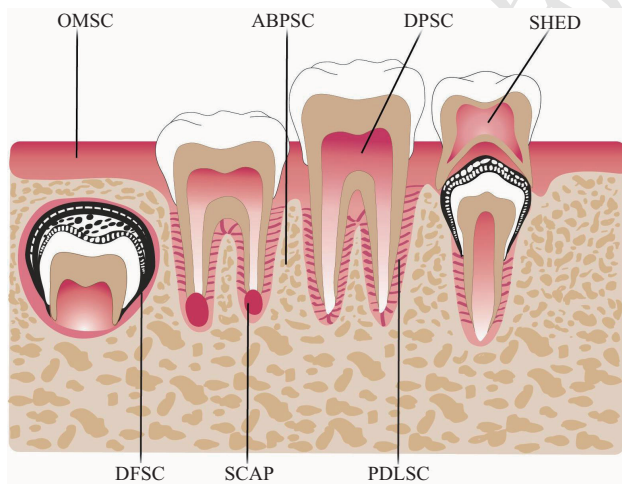
*Corresponding author. Tel: +86-635-8278427, E-mail: hanfabin2@gmail.com

网络出版时间: 2014-12-01 10:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.12.9003.html>

1 牙源干细胞概述

自2000年Gronthes分离出牙髓干细胞以来,牙源干细胞(dental stem cells, DSCs)的研究引起越来越多学者的重视。至今,已从人类牙齿相关组织中分离和鉴定出7种干细胞:(1)牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)^[1],来自恒牙牙髓;(2)人类脱落乳牙牙髓干细胞(stem cell from the pulp of human exfoliated deciduous teeth, SHED)^[2],来自儿童脱落乳牙的牙髓;(3)根尖乳头干细胞(stem cell from the apical papilla, SCAP)^[3-4],来自牙根发育未完成的根尖乳头;(4)牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSC)或牙周膜祖细胞(periodontal ligament progenitor cell, PDLPC)^[5-6],均来自牙周膜;(5)人类智齿牙滤泡祖细胞(precursor cell from human dental follicle of wisdom teeth, PC)^[7],或称为牙囊干细胞(dental follicle stem cell, DFSC)^[4],来自智齿牙囊;(6)牙槽骨干细胞(alveolar bone proper derived stem cell, ABPSC)^[8],来自牙槽骨骨髓;(7)牙龈/口腔黏膜干细胞(gingival/oral mucosa stem cell, OMSC)^[8-11],来自牙龈黏膜下结缔组织或来自牙胚的间充质干细胞(mesenchymal stem cell from tooth germ)^[12],其来源属于牙髓干细胞;另外还有根尖牙囊干细胞(periapical follicle stem



OMSC: 牙龈/口腔黏膜干细胞; ABPSC: 牙槽骨干细胞; DPSC: 牙髓干细胞; SHED: 人类脱落乳牙牙髓干细胞; DFSC: 牙囊干细胞; SCAP: 根尖乳头干细胞; PDLSC: 牙周膜干细胞。

OMSC: gingival/oral mucosa stem cell; ABPSC: alveolar bone proper derived stem cell; DPSC: dental pulp stem cell; SHED: stem cell from the pulp of human exfoliated deciduous teeth; DFSC: dental follicle stem cell; SCAP: stem cell from the apical papilla; PDLSC: periodontal ligament stem cell.

图1 不同牙源干细胞的来源组织部位

Fig.1 Sources and locations of dental stem cells

cell, PAFSC)^[13],属于上述的SCAP。牙源性干细胞具有间充质干细胞的功能特性和多向分化能力,并表达间充质干细胞的表面标志物如CD44、CD73、CD105,但不表达CD34和CD45^[9,14]。不同来源的牙源干细胞如图1所示。

2 牙源干细胞在口腔科学的应用研究

在牙齿组织工程研究中,目前常用的是牙髓干细胞(DPSC),DPSC和SHED具有许多优点^[12,15]:(1)来自自体,易于采集,产生并发症可能性很低;(2)来自阻生牙的DPSC或乳牙牙髓的SHED都能进行有效的分离和扩增,并有较强的增殖分化能力;(3)生成牙釉质和牙本质细胞能力较强;(4)具有免疫抗炎能力,有利于异体移植研究与应用。根据牙齿组织再生的目的不同,可以选用不同的牙源干细胞。DPSC主要用于牙髓及牙本质的修复重建;SCAP主要用于牙根的生成;PDLSC和PDLPC则偏重牙周组织的重建。在临床上主要是利用干细胞的分化和再生潜力促进组织愈合和再生^[9,15-16]。

2.1 牙本质/牙髓组织的修复和再生

近年研究报道,DPSC、SHED和SCAP都具有一定多向分化潜能,其中包括形成牙本质/牙髓样复合体^[4,17-19]。目前牙本质/牙髓组织修复和再生方法主要有以下几种。

(1)将牙源干细胞直接植入牙髓腔。Nakashima等^[20]用电穿孔技术将BMP-2基因导入DPSC,再植入自体牙髓,发现移植到犬牙牙髓损伤模型中的DPSC形成修复性牙本质。他们将DPSC或DPSC+BMP-2移植到犬牙牙髓腔,可以显著地促进牙本质/牙髓复合体的修复和再生。Gotlieb等^[21]研究报道,用牙源干细胞再生牙髓组织可以代替传统的根管治疗。

(2)将牙源干细胞与支架结合植入牙髓腔。上述将干细胞直接植入牙髓腔的方法较难成功,关键问题是来自根尖孔的血供不能满足干细胞的生存需要以及牙髓组织本身自愈和再生力有限。Iohara等^[22]报道,从DPSC中分离出CD105⁺细胞亚群移植到活体猎犬可以再生牙髓。他们将CD105⁺牙髓干细胞与胶原支架结合置入根管下部。根管上部加入细胞因子SDF-1和磷酸锌黏固粉覆盖并以光敏塑胶充填,90天后新生的牙髓样组织生长到釉牙本质与黏固粉接触界面,其内有类似正常人的牙髓细胞、新生毛细血管和神经突触从根尖孔长入新生牙髓。所以,Iohara等^[22]认为,DPSC的CD105⁺亚群对人类牙髓组

织的再生与修复具有更重要的临床应用潜力。

(3)将牙源干细胞和支架材料先植入动物体内,再取出植入人体牙髓腔。Huang等^[23]报道,将DPSC或SCAP种植到聚合物支架上并移植到小鼠的皮下。经过一定时间,将此含牙源干细胞的支架取出,再植入人体根管。结果发现,有新生血管生长入人体牙髓组织,并形成牙本质样组织生长在根管内壁上。但是这层再生的牙本质样组织与天然的不同,如无牙本质小管及牙本质细胞形态异常等。

(4)将牙源干细胞和支架材料种植在人类牙齿组织块上,再植入动物体内。Prescott等^[17]将DPSC、胶原支架和DMP-1组成的结合体置于牙本质的人工穿孔处,再植入裸鼠的皮下生长。在裸鼠体内生长6周后,可见穿孔处有良好的牙本质/牙髓复合体生成。Cordeiro等^[24]将SHED种植在生物支架上,再将此支架植入人类牙片内。结果发现,有类似生理性牙髓组织形成。通过透射电镜和免疫组化实验研究表明,移植的SHED能够分化为牙本质细胞和血管内皮细胞。Sakai等^[25]通过牙片模型(tooth slice model)研究发现,以多聚乳酸(poly-L-lactic acid, PLLA)支架和DPSC再生的人工牙髓上有新生牙本质形成。

2.2 牙周组织的修复和再生

He等^[26]较早进行了牙周再生的研究。随后, Yen等^[27]进行了“全牙再生”的研究。牙周组织主要包括上皮、牙骨质、牙槽骨和牙周膜四种组织,其再生需要细胞、信号分子、血管和支架材料四种成分才能形成完整的牙周组织。不同类型的干细胞组合可以作为牙周组织修复和再生的干细胞来源。

(1)单独使用一种干细胞进行牙周组织修复。由于PDLSC和PDLP可以衍生出牙周膜,并可分化为成骨细胞、成牙骨质细胞和成纤维细胞,因此首选PDLSC和PDLP进行牙周组织修复。其他可以利用的干细胞包括骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSC)、脂肪干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)和胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)。Dangaria等^[28]对牙髓干细胞、牙周干细胞和牙滤泡干细胞进行比较研究发现,牙周膜干细胞产生并表达骨膜素(periostin)和腱蛋白(scleraxis)最高。牙周膜干细胞在天然牙根表面一般经3周培养后能形成新的牙周膜。若将此牙根植入牙槽骨,即可形成新的牙周膜并与牙槽稳定固位。另外可将其他的干细胞先与牙周膜(PDL)细胞

共同培养,使其获得PDLSC的特性,再用于牙周组织的再生修复^[26]。

(2)两种牙源干细胞联合进行牙周组织的修复。将SCAP和PDLSC结合支架材料,用于修复和再生牙周组织。近年的研究包括以下几种方法:第一,将干细胞直接植入缺损区。Seo等^[6]在免疫抑制的大鼠下颌磨牙区造成牙周手术缺损,然后将人体PDLSC植入,结果发现,6例样本中有2例可见PDLSC融入牙周膜的部位,并有少量PDLSC附着在牙槽骨和牙齿的表面。这些发现表明,PDLSC具有促进牙周再生的作用。第二,将干细胞先在体外培养、扩增和定向分化,再用于牙周缺损修复。Yamada等^[29]将自体骨髓间充质干细胞(BMMSC)在体外培养和定向分化后,与富含血小板的血浆混合再用于修复牙周缺损,发现修复效果明显提高。Kawaguchi等^[30]用自体骨髓间充质干细胞在体外扩增,然后移植到动物模型的牙周缺损区,发现4周后缺损完全修复。虽然BMMSC并非牙源干细胞,但BMMSC和牙源干细胞同属间充质干细胞(MSC),因而它们具有相似的功能。第三,干细胞移植与常规牙周手术结合。特别是施行深部洁治和根面平整术(scaling and root planning, SRP)时,通常干细胞移植与传统的牙周炎治疗相结合才能取得更好的治疗效果^[24,31]。

(3)干细胞与细胞生长因子及辅助材料结合修复牙周组织。目前常用的细胞生长因子有TGF- β 、bFGF、BMP、IGF-1、PDGF、BMP-2和Emdogain等。应用这些细胞因子使牙源干细胞处于一个类似天然微环境条件下更好的发挥作用。有研究者使用PDLSC、PDGF和BMP,结果发现牙周组织的三个组成部分均能得到再生修复。将干细胞SCAP和PDLSC置入颗粒性的羟化磷灰石/磷酸三钙(HA/TCP)组成的支架上,然后植入猪的牙槽可见牙根/牙周组织复合体的形成。另外将多聚糖酸(polyglycolic acid, PLGA)支架材料与PDLSC结合用于牙周修复也取得明显效果^[27]。初期的支架制造过程复杂、做成的支架与牙周缺损形状相差较大,而且无法控制成品支架小孔的状态。近年发展的3D快速成形(rapid prototyping, RP)加上纳米技术,可以克服以上缺陷,并能在几个小时内形成3D个体化支架,开拓了用干细胞与支架材料结合修复牙周组织缺损的新方法^[26]。

Park等^[13]报道,在猎犬的牙周用手术造成巨大

缺损并用异物引发炎症,然后将三种牙源性干细胞PDLSC、DPSC和PAFSC(根尖牙囊干细胞,取自未成熟的根尖部牙囊组织,属于SCAP)通过与颗粒载体结合,分别置入缺损区,结果发现,三种牙源干细胞移植2个月后,实验组动物的牙周袋变浅,牙槽骨、牙周膜和牙骨质都有再生,组织学检查发现,牙周膜中的Sharpey氏纤维能长入牙骨质,还可见明显的外周神经和新生血管生成。以上三种牙源干细胞以PDLSC修复效果最好,PAFSC次之,DPSC居第三。该研究对牙源干细胞治疗重症牙周炎的机理进行了探讨,结果提示,牙源干细胞除了能提供再生的细胞之外,还可通过阻止上皮细胞向根尖方向的生长,提供组织再生需要的空间,激发受体本身的间充质干细胞及调节免疫和抗炎作用促进组织再生。Fawzy等^[32]报道以牙龈干细胞进行牙周再生的研究,他们用猪的牙齿模型造牙齿巨大缺损。将边缘性牙龈内结缔组织分离的牙龈干细胞分别与两种不同的支架(无机脱蛋白网状骨支架和有机的胶原支架)结合置入缺损区。细胞移植前后均作牙周炎的临床表现和组织学检查。结果显示,牙龈干细胞与支架植入12周后,牙周炎临床表现中牙周袋深度和牙龈萎缩程度改善均显著高于对照组,组织学的检测可见牙周组织的再生如牙槽骨高度、附着上皮和结缔组织再生均有显著改善,并有规则的Sharpey氏纤维插入牙骨质。此研究表明,通过干细胞与支架的移植,可以使有出血、骨缺损、牙周袋加深和牙龈萎缩的牙周炎组织得以再生修复。Feng等^[5]应用PDL对3例患者的16颗牙进行治疗牙周炎的临床研究。他们先拔除患者第三磨牙,从牙周膜中分离PDL和体外扩增,然后和生物骨移植材料(CALCITITE4060-2)一起置入自体牙周炎病人患牙的骨下缺损处。移植PDL后发现牙周袋深度下降、牙龈回缩,临床患牙松动度下降及牙周组织得到重建。术后72个月X线检查显示牙周的骨质重建和支架逐步吸收。所有的患者均未发现局部和全身的不良反应。He等^[26]提出了以牙源性干细胞再生牙周组织的基本过程包括:(1)收集干细胞、冷藏备用。(2)在临床使用之前,将需要的细胞因子(如BMP、PDGF、TGF- β 和FGF-2等)导入牙源干细胞。(3)应用CT或MRI收集患者个体的牙周缺损资料,以此制作个体化模型。(4)选择要使用的支架材料和RP技术。(5)制作符合个体缺损的并能与干细胞相结合的复合支架。(6)将

牙源干细胞与支架复合物植入牙周组织缺损区观察修复效果。

2.3 牙体的再生

目前的植牙术缺乏天然牙根的外形和牙周膜,因此,再生天然的牙根或全牙是临床上急需解决的难题。有研究者试用非牙源性干细胞,为牙体的再生进行了探索性的研究。Ohazama等^[33]将胚胎牙上皮与成人的骨髓基质细胞结合,再植入动物肾囊,结果发现形成牙样结构。进一步研究表明,用神经干细胞(neural stem cell, NSC)、胚胎干细胞(ESC)和成人骨髓间充质干细胞(BM-MSC)合成的胚胎性口腔上皮植入成人的颌骨和动物肾囊,发现有牙样结构和骨质的再生。Ferro等^[34]也成功地在体外将脂肪衍生干细胞(ADSC)转分化为3D的类似牙蕾的器官和表型。这些研究对用牙源性干细胞再造牙体具有重要的指导作用^[27]。

2.3.1 牙冠再生 Yu等^[12]将DPSC和成年鼠的根尖牙蕾细胞(apical bud cells)结合,在植入活体后形成典型的牙冠样结构,其中包括成釉细胞层、牙釉质、牙本质、前期牙本质和成牙本质的细胞层,但是这个以DPSC为基础的方法,至今未能观察到牙根的形成。人类釉质是由成牙的上皮组织发育而成的,对于牙上皮性干细胞(亦即能表达釉质蛋白的干细胞)还在探索阶段。正常人的牙齿,成牙的上皮干细胞已消失。只有在动物中,如小鼠切牙的颈环尚有成牙的上皮干细胞存在。Nagano等^[35]报道成牙本质细胞能够表达牙釉质蛋白,为用非成釉细胞合成牙釉质带来希望。

2.3.2 牙根再生 Sonoyama等^[36]用SCAP和PDLSC分别与HA或TCP支架材料结合,再植入猪下颌骨的牙槽窝,3个月后形成生物性牙根,可供牙齿修复打桩和作冠。此牙根由SCAP生产的牙本质组成,周围有牙周膜围绕,并与牙槽骨形成天然的结合。但其缺点是残余在牙本质内的HA,降低了牙根强度,另外其组织相容性还有待长期的研究^[12]。Guo等^[37]用大鼠的牙囊干细胞(DFSC)经9个月传代培养后收集,接种在牙本质基质支架上,再植入大鼠牙槽窝,结果在4周后形成牙根样组织。但同样的DFSC植入颅骨则不能形成牙根。此结果表明,DFSC与牙本质基质支架需要牙槽窝的微环境才能再生出牙根。

2.3.3 全牙再生 人类牙齿的形成有赖于成牙上皮和成牙性间充质的相互作用。但牙胚形成牙釉质

的过程一旦完成、牙体一旦萌出,成牙性上皮细胞随即凋亡消失。所以许多研究都将牙源性干细胞与牙胚细胞合用。Ikeda等^[38]报导从小鼠牙齿发育的杯状期分离出成牙上皮细胞,将其与DPSC结合在胶原凝胶上进行体外培养,形成的牙胚植入小鼠颌骨内,结果发现此生物合成牙与牙槽骨结合良好,并具有天然牙齿的功能。目前,进行全牙再生的细胞主要有四种来源:(1)牙胚的组织细胞,包括整个牙胚或部分牙胚或牙胚分离的细胞;(2)成体的组织细胞,如牙髓和牙龈细胞等;(3)牙源性和非牙源性干细胞,非牙源性干细胞有骨髓间充质干细胞(BM-MSc)和脂肪干细胞(ADSC);(4)由自体组织细胞经体细胞重编程产生的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)。以上四种细胞可单独使用或联合使用,诱导全牙再生。全牙再生的实验方法包括:(1)将牙胚组织或细胞先植入活体的某一部位,如鸡尿囊绒毛膜、肾囊下或皮下等,待形成牙冠后,再将移植体植入颌骨产生牙齿。(2)将分离的细胞先在体外先培养、诱导、扩增后,再植入活体的牙槽骨或其他部位产生全牙^[4,12,34,38-40]。

成体牙源干细胞属于间充质干细胞(MSC)的一种,但不包括成牙性上皮细胞。因此利用牙源性干细胞再造全牙,缺乏成牙性上皮细胞。近来,诱导多能干细胞(iPSC)技术的发展,牙源干细胞为全牙再生带来希望。利用iPSC再生生物牙的简要过程包括:体外分离和扩增自体的DPSC、将四个重编程基因(*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*)导入体细胞如DPSC形成iPSC并诱导iPSC分化为成牙性上皮细胞以及成牙性上皮细胞与自体DPSC结合后植入人体颌骨,使其继续生长和再生全牙^[12,41]。由于生物牙再生还存在很多问题,如人类成牙性上皮细胞来源有限,目前仅有的细胞来源只是未分化成熟的智齿和阻生牙,因此利用iPSC技术进行牙齿再生将是具有发展前景的重要研究方向^[27,38]。

2.4 颅骨、颌骨及面骨的损伤修复研究

d'Aquino等^[42]用DPSC成功培养出骨组织碎片,将此碎片植入动物可产生有血管供应的板状骨。他们还报道了用DPSC治疗下颌骨缺损的临床研究结果。他们先拔取患者的上颌智齿,分离培养自体DPSC,再将其植入明胶载体产生DPSC复合体。然后拔除双侧下颌智齿,一侧置入DPSC复合体,另侧作对照。结果发现,术后60天,实验侧第二磨牙皮质

骨垂直增生至牙釉与本骨质交界。术后3个月,新生骨组织、细胞因子、BMP-2和血管内皮生长因子(VEGF)的表达在实验侧显著高于对侧。术后1年,实验侧完全稳定骨化,达到第二磨牙骨质再生的目的^[42]。另外,Seo等^[39]报道SHED在动物身上能使大面积的颅骨缺损修复。Riccio等^[43]也报道应用人类DPSC配合丝纤蛋白支架修复了大鼠顶骨的大片缺损。但也有研究报道用非牙源性干细胞如ADSC或BM-MSc修复颅面缺损,还有研究报道用ADSC或BM-MSc结合BMP-2细胞因子和支架进行颅骨缺损修复^[44-45]。

2.5 口腔科学其他方面应用的研究

2.5.1 牙源干细胞与再植牙手术结合

牙齿再植术适用于外伤脱白的牙齿以及在口腔外科进行根管治疗的病牙。再植牙一般术后都能与牙槽愈合,但缺乏牙周膜并会有牙根逐渐吸收和脱落的缺点。近年,牙源干细胞与再植术的结合提高了再植的效果。Dangaria等^[28]将大鼠的上磨牙进行再植研究,再植前在牙根表面添加PDLSC,6个月后未添加干细胞的对照牙牙根全部吸收,而涂有PDLSC的牙根未发现吸收,组织学检查发现有干细胞结合的种植牙牙根表面形成明显的牙周膜。

2.5.2 牙源干细胞与钛合金种植牙结合

Mangano等^[46]对DPSC与钛合金表面的结合部位进行基因表达的研究,结果发现,DPSC能很快分化为成骨细胞和内皮细胞沿合金表面形成骨组织,并表达相应的特异蛋白标志物。此结果表明,牙源干细胞移植具有促进种植牙牙周膜再生的作用。另有研究证明,移植的牙源干细胞可能在钛合金种植牙根的表面形成牙周膜,从而克服现代种植牙缺乏牙周膜的缺点^[47]。

2.5.3 牙源干细胞与透明质酸HA涂面的种植牙结合

Yamada等^[48]报道,当DPSC或SHED与PRP合用,所形成的骨质能与涂有透明质酸(hyaluronic acid, HA)的种植牙根更好地结合。他们用动物犬造成骨缺损模型后,随机分成五组进行研究:在缺损中单独加入PRP组、加入PRP和BMMSC组、加入PRP和成年犬的DPSC组、加入PRP和幼犬的SHED组以及对照组。结果发现,植入干细胞的三组种植牙在HA涂面形成良好成熟的骨组织和血管。

2.5.4 牙源干细胞促进伤口软组织愈合

Nishino等^[49]报道关于SHED促进伤口愈合的研究。他们用手术制造小鼠切割伤模型,伤口处理分以下4组:植

入SHED、植入MSC、植入成纤维细胞和磷酸盐缓冲液对照。分别在术后5、7、14天评估伤口的愈合情况。结果表明,移植干细胞的前三组愈合比对照组显著加快,组织学检查可见移植细胞被人类HA结合蛋白所围绕,同时发现干细胞组HA表达明显增加。此研究提示SHED和人类间充质干细胞(MSC)都具有促进伤口愈合的作用。

3 牙源性干细胞在其他疾病研究中的应用

3.1 牙髓干细胞用于脑血管意外损伤的修复研究

Yang等^[50]分离培养了人类第三磨牙的DPSC,并诱导其转化为神经干细胞(NSC)。将此NSC细胞移植到大脑中动脉栓塞大鼠模型,结果发现,治疗组的神经性障碍明显改善。Sugiyama等^[51]从猪牙髓衍生取得DPSC细胞(CD31⁻/CD146⁻)。将Sprague-Dawley大鼠进行大脑中动脉栓塞,24小时后将DPSC细胞(CD31⁻/CD146⁻)注入大脑。结果发现,DPSC细胞体内分化为NSC及神经细胞,表达doublecortin的神经细胞数上升2倍;表达NeuN的神经细胞增长8倍;在缺血的脑部VEGF的水平比正常大脑提高28倍。此结果表明,来自牙髓的DPSC细胞(CD31⁻/CD146⁻)能够促进移植的和内源性的神经干细胞分化,并且诱导血管形成和改善脑部中动脉栓塞后的缺血状况。Kiralý等^[52]研究由DPSC分化的神经干细胞移植到CNS后与脑组织的整合,并发现如下改变:注入的DPSC以单细胞方式迁移到脑部各部位,但大多数集中在神经干细胞区带(SVZ、SGZ、SCZ),并于创伤后迁移到受损区;移植的DPSC表达多种神经细胞标志物如N-tubulin、NF-M、NeuN和神经胶质细胞标志物GFAP。这些标志于受伤4周后在皮质病变区的DPSC中表达明显升高;植入的细胞表现出神经细胞和神经胶质细胞的有关电生理特性。他们的研究结果提示,DPSC分化的细胞可以与宿主大脑整合,以促进脑组织的损伤修复。

Leong等^[53]报道了DPSC治疗脑中风的动物研究。他们将小鼠造成局部脑缺血24小时后,向脑内注射DPSC。结果在4周后发现,小鼠前肢感觉功能有明显改善,提示移植的细胞可在脑内存活并能向病灶迁移。另外,在梗死的纹状体周围发现移植的DPSC可分化为神经细胞和星形胶质细胞。因此,他们认为DPSC治疗中风的机制不仅是替代神经细胞,而且可以通过DPSC分泌细胞因子发挥作用。

3.2 牙髓干细胞用于脊髓损伤的修复研究

神经组织细胞一旦受到损伤,周围胶质细胞趋于密集,形成纤维胶质性疤痕,阻碍神经细胞及其轴索的再生。因此在损伤早期移植干细胞是促进神经元再生修复的关键。由于中枢神经系统只有海马齿状回的颗粒下层和侧脑室下层等少数区域存在内源神经干细胞(NSC),但无法自此两部位分离自体NSC来修复颅脑和脊髓损伤。因此,必须从其他组织中寻找干细胞的来源^[38]。在动物的胚胎发育中牙髓发源于神经脊。神经脊在发育过程中形成神经系统和脊髓。Nosrat等^[54]研究表明,神经元可以从牙髓的干细胞诱导分化产生。随后,许多研究进一步表明,DPSC具有转化为神经元的能力。Huang等^[55]成功地将DPSC移植到小鼠海马区,并在体内分化为神经细胞,为牙源性干细胞修复中枢神经系统疾病提供了证据。其他牙髓干细胞如PDLSC、DFSC和SHED等也具有神经分化能力^[39]。另外,Nosrat等^[25]在动物模型中还发现,牙源性干细胞可以分泌细胞因子促使轴突生长,同时能提高损伤脊髓的运动神经元的生存能力。Sakai等^[25]移植DPSC和SHED到脊髓全断大鼠,结果发现DPSC和SHED的表面标志、基因表达和分泌的细胞因子发生明显改变。移植DPSC和SHED后,脊髓全断大鼠后肢的运动功能明显恢复,神经轴突明显再生。

通过以上研究发现,DPSC可能通过三个方面促进脊髓损伤修复:(1)抑制损伤导致的神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的凋亡;(2)直接抑制多种阻碍轴突生长的抑制因子如硫酸软骨素、蛋白聚糖和髓磷脂等相关糖蛋白;(3)分化为成熟的少突胶质细胞促进神经轴索生长。

3.3 牙髓干细胞用于帕金森氏病的修复研究

Nesti等^[56]将DPSC与中脑神经组织细胞联合培养后移植到体外帕金森氏病(Parkinson's disease)模型上,发现DPSC能提高大脑神经细胞对MPP⁺或鱼藤酮所导致神经毒性的保护作用。Ibarratxe等^[57]报道了牙髓干细胞用于帕金森氏病修复治疗具有许多优越性:牙源性干细胞比较容易得到自体细胞,可避免免疫排斥和炎症反应;DPSC本身具有神经细胞及胶质细胞标记物的表达;DPSC具有类似神经元的电活动如表达神经细胞的受体,并产生动作电位;DPSC可在宿主的神经组织内生长存活;牙源干细胞可分泌许多细胞因子如BDNF、GDNF、IGF和IL对

比邻细胞的存活起到免疫调节作用。但是至今为止,移植到神经组织内的DPSC和MSC是否真正分化为NSC、是否真正能和宿主的神经元形成功能性的突触连接,还有待于进一步研究。

3.4 牙髓干细胞用于心肌梗死、糖尿病和免疫缺陷性疾病的修复研究

Gandia等^[58]用冠状动脉结扎法在大鼠裸鼠造成急性心肌梗死的模型,并将DPSC注入心肌内。4周之后显示心肌功能改善,梗死区缩小,新血管形成增加。他们认为,DPSC可以作为急性心肌梗死细胞疗法的干细胞来源。另一项研究表明,对来自智齿的牙源性干细胞进行体细胞重编程,可使牙源性干细胞回转为具有胚胎干细胞(ESC)性质的诱导多能干细胞(iPSC),然后在体外分化成能跳动的心肌细胞^[39,59]。Xin等^[60]报道牙源性干细胞分化为心肌细胞主要通过调节P13激酶/Akt信号通道能诱导牙源性干细胞向心肌细胞分化,牙源性干细胞也可以作为心肌细胞再生的细胞来源。近年来,干细胞治疗糖尿病的研究取得了一定效果,一方面是产生能分泌胰岛素的细胞;另一方面是利用干细胞调节免疫反应发挥对胰腺抗原的耐受^[39]。Huang等^[4]研究表明,PDLSC能产生胰岛素,并且能够通过免疫调节作用降低血糖。Govindasamy等^[61]报道将DPSC分化为胰岛样细胞聚集体(islet-like cell aggregates, ICA),并发现其表达相应的转录因子如CPP、Pdx1、Pdx 4、Pdx 6、Ngn和Isl1等,从而起到调节血糖治疗糖尿病的作用。研究表明,MSC对很多自身免疫疾病(系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、多发性硬化症等)有一定的疗效,可能是通过免疫调节发挥作用^[47,62]。牙源性干细胞属于MSC的一种,也提示牙源性干细胞移植能够改善自身免疫性疾病造成的组织损伤,这将是今后重要的研究方向之一。

4 结论与展望

牙源干细胞(DSC)是取自牙齿和牙周组织的间充质干细胞,具有与骨髓间充质干细胞相似的形态和功能特点。由于DSC具有取材方便、增殖能力强及成骨分化等特性,对于牙齿、牙髓损伤及牙周病组织损伤修复和全牙再生具有重要的应用价值。同时因其具有分化为神经细胞、心肌细胞及其他细胞的多向分化能力,使其成为修复神经损伤与神经退行性疾病、心肌梗死和糖尿病等的重要细胞来源。

另外,牙源干细胞与其他牙科技术联合应用,可以提高再植牙和种植牙的治疗效果。但目前牙源干细胞研究多数处于体外培养鉴定、多向分化及动物实验阶段,今后的研究将以牙源干细胞的临床转化应用为目的,开展多方面的深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(25): 13625-30.
- 2 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.
- 3 Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study. J Endod 2008; 34(2): 166-71.
- 4 Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res 2009; 88(9): 792-806.
- 5 Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, et al. Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: A report of 3 cases. Oral Dis 2010; 16(1): 20-8.
- 6 Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 2004; 364(9429): 149-55.
- 7 Morsezeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol 2005; 24(2): 155-65.
- 8 Fawzy El-Sayed KM, Dorfer C, Fandrich F, Gieseler F, Moustafa MH, Ungefroren H. Erratum to: Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. Adv Biochem Eng Biotechnol 2013; 130: 301-2.
- 9 Mitrano TI, Grob MS, Carrion F, Nova-Lamperti E, Luz PA, Fierro FS, et al. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. J Periodontol 2010; 81(6): 917-25.
- 10 Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, et al. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. Stem Cells 2010; 28(5): 984-95.
- 11 Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, et al. Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. Tissue Eng Part A 2010; 16(9): 2891-9.
- 12 Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. Stem Cell Rev 2011; 7(1): 161-71.
- 13 Park JY, Jeon SH, Choung PH. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. Cell Transplant 2011; 20(2): 271-85.
- 14 Zhang N, Wang W, Chen B, Chen C, Jia X, Ding Y, et al. Isolation and characterization of human dental pulp stem cells. Chin J Cell Stem Cell (Electronic Edition) 2014; 4(3): 32-5.
- 15 Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp

- stem cells: Function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2014; doi: 10.1002/term.1899.
- 16 Bossu M, Pacifici A, Carbone D, Tenore G, Ierardo G, Pacifici L, *et al.* Today prospects for tissue engineering therapeutic approach in dentistry. *Scientific World Journal* 2014; 2014: 151252.
- 17 Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, *et al.* *In vivo* generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008; 34(4): 421-6.
- 18 Murray PE, Garcia Godoy C, Garcia Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12(3): E258-66.
- 19 Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol* 2012; 28(1): 33-41.
- 20 Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004; 83(8): 590-5.
- 21 Gotlieb EL, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. An ultrastructural investigation of tissue-engineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *J Am Dent Assoc* 2008; 139(4): 457-65.
- 22 Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, Watanabe A, Nabekura J, Ito M, *et al.* Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(15/16): 1911-20.
- 23 Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, *et al.* Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(2): 605-15.
- 24 Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, *et al.* Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008; 34(8): 962-9.
- 25 Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, *et al.* Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest* 2012; 122(1): 80-90.
- 26 He H, Cao J, Wang D, Gu B, Guo H, Liu H. Gene-modified stem cells combined with rapid prototyping techniques: A novel strategy for periodontal regeneration. *Stem Cell Rev* 2010; 6(1): 137-41.
- 27 Yen AH, Yelick PC. Dental tissue regeneration—a mini-review. *Gerontology* 2011; 57(1): 85-94.
- 28 Dangaria SJ, Ito Y, Luan X, Diekwisch TG. Successful periodontal ligament regeneration by periodontal progenitor preseeding on natural tooth root surfaces. *Stem Cells Dev* 2011; 20(10): 1659-68.
- 29 Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2006; 26(4): 363-9.
- 30 Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, *et al.* Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004; 75(9): 1281-7.
- 31 Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod* 2010; 36(5): 781-9.
- 32 Fawzy El-Sayed KM, Paris S, Becker ST, Neuschl M, de Buhr W, Salzer S, *et al.* Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: An animal study. *J Clin Periodontol* 2012; 39(9): 861-70.
- 33 Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004; 83(7): 518-22.
- 34 Ferro F, Spelat R, Falini G, Gallelli A, D'Aurizio F, Puppato E, *et al.* Adipose tissue-derived stem cell *in vitro* differentiation in a three-dimensional dental bud structure. *Am J Pathol* 2011; 178(5): 2299-310.
- 35 Nagano T, Oida S, Ando H, Gomi K, Arai T, Fukae M. Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. *J Dent Res* 2003; 82(12): 982-6.
- 36 Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 1(e79).
- 37 Guo W, Gong K, Shi H, Zhu G, He Y, Ding B, *et al.* Dental follicle cells and treated dentin matrix scaffold for tissue engineering the tooth root. *Biomaterials* 2012; 33(5): 1291-302.
- 38 Ibarretxe G, Alvarez A, Canavate ML, Hilario E, Aurrekoetxea M, Unda F. Cell reprogramming, iPS limitations, and overcoming strategies in dental bioengineering. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 365932.
- 39 Krasner PV, Verlander P. Stem cells in dentistry and medicine: The dentists' role. *Dentistry Today* 2011; 30(1): 128.
- 40 Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT. Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. *J Dent Res* 2012; 92(4): 329-34.
- 41 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 42 d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, *et al.* Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 2009; 18: 75-83.
- 43 Riccio M, Maraldi T, Pisciotta A, La Sala GB, Ferrari A, Bruzzesi G, *et al.* Fibroin scaffold repairs critical-size bone defects *in vivo* supported by human amniotic fluid and dental pulp stem cells. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(9/10): 1006-13.
- 44 Mesimaki K, Lindroos B, Tornwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, *et al.* Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009; 38(3): 201-9.
- 45 Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, *et al.* Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2004; 32(6): 370-3.
- 46 Mangano C, de Rosa A, Desiderio V, d'Aquino R, Piattelli A, De Francesco F, *et al.* The osteoblastic differentiation of dental

- pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures. *Biomaterials* 2010; 31(13): 3543-51.
- 47 Kim RH, Mehrazarin S, Kang MK. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic diseases. *Dent Clin North Am* 2012; 56(3): 651-75.
- 48 Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T, *et al.* A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(6): 1891-900.
- 49 Nishino Y, Yamada Y, Ebisawa K, Nakamura S, Okabe K, Umemura E, *et al.* Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. *Cytotherapy* 2011; 13(5): 598-605.
- 50 Yang KL, Chen MF, Liao CH, Pang CY, Lin PY. A simple and efficient method for generating Nurr1-positive neuronal stem cells from human wisdom teeth (tNSC) and the potential of tNSC for stroke therapy. *Cytotherapy* 2009; 11(5): 606-17.
- 51 Sugiyama M, Iohara K, Wakita H, Hattori H, Ueda M, Matsushita K, *et al.* Dental pulp-derived CD31(-)/CD146(-) side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(9/10): 1303-11.
- 52 Kiraly M, Kadar K, Horvathy DB, Nardai P, Racz GZ, Lacza Z, *et al.* Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain *in vivo*. *Neurochem Int* 2011; 59(3): 371-81.
- 53 Leong WK, Henshall TL, Arthur A, Kremer KL, Lewis MD, Helps SC, *et al.* Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(3): 177-87.
- 54 Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci* 2004; 19(9): 2388-98.
- 55 Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, Chan AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells* 2008; 26(10): 2654-63.
- 56 Nesti C, Pardini C, Barachini S, D'Alessandro D, Siciliano G, Murri L, *et al.* Human dental pulp stem cells protect mouse dopaminergic neurons against MPP+ or rotenone. *Brain Res* 2011; 1367: 94-102.
- 57 Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, Garcia-Murga V, Etxaniz J, Unda F. Neural crest stem cells from dental tissues: A new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int* 2008; 2012: 103503.
- 58 Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, *et al.* Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 2008; 26(3): 638-45.
- 59 Oda Y, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem* 2010; 285(38): 29270-8.
- 60 Xin LZ, Govindasamy V, Musa S, Abu Kasim NH. Dental stem cells as an alternative source for cardiac regeneration. *Med Hypotheses* 2013; 81(4): 704-6.
- 61 Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah AN, Nathan KR, Ab Aziz ZA, Abdullah M, *et al.* Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *J Dent Res* 2011; 90(5): 646-52.
- 62 Daltoe FP, Mendonca PP, Mantesso A, Deboni MC. Can SHED or DPSCs be used to repair/regenerate non-dental tissues? A systematic review of *in vivo* studies. *Braz Oral Res* 2014; 28(1): doi: 10.1590/1807-3107BOR-2014.