

文章编号: 1004-0374(2010)10-1031-04

牙髓干细胞的研究进展

荣 靖¹, 周向荣², 刘秋英¹, 王一飞^{1*}

(1 广州(暨南)生物医药研究开发基地, 广州 510632; 2 亚太干细胞研究中心有限公司, 香港)

摘 要: 牙髓干细胞是来源于牙髓组织中的一种成体干细胞, 该种细胞具有高度增殖、自我更新的能力和双向分化潜能。牙髓干细胞的研究对牙髓再生、牙体修复等牙组织工程将产生重要的意义。该文就牙髓干细胞的研究现状作一综述, 并对其应用前景进行探讨。

关键词: 牙髓干细胞; 低温储藏; 组织再生

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Study progress of dental pulp stem cells

RONG Jing¹, ZHOU Xiang-rong², LIU Qiu-ying¹, WANG Yi-fei^{1*}

(1 Guangzhoujinan Biomedicine Research & Development Center, Guangzhou 510632, China;

2 Asia Pacific Stem Cell Science Limited, HongKong, China)

Abstract Dental pulp stem cells (DPSCs) is a kind of adult stem cells derived from dental pulp and possess high proliferation rate, self-renewal capability and multiple differentiation capability. The study of DPSCs presents important significance in dental tissue engineering, such as dental restoration and dental pulp regeneration. In this review, we introduced the progress of studies on dental pulp stem cells and discussed their clinical applications.

Key words: dental pulp stem cells; cryopreservation; tissue regeneration

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是成体干细胞的一种, 具有向多种组织细胞类型分化的能力, 可分化为成骨、软骨、脂肪、成肌等多种中胚层来源的细胞。人们首先在骨髓中确认了MSCs的存在, 此后, 又从许多其他组织中分离, 鉴定出了这类细胞。骨髓、脂肪组织、骨膜、骨骼肌、成体外周血、脐带血、血管周皮细胞、骨组织、羊水、脾脏和真皮都可能成为MSCs的来源, 存在于牙髓中的牙髓干细胞也是MSCs的一种。目前牙髓干细胞被公认对于牙本质的损伤修复具有非常重要的作用。

1 牙髓干细胞的概念

牙髓干细胞是位于牙髓组织的一种成体干细胞, 牙髓是被坚硬的牙本质所包围的一种疏松结缔组织, 其由外向内分为4层: (1)最外层由可形成牙

本质的成牙质细胞构成; (2)第二层称为“无细胞层”, 含有少量细胞和丰富的细胞外基质; (3)第三层称为“多细胞层”, 内含具有可塑性和多能性的祖细胞^[1]; (4)血管区和神经丛存在于牙髓的最内层。牙髓细胞在体外培养时表现出高度的自我更新能力和多元分化性, 将牙髓细胞移植到免疫缺陷型的小鼠体内, 能够产生牙本质牙髓复合体, 并且牙髓细胞在一定的外界诱导条件下, 可以向骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等多种细胞方向分化, 这说明牙髓中可能含有干细胞^[1]。在胚胎发育

收稿日期: 2010-04-28; 修回日期: 2010-06-28

基金项目: 国际科技合作项目(2008DFA30590); 广州(暨南)-香港细胞工程联合实验室项目

*通讯作者 E-mail: twangyf@jnu.edu.cn

的第六周,当神经嵴细胞迁移到头颈间充质部位以后,外胚层开始分裂增殖,导致牙板发生。随后,在外胚层和中胚层的相互作用下^[2,3],卵形结构开始分隔,形成牙胚,而神经嵴细胞此时开始向牙乳头、牙囊方向分化,构成了牙齿以及牙周的主要部分^[4]。由此可见,牙髓在发生上是由外胚层和间充质两种组分构成,其中所含有的神经嵴细胞具有可塑性和多向分化潜能^[5]。当齿冠矿化后,残留的牙髓被包裹在这种坚硬的结构中,避免受到外界环境的分化刺激,在牙髓腔中形成了一种密封的生态龕,这一点或许可以用来解释,为什么在成人的牙髓组织中,我们仍然可以发现大量的干细胞。

Gronthos等^[6]于2000年首次从牙髓中分离得到干细胞,他们将人类健康的第三磨牙牙髓经过酶消化的方法制成单细胞悬液并培养,得到了具有形成细胞克隆的能力以及表现出高度增殖能力的细胞,他们将其命名为牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)。这些细胞在体内和体外都可形成矿化组织。从其中分离出的单个细胞克隆也显示出多潜能性,在体外可形成脂肪细胞和神经前体细胞,并且可以在免疫缺陷型的小鼠体内生成牙本质牙髓复合体。将DPSCs与骨髓基质干细胞进行比较,结果发现,它们具有相似的免疫表型,但牙髓干细胞具有更高的克隆形成率和增殖率,且表现出很强的钙化组织形成能力,经体外诱导,能形成分散而高密度的钙化小结和成牙本质细胞。同年,Couble等^[7]将从健康人牙髓中分离提取的牙髓细胞中加入磷酸甘油进行诱导分化后,牙髓细胞出现极化,相互之间发生连接,形成复合体,胞内出现牙本质细胞所具有的典型细胞器,这些细胞还能够分泌富含I型胶原的基质并矿化,证实了牙髓中存在着能够分化为成牙本质细胞的前体细胞。

目前认为牙髓组织中存在的具有形成细胞克隆能力和高度增殖能力、具备多向分化潜能、在光学显微镜和相差显微镜下呈均一的成纤维细胞样的细胞就是牙髓干细胞。多年来,大多数关于牙髓干细胞的研究都是在组织培养或者原代牙髓细胞培养的基础上进行的,成体牙髓组织的来源局限。目前,常从成人正常阻生的第三磨牙和脱落的乳牙中提取牙髓组织^[8]。

2 牙髓干细胞的鉴定

牙髓干细胞在不同诱导剂的作用下,可以分化

为多种细胞^[9,10]。Laino等^[11]从34例17~39岁年龄的患者中取出第三磨牙,分离他们的牙髓组织获得人牙髓干细胞,诱导分化出了成骨细胞。Almushayt等^[12]发现牙髓干细胞可以被诱导分化成牙本质细胞。Zhang等^[13]利用酶消化法分离人第三磨牙中的牙髓干细胞,经鉴定证实为人牙髓干细胞,且能维持其生物学特性至少25代左右,其后他们分别用神经、骨、脂肪、成纤维和软骨细胞诱导介质诱导人牙髓干细胞,发现其具有向5个方向分化的潜能。

Gronthos等^[6]应用免疫组化技术研究DPSCs的表面分子标记,并与骨髓基质干细胞比较,其结果表明,DPSCs和BMSCs表达极为相似的蛋白,即均不表达造血细胞表面抗原CD14、CD45、CD34以及其他组织标记物,如成肌分化抗原MyoD、神经微丝、II型胶原、过氧化物酶体增殖激活受体 $\gamma 2$,均表达与内皮细胞(血管细胞黏附分子1、CD146)、平滑肌细胞(α -平滑肌肌动蛋白)、骨细胞(碱性磷酸酶、I型胶原、骨连接素、骨桥素、骨钙素)和成纤维细胞(III型胶原、成纤维细胞生长因子2)有关的分子标记。DPSCs不表达骨基质蛋白、骨涎蛋白,而在BMSCs为低水平表达。用Northern blot方法研究发现,DPSCs不表达成牙本质细胞的特异性标记物牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP),说明DPSCs处于未分化状态,尚未分化为成熟的成牙本质细胞。DPSCs较高表达XVIII $\alpha 1$ 型胶原、胰岛素样生长因子2、盘状结构域酪氨酸激酶、NAD(P)H-维生素K3氧化还原酶、周期素依赖性蛋白激酶6等, BMSCs较高表达胰岛素样生长因子连接蛋白27和I $\alpha 2$ 型胶原。Liu等^[14]研究发现,DPSCs发生分化时,Runx2、TGF β 相关基因、胶原代谢相关基因在初始时上调,碱性磷酸酶活性上升,之后下降,而在DPSCs分化过程中惟一下降的标记物是细胞外基质磷糖蛋白(matrix extracellular phosphoglycoprotein, MEPE)。Liu等^[14]认为,MEPE是矿化的抑制剂,在DPSCs分化时下调,可作为DPSCs分化时的检测指标。DPSCs与牙髓成纤维细胞很相似,单从形态学上很难区分,而其在牙髓中的定位和特异性分子标记还不是很明确,一般都是DPSCs向成牙本质细胞定向诱导分化后,通过诱导前后的细胞表面标记来鉴定。目前常用于鉴定的细胞标记物主要包括:波形丝蛋白、I型胶原、碱性磷酸酶(ALP)、牙本质涎磷蛋白及牙本质基质蛋白等^[15]。

3 牙髓干细胞的增殖及体外培养

DPSCs的多克隆细胞群,其细胞群体倍增次数可超过120次;DPSCs的单克隆细胞则可增殖10~20代,其中一些细胞能够传到20代以上,从而产生足够的细胞来形成牙髓样复合体。在人的DPSCs中,大约有三分之二的单克隆细胞可以形成与多克隆细胞相同量的牙本质,而另外的三分之一则只形成很少的牙本质^[16]。Gronthos等^[6]曾将DPSCs与骨髓基质干细胞(BMSCs)进行了增殖情况的比对研究。在同样的接种密度下,DPSCs的克隆形成率为每万个细胞产生22~70个克隆,BMSCs则为每万个细胞有2.4~3.1个集落,说明成人牙髓干细胞相较于BMSCs具有更高的集落形成能力,并推测牙髓组织中干细胞的含量可能高于骨髓组织。

由于DPSCs的体外培养耗时长和占用空间较大,而且容易污染,随着组织工程学的发展,人们开始利用组织工程学的方法对牙髓细胞进行体外三维立体培养^[15]。侯延华等^[17]用酶消化法分离获得牙髓干细胞,对牙髓干细胞在体外进行二维和三维空间培养,并比较其增殖效率。结果发现人牙髓干细胞在体外呈克隆样生长,在二维空间里培养,细胞密度提高了4.12倍,而在三维空间里培养,细胞密度提高了11.06倍。这说明三维培养是扩增牙髓干细胞的有效方法。李珊等^[18]采用冷冻干燥法制备壳聚糖-磷酸三钙复合材料,将酶消化法分离培养,并达到一定数量级的人牙髓干细胞,与支架材料进行复合培养,通过扫描电镜观察细胞的生长情况,结果显示,复合材料具有良好的多孔网状结构,使得成人牙髓干细胞与材料表面紧密贴附,生长良好,牙髓干细胞标志表达明显。这说明牙髓干细胞可以在体外进行三维培养,且较普通的二维培养有显著优势。我们可以利用微载体和旋转式细胞培养系统相结合的三维培养方法来解决DPSCs体外培养困难的问题。

4 牙髓干细胞的低温储藏

细胞和组织的深低温保藏技术现今已有了显著提高,牙髓干细胞作为一种易于获取的干细胞来源,可以被冷冻保存很长一段时间^[19],并且可以用来建立成人组织再生的“冷库”^[20]。Zhang等^[13]发现,DPSCs可以在深低温保藏后仍然保有分化潜能。随后,Laino等^[21]研究了DPSCs及其分化而来的成骨细胞在经历了2年的冷冻并进行复苏后的细

胞活性。结果表明,这两种细胞都可以很容易的被深低温冷冻及复苏,且细胞活性可保持不变,这使得他们有望成为延迟治疗中有效且可靠的细胞来源,可以根据患者的需要用来进行组织修复。

从DPSCs分化而来的成骨细胞,即使经过长时间的深低温冷冻,仍然能够像新鲜细胞一样,可以快速的重新开始增殖并生成矿化基质^[21,22],而且与新鲜细胞的增殖情况相比没有凋亡细胞。此外,这些成骨细胞仍保有它们的多能性,且在至少100个25 cm²细胞培养瓶中观察到生成了大量的编织骨。把这种骨组织样本移植到免疫抑制型的大鼠体内后,可观察到其被重塑成为板层骨,这更进一步证明了它们的活力。

Seo等^[23]研究表明,对整个牙髓进行冷冻保藏可以有效提高其复苏时的安全性,因此这也需要各种不同的全髓冷藏技术进行支持。这些细胞的特性和潜能使得其在组织的三维重建这一治疗过程中拥有诱人的应用前景,即可以根据患者的需要来方便的进行保存和复苏。

5 应用及展望

我们对于牙髓组织的生物学认识在近年来有了很大的进步,这使得我们在分子及细胞领域可以对牙齿再生提出更强有力的假设。尽管人们对于多种参与牙齿再生的细胞和信号现象了解的越来越多,但是由于没有哪两次再生的过程是完全相同的,因此目前仍然不能确定的说某种细胞以及某种特异的分子信号通路主导着牙齿再生这一进程。

DPSCs的发现让我们从细胞水平认识牙齿的发育和再生修复机制,为牙髓疾病的治疗以及牙齿组织工程的发展带来了新的曙光。目前临床上获取牙髓干细胞的最具可行性的方法是从患者自身拔除的智齿中收集牙髓,或是利用牙髓摘除术获取自体牙髓材料。使用牙髓干细胞等牙源性干细胞进行体内和体外的组织重建,是牙齿再生修复的重要渠道,由于DPSCs的取材避免了免疫排斥和道德伦理问题,且获得的干细胞具有很好的增殖力并具有多向分化能力,因此其不仅可以应用于牙组织工程,还可以作为骨组织工程的种子细胞,应用于骨缺损的临床修复中,增加了种子细胞的来源。

[参 考 文 献]

- [1] Sinanan AC, Hunt NP, Lewis MP. Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell-adhesion-molecule (NCAM;

- CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 40(Pt1): 25-34
- [2] Lesoth H, Lisi S, Peterkova R, et al. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*, 2001, 15: 8-13
- [3] Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, et al. Laminin $\alpha 2$ is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *J Bio Chem*, 2004, 279(11): 10286-92
- [4] Bosshardt D D. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res*, 2005, 84(5): 390-406
- [5] Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 2006, 184(3-4): 105-16
- [6] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13625-30
- [7] Couble M L, Farges J C, Bleicher F, et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int*, 2000, 66(2): 129-38
- [8] 刘振山, 耿传营, 刘玉凤. 牙髓干细胞的研究与进展. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(34): 6727-30
- [9] 刘宏胜, 白小文, 杨媛. 人类年轻恒牙牙髓干细胞体外多向分化的能力. *北京大学学报: 医学版*, 2007, 39(1): 41-5
- [10] 何飞, 谭颖徽, 张纲. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(1): 75-8
- [11] Laino G, Carinci F, Graziano A. *In vitro* bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*, 2006, 17(3): 511-5
- [12] Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, et al. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*, 2006, 13(7): 611-20
- [13] Zhang W, Walboomers X F, Shi S, et al. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*, 2006, 12(10): 2813-23
- [14] Liu H, Li W, Shi S, et al. MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol*, 2005, 50(11): 923-8
- [15] 王宏, 黄克强. 牙髓干细胞的体外分离培养与鉴定. *辽宁医学院学报*, 2008, 29(3): 285-7
- [16] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 2002, 81(8): 531-5
- [17] 侯延华, 谭颖徽, 姚韶武, 等. 人牙髓干细胞体外二维和三维培养的实验研究. *第三军医大学学报*, 2006, 28(9): 949-51
- [18] 李珊, 樊明文, 梁素霞. 成人牙髓干细胞与壳聚糖-磷酸三钙复合材料相容性试验研究. *口腔医学研究*, 2006, 22(3): 264-6
- [19] Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: A cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 2006, 208(2): 319-25
- [20] Graziano A, Biunno I, De Blasio P, et al. The tissue banking in cancer and stem cell research. *J Cell Physiol*, 2007, 212(2): 345-7
- [21] Laino G, Graziano A, d'Aquino R, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*, 2006, 206(3): 693-701
- [22] Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, 2005, 20(8): 1394-402
- [23] Seo BM, Miura M, Sonoyama W, et al. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*, 2005, 84(10): 907-12