

·综述·

生物治疗在牙髓损伤修复中的应用研究

罗传霞^{1,2}综述 林正梅¹审校

(1.中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院牙体牙髓病科 广州 510055;

2.广州市番禺中心医院口腔科 广州 511400)

[摘要] 安全有效的活髓保存治疗方法一直是牙体牙髓病学研究的热点,但现有的治疗方法都存在许多不足。生物治疗近年来发展迅速,其中基因治疗和干细胞治疗能有效促进组织的修复与再生,在牙髓损伤修复中已有不少应用研究,本文就这方面的研究进展作一综述。

[关键词] 牙髓损伤; 修复; 基因治疗; 干细胞治疗

[中图分类号] R 781.05 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.01.013

Biological therapy for dentin-pulp complex regeneration and repair Luo Chuanxia^{1,2}, Lin Zhengmei¹. (1. Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China; 2. Dept. of Stomatology, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou 511400, China)

[Abstract] Safe and effective approaches for dentin-pulp complex regeneration and repair are the focus of scientist's research around the conservative dentistry. Whereas, all current therapies have limitations. Gene therapy and stem cell-based therapy which are brand-new biological therapies build more favorable situation for tissue regeneration and repair comparing with traditional treatment. This review will summarize current knowledge of gene-and stem cell-based therapies for dentin-pulp complex regeneration and repair.

[Key words] dental pulp exposure; repair; gene therapy; stem cell-based therapy

牙髓因受创或感染导致暴露时,其储备的未分化间充质干细胞迁移至损伤处增殖、分化为成牙本质样细胞,分泌牙本质基质,形成修复性牙本质,这是牙髓自身修复的潜能,也是活髓保存治疗的生物学基础^[1]。传统的活髓保存方法是利用生物活性分子促进损伤牙髓的修复,但生物活性分子在体内易被吸收,所需剂量大,限制了其在临床中的应用。随着对牙髓生物学认识的深入,新的活髓保存技术应运而生,其中以生物治疗方法最具代表性。生物治疗是近年来在分子生物学、分子免疫学等学科基础上发展起来的一种治疗方法,主要包括基因治疗和干细胞治疗。基因治疗可在一定时期内使局部保持一定浓度的生长因子,促进缺损组织的修复;干细胞治疗则利用干细胞增殖分化能力强的优势,将其应用于修

复缺损组织中。本文就基因治疗和干细胞治疗在牙髓损伤修复中的应用研究进展作一综述。

1 基因治疗

1.1 概述

基因治疗即将编码的目的基因片段整合入载体,转染靶细胞或组织,通过转基因的靶细胞持续大量分泌生长因子来修复损伤组织。基因治疗有 2 种方式:体内疗法、体外疗法。体内疗法指将目的基因直接或通过载体导入体内相关组织器官,基因在局部组织表达并发挥治疗作用。该方法简单、方便,但存在载体在体内被稀释或结合、转染靶细胞效率低等缺点。体外疗法则首先分离培养靶细胞,转染目的基因后再植入局部^[2]。该方法虽较复杂,需先分离培养细胞,在体外筛选出高表达的转基因细胞并进行安全性检查,但能提供种子细胞,对严重缺损的组织有较好的疗效,是目前研究和应用较多的基因治疗方式。

1.2 体内疗法

将腺病毒介导的骨形态发生蛋白(bone mor-

[收稿日期] 2010-12-26; [修回日期] 2011-11-04

[基金项目] 广东省教育部产学研结合基金资助项目(2009B09030-0465)

[作者简介] 罗传霞(1984—),女,广西人,硕士

[通讯作者] 林正梅, Tel: 020-83822804

phogenetic protein, BMP)-2、6 基因直接注射到动物骨折部位,可以有效促进骨折的愈合^[3],说明 bmp 基因及腺病毒载体可以应用于体内基因治疗,促进矿化组织形成。Rutherford^[4]应用重组腺病毒载体将 bmp-7 基因直接注射到实验性可复性牙髓炎断面,组织学观察显示牙髓断面只有微量矿化组织形成,未能形成完整的修复性牙本质层。该研究结果与重组 BMP-7 蛋白用于治疗实验性可复性牙髓炎露髓的研究结果一致^[5]。这可能是由于炎症牙髓组织中缺少能分化为成牙本质样细胞的间充质干细胞,基因不能有效转染细胞。因此,体内疗法不适用于可复性牙髓炎的盖髓治疗。Nakashima 等^[6]应用电穿孔技术将携带生长/分化因子-11(growth/differentiation factor-11, GDF-11)基因的质粒转染体外培养的牙髓细胞,结果显示能促进牙本质涎蛋白(dentinsialoprotein, DSP)、牙本质基质蛋白-1(dentin matrix protein-1, DMP-1)的表达,而 DSP、DMP-1 是成牙本质细胞分化的标志物,说明 GDF-11 可促进牙髓细胞向成牙本质样细胞分化;而采用相同技术将携带 gdf-11 基因的质粒注入狗牙髓断面后形成不完全、非同质的硬化性牙本质。由此推测,可能是由于脉冲电场的热作用使牙髓组织形成血凝块,阻碍了 gdf-11 基因有效转染其下方的牙髓细胞,以致修复性牙本质形成减少,不能完全覆盖整个牙髓断面。利用相同动物模型,改用超声介导微泡穿孔技术将携带 gdf-11 基因的质粒转染至牙髓组织,结果形成的修复性牙本质完全覆盖了牙髓断面^[7]。

这些研究说明,牙髓暴露后直接将基因注射到牙髓断面,基因可与局部细胞整合,使细胞成为微型“生物工厂”,持续分泌生长因子,促进牙髓自身的修复^[8];且该方法只适用于牙髓损伤较轻、牙髓组织中存在大量可分化为成牙本质样细胞的未分化间充质干细胞的情况^[9]。同时也说明,基因转移方法会影响治疗效果:电穿孔法操作方法简单,但由于牙髓组织血供丰富易形成血凝块,基因转移效果较差;超声介导微泡穿孔技术作为一种新的基因转移手段,其超声波空化效应可促进基因进入细胞核,基因转移和表达效率优于其他物理方法,该技术的应用研究尚处于起步阶段,超声辐照剂量及微泡浓度有待优化。

1.3 体外疗法

当牙髓有炎症或深龋、外伤导致较大面积的

露髓时,具有修复潜能的牙髓干细胞减少,在体外将基因转染细胞后,再移植于牙髓断面可获得更好的疗效^[8-9]。

Nakashima 等^[10]用电穿孔技术将携带 gdf-11 基因的质粒转染体外培养的牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC),并离心使之形成三维细胞团,转染细胞的牙本质涎蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)、DMP-1 及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达较对照组均增高;将转染的 DPSC 移植于狗的机械性露髓面 1 个月后,经组织形态测定术观察,露髓处有硬化性牙本质生成,3 个月后,其下方的牙髓细胞分化形成有胞浆突起的成牙本质样细胞,并分泌基质形成管性牙本质,而对照组(转染增强型绿色荧光蛋白的细胞移植于露髓处)只形成硬化性牙本质,缺少管性牙本质。另一项研究^[8]利用相同技术将 bmp-2 基因转染牙髓细胞后移植于动物的机械性露髓面,获得了相同的结果。Rutherford^[4]利用腺病毒载体将 bmp-7 基因转染体外培养的皮肤成纤维细胞,置于实验性可复性牙髓炎的断面 1 个月后,组织形态测量学观察见,牙髓断面有修复性牙本质形成,提示 bmp 基因体外疗法能有效促进修复性牙本质的形成。

体外疗法采用基因修饰的细胞移植于牙髓断面,不仅细胞自身分化为成牙本质样细胞,分泌基质形成修复性牙本质,而且细胞能持续分泌生长因子,趋化和促进牙髓中未分化的间充质干细胞分化为成牙本质样细胞,加强牙髓自身修复潜能。与体内疗法相比,体外疗法更有利于损伤牙髓的修复与重建^[8]。

1.4 基因治疗载体

基因治疗需要安全的载体,用以携带具有治疗作用的外源基因进入靶细胞内。载体主要有 2 种:病毒载体和非病毒载体。病毒载体种类很多,包括腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、慢病毒等。非病毒载体包括脂质体、基因枪、裸 DNA 等。目前研究最多的是腺病毒,与质粒载体相比,腺病毒载体具有滴度高、装载基因容量大、有较广的宿主范围以及可转染分裂期和非分裂期的细胞等优点。但作为病毒类载体的一种,病毒壳体蛋白在靶细胞表面表达后具有较强的免疫性,可致机体产生急性免疫反应,这成为腺病毒载体在非致死性疾病基因治疗方面的主要障碍。短暂的免疫抑制可减轻腺病毒载体的免疫反

应。腺相关病毒近年来备受瞩目，具有免疫原性弱、不引起宿主病理反应、外源基因表达时效长等优点，在基因治疗中具有良好的应用前景^[11]。选择合适的载体及基因转移方法对损伤牙髓的修复与重建具有重要意义。

2 干细胞治疗

2.1 成人牙髓干细胞

2000 年 Gronthos 等^[12]提出，成人牙髓中存在具有自我更新和多向分化潜能的前体细胞 DPSC，采用 CD3、CD146 以及基质细胞抗原-1 (stromal cell antigen-1, STRO-1) 作为其特异性表面标志物。DPSC 经诱导可向成牙本质细胞分化并形成牙本质样结构，预示了其在牙髓损伤修复中的应用前景。

有学者^[13]将猪牙髓组织经酶消化后，离心使之形成三维球形细胞团，加入一定浓度的 BMP-2 在体外继续培养，进一步将 BMP-2 处理后的自体牙髓细胞球形团移植到活髓切断的狗牙牙髓，髓腔中形成的修复性牙本质的厚度超过未经 BMP-2 处理的对照组。Inuyama 等^[14]将大鼠牙髓细胞与羟磷灰石或胶原支架复合后移植到大鼠牙髓断面，结果发现，形成的修复性牙本质的厚度均有显著的增加。

Ji 等^[15]体外分离狗牙髓干细胞，加入氢氧化钙继续培养发现，DPSC 的迁移、增殖、分化能力明显增强；将氢氧化钙处理后的 DPSC 移植到狗年轻恒牙牙髓断面，组织学观察发现，修复性牙本质形成的量较对照组显著增加；免疫荧光显示钙化组织下方 DSP 及 STRO-1 表现为强阳性，提示 DPSC 趋化至损伤处并增殖分化为成牙本质样细胞。这些研究结果说明，DPSC 能有效促进损伤牙髓的修复，其复合生长因子、基因或合适的支架材料对修复性牙本质的形成更有效。

2.2 乳牙牙髓干细胞

2003 年，Miura 等^[16]从脱落乳牙的牙髓中分离出具有多向分化能力的干细胞，将其命名为乳牙牙髓干细胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)，并认为脱落乳牙的牙髓是 DPSC 的又一理想来源。

SHED 体外培养时表现的性质与 DPSC 有一定的相似性，将其体外诱导培养后可分化为神经样细胞、脂肪细胞、成牙本质细胞。体外扩增的 SHED 接种于左旋聚乳酸材料后，复合到牙齿切

片的髓腔侧，将其植入免疫抑制小鼠的背侧皮下 30 d，四环素染色后在共聚焦显微镜下观察见，左旋聚乳酸材料表面有硬组织沉积；免疫组织化学染色发现，新形成的组织具有牙本质小管样结构，左旋聚乳酸材料与髓腔侧牙本质间有前期牙本质生成，硬组织下方形成毛细血管样结构；且组织中 DSPP，DMP-1 表达较对照组增加。该研究表明，DPSC 移植到动物体内不仅可分化为成牙本质细胞，形成牙本质，还能诱导宿主细胞参与组织的再生，形成牙髓样结构^[17]。

2.3 牙髓侧群干细胞

Iohara 等^[18]从牙髓中分离出牙髓侧群干细胞 (CD31⁻/CD146⁻ side population cell, SP)，并证明 SP 具有自我更新及向成脂、成软骨、成神经细胞及成牙本质细胞分化的潜能。将经 BMP-2 处理的牙髓 SP 三维细胞团移植到大鼠牙髓断面，1 个月后观察发现，SP 分化为成牙本质样细胞并分泌基质，同时细胞 DSPP mRNA 的表达增加。进一步研究发现，牙髓 SP 具有血管形成潜能：将牙髓 SP 移植于老鼠下肢缺血部位后，局部毛细血管的密度及血流量均有所增加，细胞表达粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和基质金属蛋白酶 3 等血管形成因子^[19]。Wang 等^[20]体外模拟缺血缺氧环境培养牙髓细胞，流式细胞技术检测发现，牙髓 SP 增殖率显著增加，提示牙髓 SP 可能参与了牙髓损伤后局部组织缺血的修复与重建。最近，Iohara 等^[21]将牙髓 SP 与胶原支架复合后移植于狗的牙髓断面，观察到髓腔内有修复性牙本质及血管化牙髓组织形成。牙髓 SP 的发现为牙髓损伤修复与重建提供新的治疗途径。

3 展望

基因治疗和干细胞治疗是近几年的研究热点，在牙髓损伤修复中显示出了良好的应用前景，但仍处于起步阶段，目前存在许多问题：如构建安全有效的基因载体、选择适用于临床的基因转移方法及控制外源基因持续有效表达等；干细胞缺乏特异性的表面标志，如何有效分离、纯化和扩增牙髓干细胞尚在探索中；此外，如何提高牙髓干细胞移植后的存活率亟待解决。

随着分子生物学及牙髓生物学研究的深入，基因治疗及干细胞治疗有望成为活髓保存治疗的新方法。

4 参考文献

[1] Trope M. Regenerative potential of dental pulp[J]. *Pediatr Dent*, 2008, 30(3) 206-210.

[2] Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action[J]. *J Endod*, 2007, 33(4) 377-390.

[3] Egermann M, Baltzer AW, Adamaszek S, et al. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 c-DNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep[J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(5) 507-517.

[4] Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps[J]. *Eur J Oral Sci*, 2001, 109(6) 422-424.

[5] Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7[J]. *Eur J Oral Sci*, 2000, 108(3) 202-206.

[6] Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, et al. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11(Gdf11)[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(12) 814-818.

[7] Nakashima M, Tachibana K, Iohara K, et al. Induction of reparative dentin formation by ultrasound-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11[J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(6) 591-597.

[8] Nakashima M, Iohara K, Zheng L. Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins[J]. *Curr Gene Ther*, 2006, 6(5) 551-560.

[9] Edwards PC, Mason JM. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration:(1)Overview and practical considerations[J]. *Head Face Med*, 2006, 2:12.

[10] Nakashima M, Iohara K, Ishikawa M, et al. Stimulation of reparative dentin formation by *ex vivo* gene therapy using dental pulp stem cells electrotransfected with growth/differentiation factor 11(Gdf11)[J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(11) 1045-1053.

[11] Flotte TR. Gene therapy progress and prospects:Recombinant adeno-associated virus(rAAV) vectors[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(10) 805-810.

[12] 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.

[13] Iohara K, Nakashima M, Ito M, et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2[J]. *J Dent Res*, 2004, 83(8) 590-595.

[14] Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 92(1) 120-128.

[15] Ji YM, Jeon SH, Park JY, et al. Dental stem cell therapy with calcium hydroxide in dental pulp capping[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(6) 1823-1833.

[16] 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.

[17] Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium[J]. *J Dent Res*, 2010, 89(8) 791-796.

[18] Iohara K, Zheng L, Ito M, et al. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(11) 2493-2503.

[19] Iohara K, Zheng L, Wake H, et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia:Subfraction of side population cells from dental pulp[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(9) 2408-2418.

[20] Wang J, Wei X, Ling J, et al. Side population increase after simulated transient ischemia in human dental pulp cell[J]. *J Endod*, 2010, 36(3) 453-458.

[21] Iohara K, Zheng L, Ito M, et al. Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth[J]. *Regen Med*, 2009, 4(3) 377-385.

(本文编辑 李彩)

(上接第47页)

5 参考文献

[1] 杨晓惠, 李健宁. 实用整容外科手术学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 1996 82, 267.

[2] 邱蔚六, 张震康. 口腔颌面外科学[M]. 5版. 北京:人民

卫生出版社, 2006 374.

[3] 周树夏. 口腔颌面外科手术学[M]. 2版. 北京:人民军医出版社, 2004 585.

(本文编辑 李彩)