

[文章编号] 1000-1182(2015)06-0656-04

牙髓干细胞在组织工程领域的研究进展

史诗戔 谢家敏

南通大学附属第五医院口腔科, 泰州 225300

[摘要] 种子细胞的获得、培养与分化是组织工程的前提和基础, 将干细胞作为种子细胞用于组织工程的构建受到越来越多学者的关注。牙髓干细胞(DPSCs)是存在于牙髓组织中的一种成体干细胞, 是一种新兴的组织工程种子细胞, 对于组织器官的再生具有重要的意义。本文就牙髓干细胞在组织工程的研究现状作一综述, 并对其临床应用前景进行讨论。

[关键词] 牙髓干细胞; 多向分化; 组织工程; 应用前景

[中图分类号] Q 813 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2015.06.022

Study progress of dental pulp stem cells in tissue engineering Shi Shiyu, Xie Jiamin. (Dept. of Stomatology, The Fifth Affiliated Hospital of Nantong University, Taizhou 225300, China)

[Abstract] In recent years, modern tissue engineering is becoming emerging and developing rapidly, and the acquisition, cultivation and differentiation of seed cells is the premise and foundation of the construction of tissue engineering, so more and more scholars pay attention to stem cells as seed cells for tissue engineering construction. Dental pulp stem cells (DPSCs) is a kind of adult stem cells derived from dental pulp, and as a new kind of seed cells of tissue engineering, the study of DPSCs presents important significance in tissue and organ regeneration. In this review, we introduced the progress of studies on dental pulp stem cells and discussed their clinical application prospects.

[Key words] dental pulp stem cells; multiple differentiation; tissue engineering; application prospect

干细胞(stem cell)是一类长期存在于机体内的特殊细胞, 具有自我更新和高度增殖能力, 以及在一定条件下分化成为多种终末细胞的能力。干细胞根据来源的不同, 可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells)和成体干细胞(adult stem cells)。胚胎干细胞的研究涉及到伦理学和实际操作困难等问题, 而成体干细胞则具有来源广泛、可塑性强、排斥反应较小等特点, 近年来受到越来越多的研究者关注。目前机体内许多组织中都发现了成体干细胞如脑、骨髓、血管、骨髓肌、皮肤、肝脏等, 那么在口腔中是否存在成体干细胞呢? 理论上在牙发育过程中的各个阶段都存在牙源性干细胞, 这些干细胞遵循发育程序和机理进行分化直至形成牙齿, 在成体牙的牙髓组织中同样存在着干细胞——牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)。该类细胞不仅具有同其他成体干细胞一样的增殖分化能力,

同时还具有来源丰富、取材方便、免疫排斥小等优点。由于DPSCs所具有的这些优势, 使其成为一种极具研究潜力的种子细胞^[1], 受到越来越多组织工程学研究者的重视。

1 牙髓干细胞的提出及定义

口腔中的干细胞来源丰富, 包括黏膜软组织、牙周韧带及每个牙齿内部的受血管和神经支配的组织——牙髓。在颌面发育过程中, 外胚层间叶细胞是牙髓组织的起源细胞, 牙髓中的干细胞同样与神经嵴来源干细胞相似, 具有极强可塑性, 能分化成为神经和外胚层间叶的子代组织。

Gronthos等^[2]在2000年首次从牙髓组织中分离出干细胞, 揭开了牙髓干细胞研究进程崭新的一页。目前认为存在于牙髓组织中呈均一的成纤维细胞样, 同时具有干细胞生物学特征的细胞就是牙髓干细胞。相比于其他成体干细胞, DPSCs具有许多优点^[3]: 1) 来源丰富, 易采集, 可降低并发症的可能性; 2) 具有免疫抗炎能力, 有利于异体移植研究与应用; 3)

[收稿日期] 2015-04-26; **[修回日期]** 2015-09-23

[作者简介] 史诗戔, 硕士, E-mail: shishiyu0419@163.com

[通信作者] 谢家敏, 主任医师, 博士, E-mail: xiejiamin1101@163.com

在一定条件下具有较强的诱导形成釉质和牙本质细胞的能力;4)从阻生牙中提取的牙髓干细胞可在体外进行分离和扩增,同时具有较强的增殖分化能力。

2 DPSCs的培养及分子标记

2.1 DPSCs的培养

牙髓组织中牙髓干细胞的含量极低,为获得足够的细胞数量来满足应用需求,必须通过体外扩增的方法来解决^[4]。DPSCs常用的培养方法有:酶消化法、组织块法及在二者基础上衍生的改良组织块酶消化法等。胎牛血清是最常用的细胞培养物质,其在细胞的增殖、迁移和分化等生物学行为过程中提供营养物质、生长因子和激素等生物活性物质;但胎牛血清的应用可能涉及到伦理、科学及安全等问题。近年有研究者使用浓缩的血小板裂解物和富血小板血浆替代安全的血清进行体外扩增干细胞^[5-6],但由于尚不明确其化学成分,且过程中需要大量外周血,因此对于大规模扩增的需求仍无法满足。

随着对牙髓干细胞认识的深入,以及无血清培养技术研发的进步,许多研究者采用无血清培养技术体外扩增DPSCs。同传统的有血清培养相比,无血清培养的牙髓干细胞在形态上非常相似,但细胞外形显得更加纤细、细长,立体感更强,所培养的细胞具有形成克隆的能力,符合人的DPSCs特征^[7]。

2.2 DPSCs的分子标记

牙髓干细胞与成纤维细胞外形上非常相似,细胞量较少,缺少明确的细胞标志物,一般都是通过定向诱导使得DPSCs向成牙本质细胞分化后,通过分析诱导前后的细胞表面标记来鉴定。目前,对于牙髓干细胞分子标记的研究仍处于起步阶段,主要依靠传统间充质干细胞的标记物,如CD13、CD44、CD90和CD105等,牙髓干细胞主要依靠中胚层标记物Stro-1和CD146来鉴定。研究表明Stro-1能有效地选择牙髓干细胞,骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP2)可以增强这一效用^[8]。CD16是一种存在于管周上皮细胞表面的抗原标志,研究发现DPSCs表面也有表达^[2]。今后对于DPSCs明确的分子标记还需做进一步研究。

3 DPSCs的生物学特性

3.1 DPSCs的高度增殖和自我更新能力

牙髓干细胞作为成体干细胞的一员具有较强的自我增殖能力,在第一代牙髓干细胞和骨髓间充质干细胞培养基中加入溴脱氧尿苷,对比研究二者在

体外的增殖情况,发现DPSCs的增殖率明显高于骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs),同时还发现,在之后的传代中DPSCs仍然保持着较高的增殖能力^[2]。郭红延等^[9]运用单细胞克隆的方法将大鼠牙髓干细胞进行分离和培养,将DPSCs与羟磷灰石(hydroxyapatite, HA)-磷酸三钙(tricalcium phosphate, TCP)细胞支架材料复合培养到一定程度后移植到裸鼠皮下,一段时间后进行组织学检测,发现在移植物的组织切片中出现牙髓-牙本质复合体样结构,同样证明了DPSCs的高度增殖能力。

Gronthos等^[10]在10周龄的免疫缺陷小鼠皮下通过HA/TCP陶瓷颗粒为载体植入DPSCs,6周后检测到牙本质-牙髓样复合体和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)的表达。他们将从中分离出的骨髓基质干细胞(marrow stromal cells, MSCs)用人类aluDNA探针进行检测,发现大部分细胞呈阳性,将其在体外进行扩增后,再次移植入裸鼠体内,所形成的成牙本质细胞也表达人类特异alu基因,呈人类牙本质涎蛋白阳性,从而证实了牙髓干细胞具有自我更新的能力。

3.2 DPSCs的多向分化能力

牙髓干细胞是多能干细胞的一种,在一定条件下可诱导分化成多种类型的终末细胞,目前研究证实的有成牙本质细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、血管内皮细胞等。在一定的诱导条件下培养牙髓干细胞,发现其可向成牙本质细胞、成骨细胞、脂肪细胞等方向分化,并表达相应的标志物,例如对牙髓干细胞进行5周的成脂诱导后,经油红O染色呈现出阳性的脂滴聚集,这是脂肪细胞所具有的特征。Zhang等^[11]报道,将人牙髓细胞与猪牙上皮细胞共同培养,4周后检测到IV型胶原、釉原蛋白、牙本质涎磷蛋白和层黏连蛋白5表达,同时形成不规则的矿化组织。Ishkitiev等^[12]报道了DPSCs具有向肝细胞分化的能力,他们在培养基中加入肝细胞生长因子、地塞米松、胰岛素-转铁蛋白-硒-X及制瘤素等体外诱导培养DPSCs,发现细胞表达出肝细胞特异性分子标志物。至于DPSCs能否向其他细胞转化以及所需要的转化条件,还需要进一步的研究。

4 DPSCs在组织器官再生中的应用研究

4.1 修复受损牙髓

研究发现,DPSCs虽能形成牙髓-牙本质复合体,但其中缺少牙本质小管^[2,10]。同时要使得DPSCs向成牙本质细胞分化并形成矿化的硬组织,还需存在于有

健康、未受损的牙本质等条件下方可进行^[13]。Iohara等^[14]将犬牙髓细胞和脂肪细胞在体外进行培养,并在培养基中加入IGF和EGF,然后与含有SDF-1的胶原混合后放入去除牙髓组织的切牙中,2周后可观察到牙髓-牙本质样复合体,且有血管和神经形成。Sakai等^[15]研究发现,以聚左旋乳酸支架和牙髓干细胞再生的人工牙髓上有新生牙本质形成。运用DPSCs使牙髓-牙本质复合体再生从而修复受损牙髓,有望在今后成为一种安全有效的治疗手段。

4.2 修复骨缺损

DPSCs在培养过程中加入含有地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸、DMEM的成骨诱导液,可向成骨细胞分化,是骨再生修复中骨细胞的潜在来源。Ito等^[16]将富含血小板的血浆与DPSCs的混合物植入犬上颌缺损中,8周后植入种植体,然后再培养8周,结果发现种植体周围不仅有骨组织形成,而且还提高了与周围骨组织的结合能力。Riccio等^[17]将人类牙髓干细胞与丝纤蛋白支架共同培养,并成功修复了大鼠顶骨的大片缺损。这对于今后修复各种类型的骨组织缺损提供了一种很有前景的重建模型。

4.3 构建组织工程牙

近年来,干细胞和组织工程学技术的飞速发展,为牙齿的再生提供了希望。目前,已知的牙齿再生的实验方法包括^[18]: 1) 在活体组织内先植入牙胚组织或细胞,待其形成牙冠后,再将其植入颌骨产生牙齿; 2) 将牙髓干细胞先在体外进行一段时间的培养、诱导、扩增后,再植入活体的牙槽骨或其他部位产生全牙。Ibarretxe等^[18]选取处于发育的杯状期的小鼠牙齿,从中分离出成牙上皮细胞,然后与牙髓干细胞在体外共同培养,待其形成牙胚后植入小鼠颌骨内,一段时间后发现其与牙槽骨结合良好,同时具有天然牙齿的功能。随着研究的深入,体外构建组织工程牙逐渐成为可能,这对于改善缺牙患者生活质量具有重要意义。

4.4 治疗神经退行性疾病

Ibarretxe等^[19]报道了DPSCs在治疗帕金森氏病方面所具有的优势: DPSCs易于获取且为自体细胞,在使用过程中可避免免疫排斥和炎症反应; DPSCs本身具有胶质细胞和神经细胞标记物的表达; DPSCs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; DPSCs可生长存活于宿主的神经组织内; DPSCs可以通过分泌细胞因子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DPSCs是否能真正转化为神经干细胞以及能和宿主的神经元形成功能性的突触连接,还有待于进一步的研究。

4.5 炎症牙髓干细胞 (dental pulp stem cells-inflamed pulps, DPSC-IPs)

现阶段研究所用的牙髓干细胞多取自第三磨牙和正畸牙,供体与供牙来源存在局限性。根管治疗是目前最常见的牙髓治疗方法,治疗过程中关键的一步就是拔除炎症或坏死的牙髓,拔除的牙髓是否可以分离出种子细胞应用于组织工程成为近年来研究的热点。

2010年, Wang等^[20]从临床诊断为不可逆性牙髓炎的恒牙牙髓中分离出牙髓干细胞,他们通过对取自健康牙髓的牙髓干细胞和取自诊断为不可逆性牙髓炎的牙齿中的牙髓干细胞进行对照试验,证明了在炎症牙髓组织中依然存在具有增殖能力的干细胞,并且同样具有成牙和成骨分化的能力,但其数量明显减少。

近年来的研究已经证实牙髓干细胞可在临床上应用于骨再生、神经再生、牙本质-牙髓再生等再生医学领域^[21]。作为牙髓干细胞的一种, DPSC-IPs与正常牙髓干细胞一样具有良好的自我更新能力与多向分化潜能,这些都是DPSC-IPs能够在临床应用的基础和前提。随着研究的进一步深入,炎症牙髓干细胞在临床中的应用必将有更加广阔的前景。

4.6 其他

DPSCs通过肌源性诱导可以表达 α -平滑肌肌动蛋白,这是典型的成肌细胞标志物^[2]。DPSCs可以分化为心肌细胞,其作用机制主要是调节PI3激酶/Akt信号通道, DPSCs可作为心肌细胞再生的细胞来源,这为治疗心肌梗死提供了新的途径^[22]。

Leong等^[23]将人类牙髓干细胞移植到局灶性缺血24 h的啮齿动物模型脑部,四周后发现动物模型的前肢感觉运动功能有了显著改善。这项研究对于将来运用人类牙髓干细胞对中风患者进行细胞治疗提供了依据。

5 问题和展望

目前,牙髓干细胞已成为组织工程领域的热点干细胞之一,但其实质应用仍存在诸多问题。首先,从种子细胞的角度来看,存在如何获取稳定可靠的种子细胞来源; 体外培养牙髓干细胞扩增难度大、周期长; 牙髓干细胞在分化的哪个阶段最适合移植等; 其次,细胞的三维培养、生物支架材料、生理微环境模拟等关键技术的研究还未取得突破性进展,导致体外构建组织工程牙和其他细胞治疗的实际应用还面临着种种困难。随着组织工程研究的逐步深入,同时汇聚医学、材料学、工程学等多学科的

最新研究成果, 相信在不远的将来这些问题都可以解决, 从而实现真正意义的组织器官再生, 为口腔及全身疾病的治疗提供最有利的条件。

[参考文献]

- [1] Collart-Dutilleul PY, Secret E, Panayotov I, et al. Adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells from dental pulp on porous silicon scaffolds[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(3):1719-1728.
- [2] 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 USA, 2000, 97(25):13625-13630.
- [3] Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, et al. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2014: doi: 10.1002/term.1899.
- [4] Yang M, Zhang H, Gangolli R. Advances of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental tissue in craniofacial tissue engineering[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2014, 9(3):150-161.
- [5] Murphy MB, Blashki D, Buchanan RM, et al. Adult and umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma for mesenchymal stem cell proliferation, chemotaxis, and cryopreservation[J]. Biomaterials, 2012, 33(21):5308-5316.
- [6] Gottipamula S, Sharma A, Krishnamurthy S, et al. Human platelet lysate is an alternative to fetal bovine serum for large-scale expansion of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells[J]. Biotechnol Lett, 2012, 34(7):1367-1374.
- [7] Struys T, Moreels M, Martens W, et al. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J]. Cells Tissues Organs, 2011, 193(6):366-378.
- [8] Yang X, Walboomers XF, van den Beucken JJ, et al. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells *in vivo*[J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(2):367-375.
- [9] 郭红延, 吴补领, 郭希民, 等. 大鼠牙髓干细胞的培养和鉴定[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2004, 14(5):242-245.
- [10] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. J Dent Res, 2002, 81(8):531-535.
- [11] Zhang W, Ahluwalia IP, Yelick PC. Three dimensional dental epithelial-mesenchymal constructs of predetermined size and shape for tooth regeneration[J]. Biomaterials, 2010, 31(31):7995-8003.
- [12] Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features *in vitro*[J]. J Endod, 2010, 36(3):469-474.
- [13] Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry[J]. Odontology, 2011, 99(1):1-7.
- [14] Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105⁺ stem cells with stromal cell-derived factor-1[J]. Tissue Eng Part A, 2011, 17(15/16):1911-1920.
- [15] Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, 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]. J Clin Invest, 2012, 122(1):80-90.
- [16] Ito K, Yamada Y, Nakamura S, et al. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants[J]. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011, 26(5):947-954.
- [17] Riccio M, Maraldi T, Pisciotto A, et al. Fibroin scaffold repairs critical-size bone defects *in vivo* supported by human amniotic fluid and dental pulp stem cells[J]. Tissue Eng Part A, 2012, 18(9/10):1006-1013.
- [18] Ibarretxe G, Alvarez A, Cañavate ML, et al. Cell reprogramming, IPS limitations, and overcoming strategies in dental bioengineering[J]. Stem Cells Int, 2012:365932.
- [19] Ibarretxe G, Crende O, Aurrekoetxea M, et al. Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration[J]. Stem Cells Int, 2012:103503.
- [20] Wang Z, Pan J, Wright JT, et al. Putative stem cells in human dental pulp with irreversible pulpitis: an exploratory study[J]. J Endod, 2010, 36(5):820-825.
- [21] Yamamoto A, Sakai K, Matsubara K, et al. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury[J]. Neurosci Res, 2014, 78:16-20.
- [22] Xin LZ, Govindasamy V, Musa S, et al. Dental stem cells as an alternative source for cardiac regeneration[J]. Med Hypotheses, 2013, 81(4):704-706.
- [23] Leong WK, Henshall TL, Arthur A, et al. Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms[J]. Stem Cells Transl Med, 2012, 1(3):177-187.