

[文章编号] 1000-1182(2008)02-0115-03

· 专家论坛 ·

牙齿再生——梦想与现实

王松灵, 王学玖

(首都医科大学口腔医学院 基因治疗分子生物学实验室, 北京 100050)

[摘要] 牙齿及牙列缺失在临床上很常见,目前的修复方法均为非生物性的,尚不能满足人们的要求。实现真牙再生一直是一个梦想。牙齿再生分为全牙再生和部分牙齿再生,前者目前尚存在相当大的困难,但后者已有可喜进展,已在小鼠及大型动物小型猪上成功再生出生物牙根,有望成为全牙再生成功前良好的过渡。研究表明骨髓中部分细胞在一定条件下可以直接分化为成釉上皮样细胞及成牙本质细胞,有望成为牙齿再生的间充质来源的种子细胞。

[关键词] 牙齿再生; 牙根再生; 骨髓间充质干细胞; 成釉上皮细胞

[中图分类号] Q254 [文献标识码] A

Tooth regeneration—dream to reality WANG Song-ling, WANG Xue-jiu. (Molecular Laboratory for Gene Therapy, School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

[Abstract] Tooth or dentition missing compromises human health physically and psychiatrically. Although several prosthesis methods are used to restore tooth loss, these restorations are still non-biological methods. It is a dream for human being to regenerate a real tooth for hundreds years. There are two ways to regenerate the tooth. One is application of conventional tissue engineering techniques including seed cells and scaffold. The other is regeneration tooth using dental epithelium and dental mesenchymal cells based on the knowledge of tooth initiation and development. Marked progress has been achieved in these two ways, while there is still a long way to go. Recently a new concept has been proposed for regeneration of a biological tooth root based on tooth-related stem cells and tissue engineering technique. A biological tooth root has been regenerated in swine. It may be a valuable method for restoration of tooth loss before successful whole tooth regeneration. A latest research showed that a subpopulation in bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells when mixed with embryonic epithelium and reassociation with integrated mesenchyme, which may provide a new seed cell source for tooth regeneration.

[Key words] tooth regeneration; dental root regeneration; bone marrow mesenchymal stem cells; ameloblast

牙齿也许不是人类最重要的器官,但应该是人类最关心的器官之一,牙齿缺失或全牙列缺失非常常见,虽不会危及生命,但由此带来的身心健康问题显而易见。因此,人类很早就开始尝试牙齿缺失的修补,如将一颗兽牙或其他骨质放在牙齿缺失处,以绳索和邻牙栓结^[1]。直到近年来发展到以种植义齿修复缺失牙齿^[2]。但无论何种修复技术,其最终的作品还是一颗“假牙”。“真牙”修复仍然还停留在梦想阶段。

21世纪是个充满希望的世纪,人类渴望在这一新世纪解决很多困扰已久的难题,如治愈恶性肿瘤,实现器官再生等。在牙科学领域,人们盼望着实现真正的牙齿再生。经过口腔医学科学家的努

力,最近这个问题有了可喜的进步。

要再生一颗完整的牙齿,需要突破很多瓶颈,解决很多再生医学共同的难题,如种子细胞来源、器官胚胎培养、移植等^[3]。目前在其他器官再生尚未取得突破的情况下,全牙再生有较大难度。然而,牙齿还有一个其他器官不具备的特点,牙冠部分相对较易仿制,而牙根不易替代。现阶段的材料科学发展较快,烤瓷技术可以烤出几乎可以跟真牙媲美的牙冠的外观,同时可以满足大部分的功能,尽管容易崩裂,但可以修复。牙根就不一样了,种植牙的种植钉诚然可以与牙槽骨结合的较好,但缺乏天然牙根的重要结构——牙周膜,这就引起了种植牙难以克服的问题,没有天然牙的生理动度,缺少天然牙牙周膜的防御机制,牙颈部容易产生炎症,骨质吸收,有不良口腔嗜好者后果更差,久而久之种植钉难免脱落^[4],导致修复失败。因此,如果能再生一个具有牙周膜结构的牙根,则将极大提高

[收稿日期] 2008-01-31; [修回日期] 2008-02-24

[作者简介] 王松灵(1962-),男,湖南人,教授,博士

[通讯作者] 王松灵, Tel: 010-67062012

牙齿修复的效果。因此,牙齿再生包括两大类,分别为部分牙齿再生如牙根再生和全牙再生,二者所采用的策略有类似也有不同。

目前,首都医科大学课题组和美国南加州大学课题组合作在利用牙齿干细胞进行生物牙根再生方面取得了可喜的研究成果^[5]。2000年自牙髓中分离出了一种呈集落状生长的细胞,经诱导分化后可以产生牙本质样结构,并具有增殖分化等干细胞特性,因此首次提出了牙髓干细胞的概念^[6]。于2003年再次自脱落人乳牙中分离出牙乳头干细胞,并命名为SHED(stem cells from human exfoliated deciduous teeth)^[7]。2004年成功分离、鉴定了牙周膜干细胞^[8]。在大型动物模型小型猪上从事生物牙根的研究,其基本思路是在羟磷灰石和磷酸三钙形成的牙根形状生物支架上植入牙周膜干细胞和牙乳头干细胞,再植入到生物体内,以期再生出具有牙周膜结构的生物牙根,经过反复尝试,在小鼠及小型猪上均获得成功^[9]。目前正在从事生物牙根临床应用前的各项研究,期望在不久的将来该生物牙根再生技术可应用于临床。

部分牙齿再生的首要问题是种子细胞问题。作为种子细胞必须满足以下几个条件:1)可用性,理想的种子细胞应能生成所需的组织并发挥正常的功能。2)易得性,种子细胞在需要时易从人体自身获取且方法简单,造成的创伤小,对患者无危害。3)种子细胞可扩增性,种子细胞在提供给适当的环境和条件后可大量扩增直至满足形成可发挥功能组织的细胞需要量。能较好地满足以上条件的是各种成体干细胞。迄今为止,有干细胞特性的可用于牙齿组织再生的种子细胞有:1)牙髓干细胞,具有自我更新能力,体内外可分化为成牙本质细胞,并分泌牙本质或牙本质样组织。Granthos等^[6]于2000年最早提出了牙髓干细胞的概念,其从成体牙髓组织中分离得到一种细胞,呈集落状生长,体外可诱导分化形成牙本质样结构,具有增殖分化等干细胞特性。后来一些学者也报道了自牙髓组织中成功分离出牙髓干细胞, Miura等^[7]于2003年报道从脱落乳牙的残留牙髓中分离出了多潜能的能够分化为成牙本质样结构的干细胞群,称为SHED。该细胞同时可以横向分化脂肪细胞、神经细胞等。2)牙周或牙囊干细胞, Seo等^[8]于2004年通过单克隆选择和免疫磁珠分选等方法从第三磨牙牙周组织中分离出一种干细胞,该细胞表达间充质干细胞标记物STRO-1和CD146/MUC18,在特定的培养条件下,该细胞可以分化为成牙骨质样细胞、脂肪细胞和胶原形成细胞。移植入免疫缺陷鼠类体内可以产生牙骨质、牙

周膜复合体结构。Morsczeck等^[9]也报道了自人类第三磨牙的牙囊中分离出一种前体细胞,这些纤维细胞样的、有克隆形成能力的细胞表达准干细胞标记物Notch-1和Nestin,在含有地塞米松的培养液中长期培养可以形成钙化结节或显示出结缔组织样结构,植入免疫缺陷鼠体内,表达骨钙蛋白和骨涎蛋白等。3)牙乳头干细胞, Kikuchi等^[10]于2004年报道,在一个设计的三维培养环境中,牙乳头细胞中的一些细胞分化为柱状极性细胞,并伸出细胞突到细胞外基质中,这些细胞表达牙本质涎磷蛋白和牙本质基质蛋白1等成牙本质细胞分化特异性基因。同时,这些细胞分泌的管状细胞外基质经长时间培养后可以形成钙化,证实牙乳头中确实存在能分化为成牙本质细胞的干细胞或前体细胞。谢家敏等^[11]体外培养牙乳头细胞发现 型胶原蛋白、纤维蛋白连接素和层粘连蛋白等染色阳性,经27 d培养后可形成钙化小节。4)骨髓间充质干细胞,研究发现骨髓基质干细胞和早期胚胎口腔上皮重组,体外培养一段时间后移植入宿主动物的体内,重组物持续发育并产生一定量的牙齿硬组织,暗示其可被用作牙齿组织工程的种子细胞^[12]。

以上研究可以发现,可用于部分牙齿再生的间充质来源的干细胞类型较多,而能作为牙齿再生上皮干细胞来源的细胞类型缺如。首都医科大学课题组和法国路易巴斯德大学课题组合作的新近研究成果为这一问题的解决提供了希望。研究发现,全骨髓细胞和牙胚上皮细胞混合后再和完整的牙胚间充质重组培养,全骨髓细胞中有少量细胞可以转化为牙胚上皮细胞,为了进一步证实这一结论,将转基因荧光小鼠骨髓中c-kit阳性的细胞富集再和完整的间充质培养,经免疫组织化学和原位杂交实验证实确实转变成了成釉上皮样细胞,并通过性染色体荧光原位杂交实验排除了可能因为细胞融合而产生的假象^[13]。这有可能为牙齿再生所需的上皮种子细胞提供可行的来源。

部分牙齿再生的另一个难题是牙齿体外再生环境,组织工程牙齿在一定环境中才能持续发育,依赖环境提供生长所需的各种养分、氧气并排出二氧化碳等废物,体外培养牙胚一段时间,牙胚继续发育。体外培养重组的牙胚组织(原始口腔上皮和各种间充质细胞,包括骨髓间充质干细胞)1~3 d^[12]。Hu等^[14-15]使用半固态的培养基培养牙胚,含有DMEM/F12、质量分数为20%的胎牛血清、0.18 mg/mL的维生素C、谷氨酰胺和双抗等。目前为止,体外尚不能无限时培养牙胚,体外培养至一定阶段时必须移植到体内环境。将大鼠或猪的牙胚混合细胞种植在

牙齿形态的聚乳酸-羟基乙酸或聚羟基乙酸等生物支架上,然后移植到大鼠的大网膜内,外植物持续生长^[16-17]。将重组的牙胚移植到鼠的肾囊下^[12],这些体内环境血供丰富,有利于外植物生长。牙齿再生到底需要什么样的微环境尚有待进一步研究。

部分牙齿再生已有突破性进展,而全牙再生相对进展较慢,就目前的研究而言全牙再生有两种方案,一是利用生物支架和种子细胞,Young等^[17]将猪出生后未萌出的牙胚打碎成牙胚细胞,然后种植到牙齿形态聚乳酸-羟基乙酸等生物支架上,移植到宿主的大网膜内,一段时间后发育成一颗类似牙齿的组织,含有釉质、牙本质和牙骨质等,但其大小远小于生物支架,其可行性和实用性有待进一步研究。二是不利用生物支架,完全重复牙齿的发育过程^[18]。首都医科大学课题组和法国路易巴斯德大学课题组将牙齿胚胎性上皮和间充质分离,然后体外重新组合,在培养基中可以继续发育至一定阶段,后回植到皮下获得牙冠、牙根及牙周组织再生。同时证明牙胚间充质的完整性在牙齿生长发育的形态控制方面起到关键的作用^[19]。将胚胎口腔上皮和骨髓间充质细胞等组合培养后,再移植到宿主肾囊下,成功发育出类牙齿组织^[12]。

牙齿再生最关键的一个瓶颈是目前对于牙胚发育的调控机制尚未探明,即还没有完全了解大自然是如何制造出一颗牙齿的,这也是所有器官再生的问题,因此,加快研究牙胚发生、发育的调控机制将会促进牙齿再生的进程。得益于分子生物学研究技术突飞猛进的发展,近10余年来牙齿生长发育分子调控机制的研究已取得了大量宝贵的研究成果,离完整掌握牙胚发生、发育机制已经不再遥远,届时,将利用这些机制去重复再生一颗真正意义上的自己的牙齿。也许在这一世纪,牙齿再生不再是梦想。

[参考文献]

[1] 周大成. 中国口腔医学史略[J]. 口腔医学纵横, 1985, 1(1): 8.
ZHOU Da-cheng. A brief review of Chinese stomatology history [J]. J Comprehensive Stomatol, 1985, 1(1): 8.

[2] Branemark PI, Adell R, Breine U, et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. . Experimental studies[J]. J Plast Reconstr Surg, 1969, 3(2): 81-100.

[3] 王正国. 再生医学——机遇与挑战[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(1): 1-4.
WANG Zheng-guo. Regeneration medicine—chance and challenge [J]. Chin J Trauma, 2006, 22(1): 1-4.

[4] Forna N, Burlui V, Luca IC, et al. Peri-implantitis[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 1998, 102(3/4): 74-79.

[5] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine[J]. PLoS ONE, 2006, 1: e79.

[6] 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 U S A, 2000, 97(25): 13625-13630.

[7] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(10): 5807-5812.

[8] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149-155.

[9] Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells(PCs) from human dental follicle of wisdom teeth[J]. Matrix Biol, 2005, 24(2): 155-165.

[10] Kikuchi H, Suzuki K, Sakai N, et al. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture[J]. Cell Tissue Res, 2004, 317(2): 173-185.

[11] 谢家敏, 田卫东, 汤 炜, 等. 人类牙乳头细胞的体外培养及细胞生物学形状研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2005, 23(3): 187-190.
XIE Jia-min, TIAN Wei-dong, TANG Wei, et al. Culture and characteristics of human dental papilla cells in vitro[J]. West China J Stomatol, 2005, 23(3): 187-190.

[12] Ohazama A, Modino SA, Miletich I, et al. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth[J]. J Dent Res, 2004, 83(7): 518-522.

[13] Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, et al. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells[J]. J Dent Res, 2006, 85(5): 416-421.

[14] Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, et al. Dental epithelial histomorphogenesis in the mouse: Positional information versus cell history[J]. Arch Oral Biol, 2005, 50(2): 131-136.

[15] Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, et al. Dental epithelial histomorphogenesis in vitro[J]. J Dent Res, 2005, 84(6): 521-525.

[16] Dualibi MT, Dualibi SE, Young CS, et al. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells[J]. J Dent Res, 2004, 83(7): 523-528.

[17] Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds[J]. J Dent Res, 2002, 81(10): 695-700.

[18] 胡 冰, 刘 怡, 王松灵. 从细胞到器官——牙组织工程任重而道远[J]. 上海口腔医学, 2005, 14(2): 99-102.
HU Bing, LIU Yi, WANG Song-ling. Tooth tissue engineering: From cells to organ, an odyssey far from finished[J]. Shanghai J Stomatol, 2005, 14(2): 99-102.

[19] Hu B, Nadiri A, Kuchler-Bopp S, et al. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium[J]. Tissue Eng, 2006, 12(8): 2069-2075.

(本文编辑 王 晴)