

■ ■ ■ ■ 专题主编:

卫克文,男,医学博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师,现任空军军医大学第二附属医院(唐都医院)烧伤整形科副主任、口腔科主任。研究方向:牙根发育、口腔牙体牙髓病的基础与临床研究;临床上主要从事龋病的治疗、非龋疾病的治疗、牙髓病和尖周病的治疗、严重缺损牙齿的保存治疗等,尤其擅长活髓保存治疗及各种复杂根管、顽固性根尖周炎的治疗。

■ ■ ■ ■ 专题副主编:

元 坤(男,博士,西安交通大学口腔医院)

■ ■ ■ ■ 专题委员:

赵 越 何光伟 韩晓利 陈 治

·口腔专题·

牙髓干细胞的研究进展

赵 越

(天津市口腔医院儿童口腔科,天津 300041)

摘 要:牙髓干细胞是从牙髓组织中分离出的成纤维状细胞,其存在多种特点,如高度增殖、自我更新、多向分化、来源丰富、副作用小等,在牙髓修复、牙齿再生中具有良好的作用。本文以多角度分析牙髓干细胞,进一步了解牙髓干细胞的应用现状。

关键词:牙髓组织;牙髓干细胞;分化

中图分类号:R329.2

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2018.02.001

文章编号:1006-1959(2018)02-0001-03

Research Progress of Dental Pulp Stem Cells

ZHAO Yue

(Department of Stomatology,Tianjin Stomatological Hospital,Tianjin 300041,China)

Abstract:Dental pulp stem cells are fibroblast cells isolated from dental pulp tissue,which have many characteristics,such as highly proliferative,self-renewal,multi-directional differentiation,rich source,less side effects and so on,in the pulp repair,tooth regeneration has good effect.This paper analyzes dental pulp stem cells from multiple perspectives to further understand the current status of dental pulp stem cells.

Key words:Pulp tissue;Dental pulp stem cells;Differentiation

牙髓组织属于牙体组织的唯一软组织,位于牙齿内部的牙髓腔内。2000年,牙髓干细胞(Dental Pulp Stem Cells,DPSCs)被发现,其免疫表型、形成矿化结节能力极其类似于骨髓间充质干细胞,呈梭形形态,具有较强的克隆能力,同时还具有自行更新、多向分化等潜能,与其他组织成体肝细胞的生物学特性十分相似^[1-2]。基于上述事实,本次研究对牙髓干细胞的培养、分选、生物学特点、非人化诱导因素等方面进行如下综述。

1 牙髓干细胞

干细胞(stem cells-SC)是一类多潜能细胞,具有自我复制能力,同时属于一种未充分分化,尚不成熟的细胞,具有再生各种组织器官和人体的潜在功能,医学界称为“万用细胞”^[3]。根据肝细胞所处的发育阶段可分为两种,即成体肝细胞(somatic stem cell)和胚胎干细胞(embryonic stem cell,ES细胞),前者为新的干细胞、分化形成新的功能细胞,便于维

作者简介:赵越(1985.3-),男,天津人,硕士,主治医师,研究方向:乳牙及年轻恒牙牙体牙髓病,年轻恒牙外伤治疗及修复

持组织、器官的生长、衰退动态平衡,存在于骨髓、脂肪、血液、神经、肝脏等;后者可在体外培养,但由于多种因素的存在,使其应用受限。在牙齿形成后,一旦牙本质细胞受到轻度刺激,便会出现牙本质再生、修复,但成牙本质细胞一经分化,便不能再分裂,这种修复能力的发生是由于牙髓干细胞所致^[4-5]。王晓航,巴景斌^[6]指出牙髓干细胞可以有效消除感染、保留患牙等作用;张晓莉^[7]以新西兰大白兔制作动物模型、兔损伤面神经标本为例,结果显示出牙髓干细胞、TGF- β_3 的再生室修复,有助于损伤面神经再生,提示牙髓干细胞通过自身定向分化能力可转变成神经干细胞,对面神经的修复具有明显的促进作用,利于为面神经损伤的临床治疗提供可参考依据。

2 牙髓干细胞定位、分离以及鉴定情况的分析

据报道,DPSCs可能存在于它们起源组织的微脉管中,并且脉管抗原、平滑肌抗原、毛细血管抗原标志和骨髓基质干细胞相同^[8]。并且Gronthos等^[9]以免疫组化技术对牙髓干细胞表面分子标记进行研究,并与骨髓基质干细胞比较,结果显示,均表达与

平滑肌细胞、内皮细胞、骨细胞、成纤维细胞等有关的分子标记,其中骨髓基质细胞不表达骨涎蛋白、骨基质蛋白,而牙髓干细胞可低水平表达。Liu^[10]指出,牙髓干细胞分化期间,初始阶段胶原代谢相关基因、Runx2、TGF β 相关基因均上调且碱性磷酸酶活性增强,后期均降低。此外,细胞外基质磷酸蛋白是牙髓干细胞分化期间唯一降低标记物。笔者认为,细胞外基质磷酸蛋白属于矿化的抑制剂,其可以作为牙髓干细胞分化时下调的重要检测指标。刘少华等^[11]在相关研究中以人根髓、冠髓细胞为观察对象,分别提供组织块法培养,结果显示,根髓细胞的培养成功率较冠髓细胞高,并且其贴壁率、细胞活性、相同的增殖活性均较冠髓细胞优,根髓细胞形态较冠髓细胞更加原始性,易诱导矿化。充分体现出牙髓干细胞存在全部牙髓中的可能性极高,牙髓干细胞根髓中的密度较冠髓中高。郭俊等^[12]选用犬磨牙获取牙髓,以组织块法、酶消化取原代牙髓细胞,分析流式法、免疫荧光鉴定细胞蛋白表达,进行牙本质、成脂诱导,结果显示,两组检验法法均可获取贴壁、集落生长的梭形细胞并稳定增殖,成牙本质诱导可见矿化结节,ALP、DSP 阳性,说明犬健康年轻磨牙牙髓组织中可以稳定分离出具有克隆能力的牙髓干细胞。

3 牙髓干细胞的生物学特性情况分析

目前,和干细胞存在明确联系的分子标记较少,因此缺少干细胞的特异性标记,致使直接筛选干细胞的难度较高,加上髓干细胞的特异性分子标志也较少,所以,多采用高度增殖与自我更新能力、多向分化能力等相关生物学特性对牙髓干细胞进行确认^[13-15]。

3.1 高度增殖与自我更新能力 高度增殖能力是指牙髓干细胞在体外培养中的增殖率较骨髓基质干细胞高,同时牙髓干细胞在传代中同样具有较高的增殖能力^[16]。黄琬雪等^[17]分析体外人乳牙牙髓干细胞与其联合 IL-6 抗体对干燥综合征患者外周血活化的 CD4⁺T 细胞免疫抑制效应,结果显示 IL-6 抗体的添加,有助于降低 CD4⁺T 细胞内 Th2 比例,由此可知,体外人乳牙牙髓干细胞的应用效果显著,利于阻断干燥综合征患者 CD4⁺T 细胞的增殖;自我更新能力是指干细胞通过对称或者不对称分裂产生至少一个保留干细胞特性子细胞的过程,有助于维持干细胞的多分化潜能^[18]。牙髓干细胞具有多向分化的潜能,在形成矿化结节能力的同时也可以在不同细胞因子诱导下能够分化成多种细胞系类型,如肝、

神经、骨、肌肉等,其有助于改善兔眼角膜缺损处,加速伤口愈合速度,也可替代受损肝细胞发挥抗炎、抗纤维化等功效,利于肝功能的恢复等^[19]。刘南霞^[20]等人以克隆化传代法对犬牙髓干细胞进行培养,获取多克隆来源细胞,同时检验其克隆形成率,然后选用流式法对干细胞表面标志物予以鉴定,并在扩大培养后进一步检测细胞自我更新能力、多向分化能力,结果显示,克隆化传代法的应用,可以获取犬牙髓干细胞(呈集落生长),克隆形成率在 20%~35%。此外,流式法鉴定结果得出 STRO-1 阳性率为 (14.7%)、CD34 为阳性率(0.7%)、CD45 阳性率为(0.8%)。充分体现出克隆化分离培养的犬牙髓干细胞具有较强的自我更新能力、多向分化潜能。

3.2 多向分化能力 牙髓干细胞在不同因子诱导下可分化为中胚层细胞(成骨细胞、成牙本质细胞等)、外胚层细胞(角膜上皮细胞、神经细胞等),具体分析如下:①向成骨细胞分化:史欣^[21]等以矿化液培养 DPSCs 为观察组、在此基础上加入适量浓度 OPN 为对照组,均行茜素红染色法,测定矿化结节的形成,分析骨源性基因(BSP、Runx-2、OCN、Col-1 等)表达情况。结果得出,茜素红染色法发现诱导培养 28 d 后 观察组出现的矿化结节数量、大小均较对照组高 ($P<0.05$)。并且在 OPN 诱导培养 7 d 后,两组 DPSCs 骨源性基因表达呈阳性,同时 OPN 组的骨源性基因(BSP、Runx-2、Col-1、OCN 等)表达水平较对照组高 ($P<0.05$),说明骨桥蛋白可以促进矿化液诱导 DPSCs 成骨分化能力的增强;②向成牙本质细胞分化:孙佳琦^[22]等以体外培养人牙髓干细胞,分别和硅化胶原、胶原材料进行复合,建立细胞-支架复合体,加以矿化诱导液、常规培养液培养,分析培养 48 h、14 d、3 周 时在两种胶原支架材料中人牙髓干细胞的生长,同时使用半定量 PCR、实时定量 PCR 法分析两种材料中 D SPP、DMP-1、OCNmRNA 表达水平。结果显示,人牙髓干细胞在硅化胶原支架材料上的生长情况类似于胶原材料,并且经过硅化处理胶原支架材料,便于提高牙本质再生相关基因(OCN、DSPP、DMP-1 等)的表达水平,体现出胶原支架材料经过硅化处理,利于牙髓干细胞向成牙本质细胞分化;③向脂肪细胞分化:Lee^[23-24]等人研究指出,病毒转染的肽基脯氨酰基顺反异构酶 PINI 对 DPSCs 向脂肪细胞分化起到促进作用,结果显示,随着脂滴的增多,成脂分化相关基因(过氧化物酶增生激活受体、脂肪酶和脂肪酸结合蛋白基因)表达水平也

随之增强,两者呈正相关;④向神经细胞分化:李双月^[25]等人以大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)为研究对象,采用全骨髓贴壁法对其进行分离、培养、鉴定,观察其细胞形态、生长增殖情况;以流式鉴定细胞表面标志物;对第 3 代细胞提供 RA、bF-GF、EGF 联合诱导,加以细胞免疫化学染色测定神经细胞标志物神经元特异性烯醇化酶(NSE)表达。结果显示,体外培养 BMSCs 呈成纤维细胞样,经诱导后分化为神经细胞,可以明显表达神经细胞标志 NSE,说明 BMSCs 在诱导下可分化为神经细胞,便于为日后移植治疗神经系统损伤提供依据。

4 总结

经过上述内容分析,牙髓干细胞具有良好的分化潜能、自我更新能力、高度增殖能力等生物活性。此外,牙髓干细胞还具备良好的牙髓、牙本质再生能力,所以,牙髓干细胞可以作为组织工程学中极具潜力的种子细胞。可见,牙髓干细胞在组织生物学、再生医学等方面取得了明显的进步,应用前景十分广阔。但是牙髓干细胞仍然面临诸多问题,如牙髓干细胞的高效率定向分化存在一定程度的困难;牙髓干细胞尚无特异性细胞表面标志物;牙髓干细胞存在形成肿瘤的风险;牙髓干细胞随着年龄的增长,其组织修复能力降低;牙髓干细胞相关研究多数为人体外实验/动物实验,需要进一步研究牙髓干细胞在疾病治疗方面的影响等。相信随着当前临床实践研究的不断深入,牙髓干细胞在今后组织工程领域得以发挥重大作用。

参考文献:

[1]王亦菁,张晓东,于华,等.体外成牙环境对牙髓干细胞和胚胎间充质干细胞分化的影响[J].华西口腔医学杂志,2012,30(6):579-583.

[2]王艳梅,木合塔尔·霍加,庄友梅,等.TGF- β 3与牙髓干细胞联合应用对兔面神经损伤修复的作用[J].国际生物医学工程杂志,2012,35(3):160-164,3-4.

[3]庄友梅,木合塔尔·霍加,许辉,等.转化生长因子- β 3和牙髓干细胞在兔面神经损伤修复中作用[J].中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(7):637-639.

[4]董海波,李艳萍,牛玉梅,等.模拟微重力对人牙髓干细胞微丝及细胞迁移能力的影响[J].口腔医学研究,2012,28(7):673-675.

[5]张红梅,王永刚,张晓梅,等.脱矿牙本质基质对人牙髓干细胞体外增殖、牙向分化能力的影响[J].口腔医学,2012,32(3):143-147.

[6]王晓航,巴景斌.两种乳牙根管填充剂的临床疗效比较[J].蚌埠医学院学报,2015,40(4):488-489.

[7]张晓莉.TGF- β ₃和牙髓干细胞修复损伤面神经效果的检测[D].新疆医科大学,2013.

[8]胡资兵,曾荣,魏波,等.牙髓干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究[J].中国脊柱脊髓杂志,2014,24(9):839-846.

[9]Gronthos S,Mankani M,Brahim 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.

[10]Liu H,Li W,Shi S,et al.MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate[J].Arch Oral Biol,2005,50(11):923-928.

[11]刘少华,魏奉才,孙善珍,等.牙髓培养细胞特性与牙髓干细胞定位[J].上海口腔医学,2004,13(2):106-109.

[12]郭俊,贺露,杨健.犬牙髓干细胞的分离培养与鉴定[J].实用口腔医学杂志,2016,32(1):99-103.

[13]王钰莹,运慧媛,缪宏颖,等.成骨细胞与矿化液诱导牙髓干细胞向成骨细胞分化的对比研究[J].中华口腔医学杂志,2012,47(6):364-368.

[14]贾谦.碱性成纤维细胞因子对牙髓干细胞矿化能力影响及机制研究[D].第四军医大学,2012.

[15]蒋文凯.牙髓干细胞克隆差异及其应用于神经和平滑肌再生方面的初步研究[D].第四军医大学,2016.

[16]关丽娜.低氧环境下 Notch 信号通路对人牙髓干细胞增殖和分化的影响[D].第四军医大学,2015.

[17]黄晓雪,阮光峰,王艳青,等.人乳牙牙髓干细胞对干燥综合征患者 CD4⁺T 细胞的免疫抑制效应[J].同济大学学报(医学版),2017,38(1):12-17.

[18]崔力.抑制瞬时受体电位 M7 通道表达对人牙髓干细胞增殖、迁移及成骨/成牙向分化的影响[D].南方医科大学,2013.

[19]李晓霞,方滕蛟,余湜,等.人乳牙牙髓干细胞在干细胞治疗中的应用[J].华西口腔医学杂志,2017,35(5):533-537.

[20]刘南霞,程百祥,赵寅华,等.犬牙髓干细胞的分离培养及其生物学特性研究[J].口腔医学研究,2013,29(3):228-232.

[21]史欣,张鹏飞,孙玉芬,等.骨桥蛋白影响矿化液诱导牙髓干细胞成骨分化能力的研究[J].口腔医学,2014,34(8):566-569.

[22]孙佳琦,牛丽娜,沈丽娟,等.硅化胶原对人牙髓干细胞成牙本质分化的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2013,23(11):700-704.

[23]Lee YM,Shin SY,Jue SS,et al.The role of PIN1 on odontogenic and adipogenic differentiation in human dental pulp stem cells[J].Stem Cells Dev,2014,23(6):618-630.

[24]Lindemann D,Werle SB,Steffens D,et al.Effects of cryopreservation on the characteristics of dental pulp stem cells of intact deciduous teeth[J].Arch Oral Biol,2014,59(9):970-976.

[25]李双月,王哲敏,陈若霖,等.体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的实验研究[J].大连医科大学学报,2014,36(1):7-10.

收稿日期:2017-10-30;修回日期:2017-11-14

编辑/成森