

论著·基础研究

SDF-1 联合 CGF 应用于犬年轻恒牙牙髓样组织再生的研究

乔璐¹, 王慧慧¹, 齐颖², 付梦辰¹, 颜燕宏¹, 赵玉梅¹

1. 上海牙组织修复与再生工程技术中心, 同济大学口腔医学院儿童口腔医学教研室, 上海 200072; 2. 上海市嘉定区牙病防治所, 上海 201800

[摘要] **目的**·探讨以浓缩生长因子 (concentrated growth factor, CGF) 为支架, 联合基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 应用于年轻恒牙牙髓再生的可行性。**方法**·体外分离培养犬牙髓细胞 (dental pulp cells, DPC), 观察 SDF-1 和 CGF 对其增殖、分化的影响; 建立比格犬年轻恒切牙无髓模型, 分为天然牙髓组 (A 组)、空管组 (B 组)、填充 CGF 组 (C 组) 和复合 SDF-1/CGF 组 (D 组), 10 周后行影像学检查、RT-PCR 及组织学观察。**结果**·CGF 浸提液 (concentrated growth factor extraction, CGFe) 促进 DPC 体外增殖, 联合 SDF-1 可加强其促增殖作用, 且可促进细胞成牙、成血管分化; 影像学检查示 4 组根尖均有不同程度生长; RT-PCR 示 D 组新生组织中成牙、成血管相关基因表达均高于 C 组; 组织学观察示 C 组和 D 组产生新生牙本质及类牙髓样组织, 而 B 组仅在根尖部产生类牙骨质。**结论**·CGF 可作为年轻恒牙牙髓样组织再生的有效支架, 与 SDF-1 联合应用可促进这一过程。

[关键词] 年轻恒牙; 牙髓再生; 基质细胞衍生生长因子; 浓缩生长因子

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.10.008 **[中图分类号]** R781.3 **[文献标志码]** A

Evaluation of SDF-1 complex with CGF applied to canine dental-pulp-like tissue regeneration

QIAO Lu¹, WANG Hui-hui¹, QI Ying², FU Meng-chen¹, YAN Yan-hong¹, ZHAO Yu-mei¹

1. Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Department of Pediatric Dentistry, School of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Jiading District Odontopathy Dispensary, Shanghai 201800, China

[Abstract] **Objective**·To evaluate the feasibility of immature permanent teeth pulp regeneration with a new method that utilizes the integration of concentrated growth factor (CGF) as a scaffold and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). **Methods**·Canine dental pulp cells (DPC) were isolated and cultured *in vitro*. Then the effects of SDF-1 and CGF were observed on DPC proliferation and differentiation. The pulpless model was established on the beagle's immature incisors which were divided into four groups: natural pulp (A), empty canal (B), CGF-filling (C) and SDF-1/CGF-filling (D). After 10 weeks, specimens were checked by imaging examination, RT-PCR and histological observation. **Results**·CGF extraction (CGFe) induced DPC proliferation while the combination of SDF-1 and CGFe enhanced this effect and also facilitated odontogenic and angiogenic differentiation of DPC. According to imaging examination, the apex growth of all four groups was in varying degrees. RT-PCR indicated the expressions of odontogenesis and angiogenesis related genes in group D were higher than those in group C. Besides, neonatal dentin and dental-pulp-like tissue were observed inside the canal of both group C and D, while only cementum-like tissue existed around root apex of group B. **Conclusion**·SDF-1 plays an important role in driving the process of pulp-like-tissue regeneration of immature permanent teeth by using CGF as an effective scaffold.

[Key words] immature permanent teeth; pulp regeneration; stromal cell-derived factor-1 (SDF-1); concentrated growth factor (CGF)

对根尖尚未完成发育的年轻恒牙, 牙髓丧失将影响其牙根发育, 造成牙根短、根管粗大、根管壁薄、根尖孔停止关闭等现象, 易引发根折造成恒牙早失, 进而影响生活质量。现阶段对年轻恒牙不可逆牙髓病和根尖周病的治疗包括根尖诱导成形术和根尖屏障术, 但往往疗效不佳, 且有一定失败率, 故再生具有良好功能的牙髓组织是治疗这类疾病的趋势^[1]。牙髓血运重建是牙髓再生的早期探索, 后证明虽产生牙根再发育, 但易发生根管钙化阻塞, 远期

预后不佳。组织工程牙髓再生成为新思路。

组织工程牙髓再生是基于干细胞、生长因子、生物活性支架三者进行组织再生, 许多研究通过细胞移植及各种支架来获得组织再生^[2-3]。但从临床应用角度, 细胞移植无法避免细胞来源及体外培养等问题。因此, 细胞归巢, 即通过趋化性细胞因子募集干细胞至活动部位参与组织再生成为热点, 目前已有研究证实通过细胞归巢实现牙髓再生的可能性^[4-5]。

基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor-1,

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目 (14411963600) (Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 14411963600)。

[作者简介] 乔璐 (1992—), 女, 住院医师, 硕士; 电子信箱: qiaolujoyce@163.com。

[通信作者] 赵玉梅, 电子信箱: yumeizhao@tongji.edu.cn。

SDF-1) 属于 CXC 趋化因子亚组, 在干细胞募集、迁移和分化中起到重要作用^[6-7], 可介导成体干细胞定向归巢, 参与组织修复与再生, 并促进成骨、成血管和成神经^[8-10], 还可促进人类牙髓干细胞的成牙本质分化^[11]。浓缩生长因子 (concentrated growth factor, CGF) 是第三代血液制品, 无需添加外源性物质, 由变速离心产生, 富含大量三维网状结构的纤维蛋白基质及多种内源性生长因子, 安全可靠, 有促进组织再生的能力^[12], 在组织工程领域应用广泛, 包括作为细胞因子缓释膜、可降解支架材料等。目前, 国内外学者应用多种材料作为牙髓再生的支架, 包括水溶性凝胶、合成材料、丝素蛋白、细胞聚合体等, 但均有临床应用难度, 体外步骤繁琐。有研究表明, CGF 可促进人牙乳头干细胞增殖和成骨、成牙、成血管分化^[13], 但尚未应用于年轻恒牙牙髓样组织原位再生。

本实验基于组织工程原理, 探讨利用 SDF-1 募集干细胞, 结合 CGF 作为生物支架材料进行犬年轻恒牙牙髓组织原位重建的可行性, 旨在为临床上治疗年轻恒牙牙髓丧失提供策略选择和理论依据。一方面, 趋化因子的使用避免体外干细胞培养和移植, 简化治疗步骤, 降低风险; 另一方面, CGF 作为支架材料的同时, 可缓释大量细胞因子构筑有利于再生的微环境, 同时其来自自体, 安全方便, 临床应用前景值得期待。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

1.1.1 仪器 Medifuge 离心机 (Silfradent, 意大利), 细胞培养箱 (Thermo, 美国), 低温离心机 (Thermo, 美国), 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本)。

1.1.2 试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清、双抗 (青霉素和链霉素)、0.25% 胰蛋白酶 (Gibco, 美国), 成骨诱导液、成脂诱导液、油红 O 染液、茜素红染液 (Cyagen, 美国), 4% 中性甲醛 (国药集团, 中国)。

1.2 实验动物

5 月龄雌性比格犬, 切牙完全或部分萌出, 乳尖牙在位。实验动物由上海甲干生物科技有限公司提供, 普通级, 动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2015-0005, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2019-0002。

1.3 体外实验

1.3.1 犬牙髓细胞 (dental pulp cells, DPC) 的培养与诱导分化 采用新鲜拔除的犬牙, 超净台上取出牙髓组织,

将组织充分剪碎至 $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$, 放入 6 孔板, 铺放均匀, 于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱静置 60 min; 再向 6 孔板中缓慢加入 2 mL 完全培养基 (含 10% FBS 的 DMEM/F12), 标记为原代细胞 (P0), 于恒温细胞培养箱培养, 每 3 d 换液; 倒置相差显微镜观察细胞的形态和生长情况, 待细胞汇合至 80% 时进行传代。

将 P3 代细胞以 4×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 于细胞培养箱中培养, 每 3 d 换液; 待细胞汇合至 80% 更换成骨诱导液, 汇合至 100% 时更换成脂诱导液, 0.5 mL/孔, 每 3 d 换液; 培养 21 d 后分别进行茜素红染色观察钙结节形成情况, 油红 O 染色观察细胞内脂滴形成。

1.3.2 CGF 的结构及 CGF 浸提液 (concentrated growth factor extraction, CGFe) 的制作 取犬前肢静脉血约 10 mL 置于真空负压离心管内, 入 Medifuge 离心机中配平, 在 CGF 程序下离心, 结束后可得 3 层, 冰上静置 10 min, 超净台内取中层纤维层, PBS 冲洗 1 次, 置于培养皿内, -80°C 冰箱放置 1 h, 冷冻干燥 3 h; 冻干后样本喷金, 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察微观结构, 拍照记录。

冻干后样本研碎, 以全血量: 基础培养基 = 1:1 的比例加入基础培养基, 37°C 恒温箱放置 24 h, 离心 ($157 \times g$) 后取上清液过滤 ($0.22 \mu\text{m}$ 滤器), 4°C 保存, 作为原液 (CGFe) 待用。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将 P3 代 DPC 以 2×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板, 贴壁 12 h, 分别加入含 0、25、50、100 ng/mL SDF-1 的完全培养基, 设 4 个复孔; 另分别加入含 0%、50%、25%、10% CGFe 原液的完全培养基, 设 4 个复孔。分别在加入条件培养基 1、4、7 d 后每孔加入 10 μL CCK-8 液, 37°C 孵育 1.5 h, 酶标仪测定各孔吸光度值。

1.3.4 细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 及相关基因表达检测 通过增殖检测筛选 50% CGFe 进行细胞培养作分化检测。P3 代 DPC 分别以 5×10^3 个/孔接种于 24 孔板中, 设 4 个复孔; 以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 设 2 个复孔; 贴壁 24 h, 分别加入完全培养基 (空白组)、含 50% CGFe 的完全培养基 (CGFe 组)、含 50% CGFe 和 100 ng/mL SDF-1 的完全培养基 (复合组)。加入条件培养基 4、7 d 后分别采用微孔法检测细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 表达水平和提取细胞总 RNA, 利用罗氏反转录试剂盒进行反转录, 使用 RT-PCR 分析牙本质涎磷蛋白 (dentin sialophosphoprotein, DSPP)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达。基因引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences used for RT-PCR

目的基因	引物序列 (5' → 3')
<i>GAPDH</i>	
正向	TGCCACCCAGAAGACCGT
反向	GGATGACCTTGCCACAGC
<i>DMP-1</i>	
正向	GTGCCCAAGATACCACCAGT
反向	CACCTCCTACCCAGTGTCC
<i>DSPP</i>	
正向	AAGTGGTGTCTGCGTGAA
反向	TTTCTGGCTTTCCTGTGACC
<i>ALP</i>	
正向	GGCTGGAGATGGACAAGTTC
反向	CTCGTTTCCCTGAGTCGTGT
<i>VEGF</i>	
正向	GCATTGGAGCCTTGCTTGC
反向	AGATGTGACAAGCCAGGCG

1.4 动物实验

1.4.1 犬牙髓再生模型的建立 犬术前禁食 12 h, 1 mL 陆眠宁 (一种混合制剂, 主要成分为盐酸赛拉嗪) 肌注诱导后腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (0.3 mL/kg) 麻醉, 拍摄术前切牙根尖片 (12 颗切牙); 取静脉血, 离心得 CGF, 取纤维层, 生理盐水冲洗 3 次, 压膜器压扁, 置于 2 mL EP 管中; 剪成约 2 mm³ 颗粒, 压实, 弃上清, 加入 30 μL 的 SDF-1 贮存液 (10 μg/mL), 混匀, 冰上静置 30 min, 完成复合, 为复合支架; 部分用于动物实验, 部分用于检测 SDF-1 缓释效果。复合支架用 PBS 洗 2 遍, 加入 2 mL PBS 入 EP 管中, 37 °C 保存; 每隔 24 h 离心, 收集上清液, ELISA 检测 SDF-1 含量。

犬前牙上橡皮障, 消毒, 生理盐水冷却下开髓, 完整拔除牙髓, 根尖片指导 K 锉沿根管壁四周提拉处理; 超声荡洗后用 5 mL 1.25% 次氯酸钠、5 mL 17% EDTA 交替冲洗, 5 mL 生理盐水最后冲洗, 无菌纸捻吸干, 保证根管内无血液渗出。根据分组进行根管充填, 其中左上中切牙、左下中切牙为天然牙髓组, 不开髓; 右上中切牙、右下中切牙为空管组, 空管直接玻璃离子 (glass ionomer cement, GC) 封闭; 右上第二侧切牙、第三侧切牙及右下第二侧切牙、第三侧切牙为 CGF 组, 放置 CGF, 加压器压实, 爱汝特生物陶瓷 (iRoot BP Plus) 覆盖根管口, GC 封闭; 左上第二侧切牙、第三侧切牙及左下第二侧切牙、第三侧切牙为 SDF-1/CGF 组, 放置复合支架, 加压器压实, iRoot

BP Plus 覆盖根管口, GC 封闭; 每 2 周进行影像学检查。

1.4.2 术后取材 所有实验牙均暂封完好, 牙冠完整, 无明显异常。术后 10 周处死实验动物并收样: 麻醉后拔取上颌第三切牙及下颌第二切牙, 保存于低温生理盐水中; 过量麻醉处死, 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 行头颈部灌流后拔除剩余切牙, 固定于 PFA 中。

新鲜样本取出根管内容物, 抽提各组总 RNA, 进行反转录, 使用 RT-PCR 分析组织中牙本质基质蛋白 1 (dentin matrix protein-1, DMP-1)、ALP、DSPP、VEGF 的表达量。引物序列见表 1。

固定样本 24 h 后, 使用 10% EDTA, 37 °C 恒温脱钙, 每天换液, 2 个月脱水, 石蜡包埋, 切片, 进行苏木精-伊红 (H-E) 染色、Masson 三色染色及免疫组织化学染色, 镜下观察。

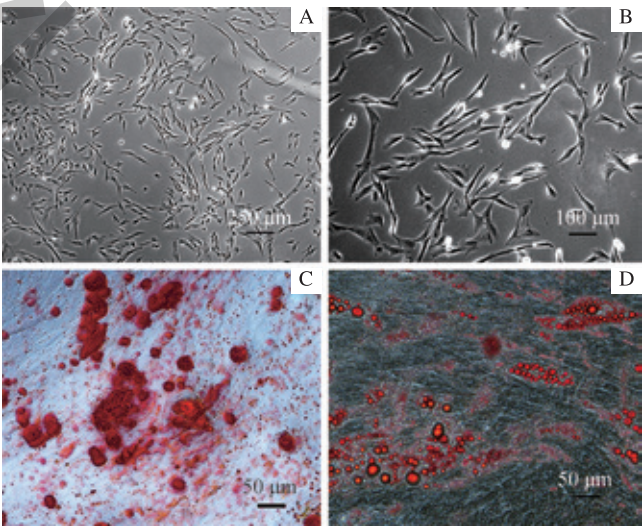
1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析或 *t* 检验。 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DPC 的培养与诱导分化

P4 代 DPC 呈长梭形成纤维样细胞 (图 1A、1B); 21 d 成骨诱导后茜素红染色可见大小不等的红褐色钙化结节 (图 1C); 21 d 成脂诱导后, 油红 O 染色可见细胞内散在细小的脂滴, 部分小脂滴融合成较大的脂泡 (图 1D)。

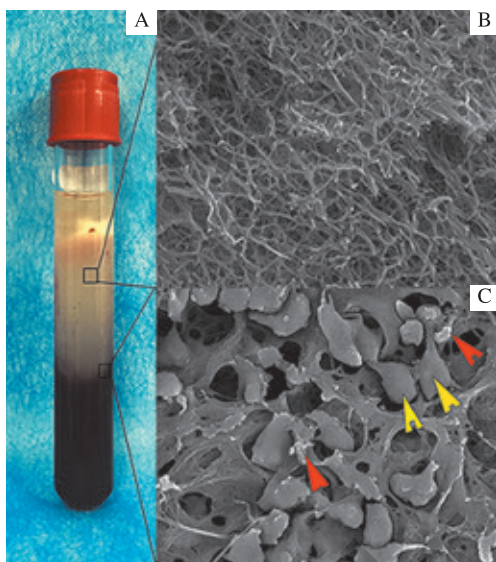


注: A、B 为 DPC 倒置显微镜下观察; C. 成骨诱导后茜素红染色; D. 成脂诱导后油红 O 染色

图 1 DPC 的镜下形态及多向分化染色
Fig 1 Morphology and multi-lineage differentiation staining of DPC

2.2 CGF 的大体及微观结构

CGF 离心完成后可见分为 3 层,包括上清液层、纤维蛋白凝胶层、血凝块层(图 2A)。对纤维蛋白凝胶层进行 SEM 观察,可见其中部主要为网状交织结构的纤维蛋白(图 2B),其靠近血凝块的部分有白细胞聚集的区域,间或散在成簇状分布的血小板(图 2C)。



注: A. CGF 离心完成大体观; B. 纤维蛋白层中部 (SEM $\times 10\,000$); C. 纤维蛋白层下部 (SEM $\times 5\,000$, 红色箭头指示血小板簇,黄色箭头指示白细胞)

图 2 CGF 的微观结构

Fig 2 Microstructure of CGF

2.3 SDF-1 及 CGF 对细胞增殖的影响

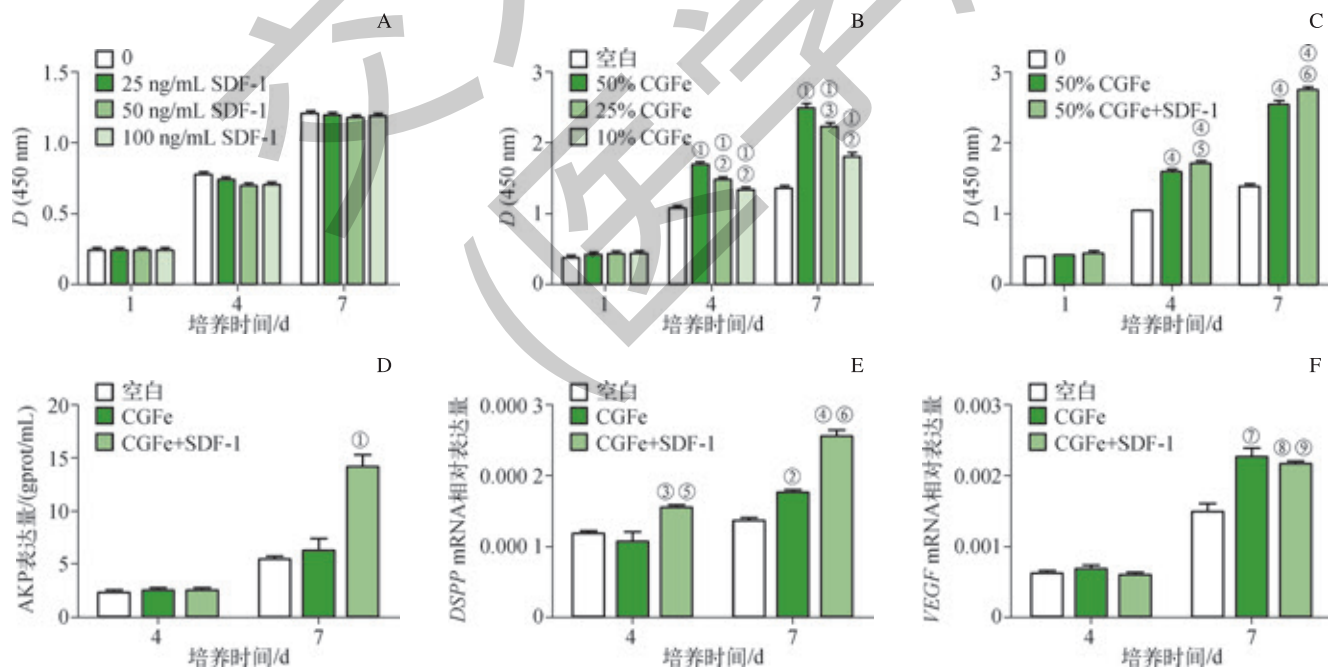
不同浓度 SDF-1 对于 DPC 的增殖无明显影响(图 3A); CGFe 对 DPC 有促增殖作用,且有浓度依赖性,在第 4、7 日,含 50%CGFe 的培养基对 DPC 增殖的促进作用最明显(图 3B);在此浓度上加入 SDF-1 (100 ng/mL)可强化这种促进作用,显示适当浓度的 CGFe 与 SDF-1 有协同促进 DPC 增殖的作用(图 3C)。

2.4 SDF-1 及 CGF 对细胞分化的影响

CGFe 对细胞 AKP 的表达量无明显影响,而复合 SDF-1 后,第 7 日可明显促进 AKP 表达 ($P=0.001$)(图 3D); CGFe 单独应用以及复合使用 SDF-1 和 CGF 均可在第 7 日使 DSPP、VEGF 表达上调,其中复合组在第 4 日即可促进 DSPP 表达上调,且在第 7 日时促进作用更强,复合组第 4 日与第 7 日 DSPP 表达量的差异有统计学意义 ($P=0.000$); CGFe 组与复合组第 7 日 VEGF 表达量的差异无统计学意义 ($P=0.540$)(图 3E、3F)。

2.5 SDF-1 复合 CGF 的缓释效果

SDF-1 于复合支架中缓慢释放,前 4 d 释放水平基本稳定,第 5 日开始释放量缓慢降低(图 4);提示 SDF-1 与 CGF 发生有效复合,且 CGF 的柔软纤维蛋白可有效储留 SDF-1 使其缓慢释放。



注: A. 不同浓度 SDF-1 对 DPC 增殖的影响; B. 不同浓度 CGFe 对 DPC 增殖的影响 ($^{\circ}P=0.000$, 与空白组比较; $^{\circ}P=0.000$, $^{\circ}P=0.008$, 与 50% CGFe 组比较); C. SDF-1 与 CGFe 联合作用对 DPC 增殖的影响 ($^{\circ}P=0.000$, 与空白组比较; $^{\circ}P=0.000$, $^{\circ}P=0.007$, 与 50% CGFe 组比较); D. SDF-1/CGFe 培养 DPC 的 AKP 表达量 ($^{\circ}P=0.001$, 与空白组和 CGF 组比较); E、F: SDF-1/CGFe 培养 DPC 相关基因 *DSPP*、*VEGF* 的表达量 ($^{\circ}P=0.003$, $^{\circ}P=0.026$, $^{\circ}P=0.000$, $^{\circ}P=0.002$, $^{\circ}P=0.003$, 与空白组比较; $^{\circ}P=0.008$, $^{\circ}P=0.000$, $^{\circ}P=0.540$ 与 CGF 组比较)

图 3 SDF-1/CGF 对细胞增殖及分化的影响

Fig 3 Effects of SDF-1/CGF on cell proliferation and differentiation

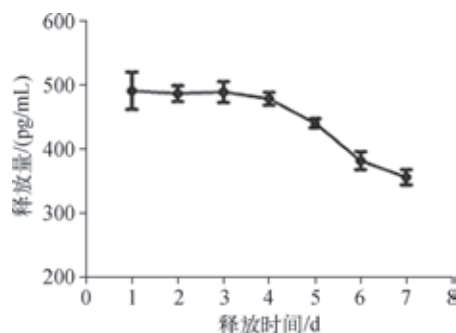


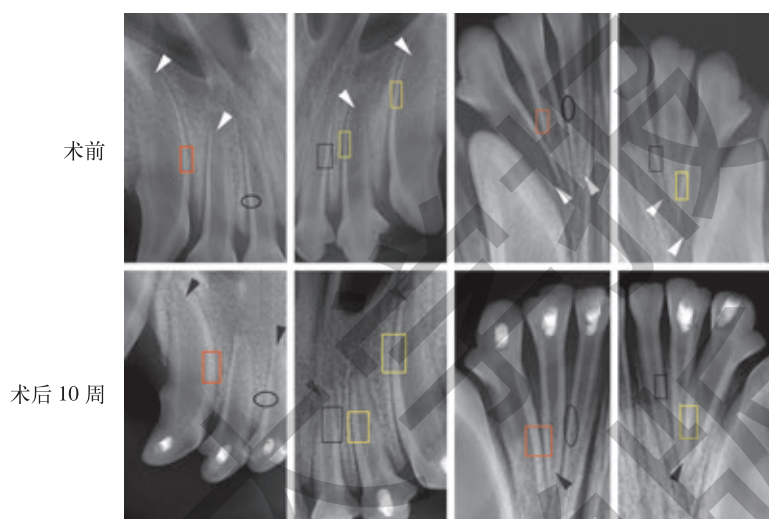
图4 SDF-1/CGF复合支架中SDF-1的缓释效果

Fig 4 Controlled release of SDF-1 in SDF-1/CGF scaffold

2.6 比格犬实验牙根尖发育情况及新生牙髓样组织的观察

2.6.1 影像学检查 术前切牙均为牙根发育未完成的年轻恒牙；术后10周可见各组根尖孔均闭合，CGF组（红色框）、SDF-1/CGF组（黄色框）和天然牙髓组（黑色框）可见不同程度的根管壁增厚，空管组（黑色圆）根管壁无明显变化（图5）。

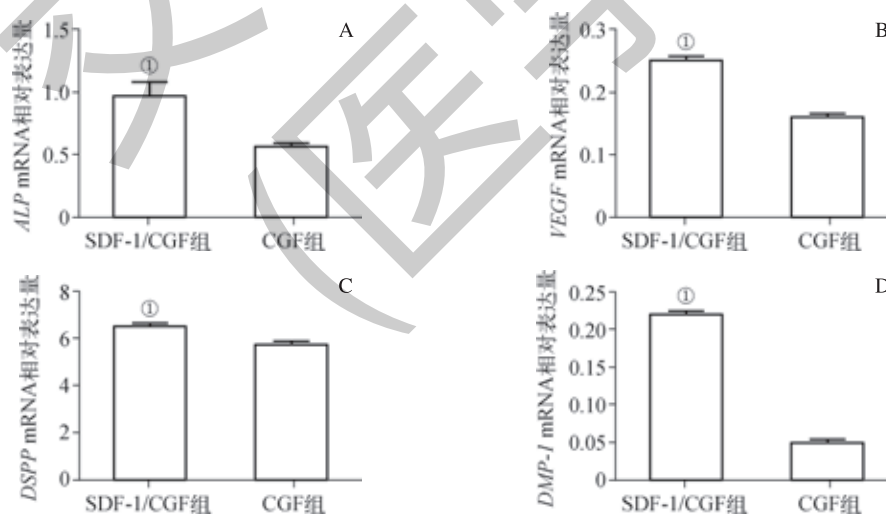
2.6.2 新生组织中相关基因的表达 RT-PCR检测结果表明，SDF-1/CGF组中 *DMP-1*、*ALP*、*DSPP*、*VEGF* 表达量均较CGF组高，组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)（图6）。



注：红框为CGF组，黄框为SDF-1/CGF组，黑框为天然牙髓组，黑圆为空管组；白色箭头示开放根尖孔，黑色箭头示根尖孔缩小

图5 术前及术后10周各组切牙根尖片X线检查

Fig 5 X-ray examination of beagle incisors before and 10 weeks after operation



注：① $P = 0.000$ ，与CGF组比较

图6 新生组织成牙及成血管相关基因表达

Fig 6 Expression level of related genes in odontogenesis and angiogenesis

2.6.3 组织学染色 H-E染色结果示CGF组和SDF-1/CGF组牙根继续发育，根尖孔闭合，根管内充满新生软组织，形成紧贴新生牙本质的类成牙本质细胞层，呈栅栏状，可清晰

分辨新生牙本质层、类成牙本质细胞层、乏细胞层、多细胞层；在新生软组织内可见散在分布的血管样组织，越接近软组织中央，纤维红染成分越多（图7C、7D），其结构特

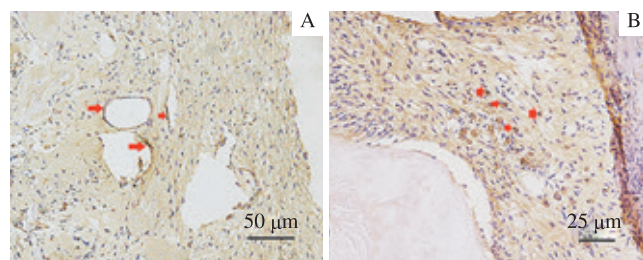
征与天然牙髓组织相似(图7A)。空管组也发生根尖孔闭合现象,但其根尖硬组织边缘粗糙,根管壁未见新生牙本质,根管内无软组织生成,仅在根尖部存在少量纤维组织(图7B1、7B2),且高倍镜下观察见根尖新生硬组织存在骨陷窝样结构(图7B3)。Masson 染色示 CGF 组和 SDF-1/CGF 组存在与原牙本质分界明显的新生类牙本质,且类牙本质小管样结构与原牙本质小管平行、迁延,呈放射状排列(图7C4、7D4),类成牙本质细胞有细小突起深入类牙本质小管中(图7C5、7D5),新生软组织中部可见蓝染的纤维。免疫组织化学染色示 SDF-1/CGF 组新生组织有 VEGF 和神经巢蛋白(nestin)染色阳性细胞呈聚集性分布(图8A、8B)。



注: A. 天然牙髓组(A2及A4中黄色箭头示牙本质,黑色箭头示成牙本质细胞层,白色箭头示乏细胞层,红色箭头示多细胞层,棕色箭头示血管); B. 空管组(B2中黄色箭头示新生硬组织及粗糙边缘,红色箭头示纤维结缔组织, B3中棕色箭头示骨陷窝样组织); C. CGF 组(C2及C5中黑色箭头示类成牙本质细胞层,棕色箭头示血管, C2中红色箭头示多细胞层); D. SDF-1/CGF 组(D2及D4中黄色箭头示新生牙本质,黑色箭头示类成牙本质细胞层,白色箭头示乏细胞层,红色箭头示多细胞层,棕色箭头示血管); 所有绿色箭头均示根尖孔闭合,双头黑色箭头均示新生牙本质; A1、A2、B1、B2、B3、C1、C2、D1、D2为H-E染色; A3、A4、B4、B5、C3、C4、C5、D3、D4、D5为Masson染色

图7 各组牙体组织的组织学染色

Fig 7 Histological staining of groups of specimens



注: A. VEGF 表达($\times 200$); B. nestin 表达($\times 400$)

图8 D组新生软组织中 VEGF、NESTIN 表达阳性的细胞

Fig 8 Cells with positive expression of VEGF and nestin in group D

3 讨论

从功能角度,有效的牙髓再生所需要的形态包括血管重建、神经形成、成牙本质细胞层形成、持续的新生牙本质沉积,共同行使维持牙齿稳态的功能。目前,年轻恒牙牙髓缺失的治疗方法主要是根尖诱导成形术及根尖屏障术。根尖诱导成形术是在控制感染的基础上,利用氢氧化钙制剂促使根尖继续发育及根管壁增厚的方法;然而,此种方法不能获得持续的牙根发育,且不能为牙体提供营养,根管壁薄、缺乏营养往往造成根折,而且诱导有一定的失败率^[1]。根尖屏障术是将生物相容性的材料充填至根尖部,在根尖形成钙化屏障封闭根尖;由于其仅为单纯封闭,牙根未能延长,易发生萌出不足或牙列不齐等。牙髓再血管化概念由 Banchs 等^[14]首次提出,是通过根尖引流,诱导根尖部干细胞进入根管,以血凝块为支架,在患牙根管内产生血管、神经等代替原牙髓组织,使牙根继续发育。然而,有研究表明这种方法形成的软组织是富含血管的纤维结缔组织,没有牙髓的基本组织形态,且在软组织内部分布散在的钙化团块有阻塞根管的可能,远期预后不佳^[15]。

SDF-1 由基质细胞产生,属于 CXC 类趋化因子,通过细胞表面特异性趋化因子受体 CXCR4,参与调节许多重要的生物过程^[16],包括干细胞募集、神经发育、成血管、成骨、成牙等多种生物学功能。SDF-1 可使多种干细胞沿着浓度梯度迁移实现归巢,并能够刺激造血干细胞增殖,与其他造血细胞生长因子如干细胞因子及 IL-3 有协同作用^[17]。100 ng/mL 的 SDF-1 即可使体外细胞发生有效迁移^[16],故本研究使用该浓度进行细胞实验。CGF 是自体来源的第三代血液制品,是一种具有完全独特属性的愈合性生物材料,无需添加人工试剂,不会引发免疫反应或感染。此外,变速离心可更好地富集生长因子和纤维蛋白,从而获取更致密的纤维蛋白凝胶及更高浓度的生长因子^[18-19]。纤维蛋白网柔软,富有弹性,具有足够的机械

性能,可储留生长因子使其缓慢释放,以延长因子作用时间;生长因子包括转移生长因子(transforming growth factor, TGF)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、类胰岛素生长因子(insulin like growth factor, IGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、VEGF和成纤维生长因子等。这些生长因子均可单独或联合参与细胞分化过程^[20-21]。CGF在组织工程领域常用于引导组织再生,与自体骨或人工骨材料结合应用于骨组织工程已取得良好疗效。

牙髓再生与可分化成为成牙本质细胞及成纤维细胞的干细胞密切相关,因此,在牙髓再生过程中,干细胞在多种信息分子调控下的生物学活动至关重要。本实验拟从犬健康牙髓中提取的牙髓细胞代表种子细胞进行体外研究,为后期实验提供基础。所得DPC传代后形状趋于一致,多呈长梭形,经过诱导可见钙化结节和脂滴形成,证实其有成骨、成脂向分化潜能,具有一定干性。

血管和成牙本质细胞层的形成是牙髓再生的评价标准之一。VEGF有促进内皮细胞增殖、提高血管通透性、改变细胞外基质等生物学作用,在血管发生中起重要作用^[22];DSPP和DMP-1在牙本质早期发生中起作用^[23];ALP则促进牙本质矿化^[24]。本实验结果显示,复合应用100 ng/mL SDF-1和50%CGFe可促进DPC增殖,并上调细胞ALP、DSPP、VEGF表达,其效果比单独应用CGFe更佳,提示了SDF-1在DPC成牙、成血管分化中的作用。

H-E染色示SDF-1/CGF组与CGF组均观察到新生硬组织及排列呈栅栏状的类成牙本质细胞层,新生软硬组织与天然牙髓组织结构大致相似。在无干细胞移植的情况

下,CGF组也可形成类牙髓组织,一定程度上说明CGF本身能够单独承担牙髓再生的任务;CGF蛋白凝胶内富含的大量生长因子,在其纤维蛋白网架结构中缓慢、持续地释放,有一定的募集干细胞的作用并为组织再生提供良好的再生微环境。但本研究前期体外实验结果证实SDF-1与CGF对牙髓细胞有协同作用,结合复合支架组新生软组织中ALP、DSPP、DMP-1、VEGF的表达上调,因此并不能否认SDF-1在牙髓再生过程中的作用。空管组仅根管口闭合,牙本质未见增厚,高倍镜下发现根管口新生硬组织类似骨组织;说明在无菌状态下,无髓牙根的根尖硬组织仍可继续少量发育,可能与根尖周残留的牙髓组织、根尖牙乳头组织等有关。然而,没有支架的介入,便无法在根管内形成新生软组织,也无法形成健康的牙本质。

通过免疫组织化学染色,在CGF组与SDF-1/CGF组的新生组织中可见VEGF和nestin染色阳性的细胞呈聚集性分布。nestin与神经干细胞的多潜能性有关,在神经元和神经胶质细胞的前体细胞中均有所表达^[25]。本研究结果提示,新生牙髓样组织中有成血管与成神经相关的细胞和组织结构。

综上所述,在无细胞移植的情况下,CGF可作为年轻恒牙牙髓样组织原位再生的有效支架,形成的类牙本质-牙髓复合体,包括新生牙本质、成牙本质细胞层、血管、纤维、神经形成相关细胞等,与天然发育的牙髓有相似的组织结构;SDF-1应用于以CGF为支架材料的年轻恒牙无髓模型,在形成相似的组织结构的基础上,提高了新生组织中各类成血管及成牙相关基因的表达,说明其促进了牙髓样组织再生这一过程。

参·考·文·献

- [1] Albuquerque MTP, Valera MC, Nakashima M, et al. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics[J]. J Dent Res, 2014, 93(12): 1222-1231.
- [2] 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.
- [3] Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(2): 605.
- [4] Widbiller M, Driesen RB, Eidt A, et al. Cell homing for pulp tissue engineering with endogenous dentin matrix proteins[J]. J Endod, 2018, 44(6): 956-962 e952.
- [5] Kim JY, Xin X, Moiola EK, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(10): 3023.
- [6] Liekens S, Schols D, Hatse S. CXCL12-CXCR4 axis in angiogenesis, metastasis and stem cell mobilization[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(35): 3903-3920.
- [7] Li M, Sun X, Ma L, et al. SDF-1/CXCR4 axis induces human dental pulp stem cell migration through FAK/PI3K/Akt and GSK3 β /catenin pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40161.
- [8] Petit I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis[J]. Trends Immunol, 2007, 28(7): 299-307.
- [9] Pino A, Fumagalli G, Bifari F, et al. New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 141: 4-22.
- [10] Guang LG, Boskey AL, Zhu W. Age-related CXCR4 chemokine receptor-4 deficiency impairs osteogenic differentiation potency of mouse bone marrow mesenchymal stromal stem cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(8): 1813-1820.
- [11] Kim DS, Kim YS, Bae WJ, et al. The role of SDF-1 and CXCR4 on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells[J]. Int Endod J, 2013, 47(6): 534-541.
- [12] Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction[J]. Microsc Res Tech, 2011, 74(8): 772-777.
- [13] Hong S, Li L, Cai W, et al. The potential application of concentrated growth factor in regenerative endodontics[J]. Int Endod J, 2015, 52(5): 646-655.

- [14] Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol[J]. J Endod, 2004, 30(4): 196-200.
- [15] Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, et al. An update on clinical regenerative endodontics[J]. Braz Dent J, 2013, 28(1): 2-23.
- [16] Liu JY, Chen X, Yue L, et al. CXC chemokine receptor 4 is expressed paravascularly in apical papilla and coordinates with stromal cell-derived factor-1 α during transmigration of stem cells from apical papilla[J]. J Endod, 2015, 41(9): 1430-1436.
- [17] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival[J]. Blood, 2000, 95(3): 756.
- [18] Kim TH, Kim SH, Sándor GK, et al. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing[J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(5): 550-558.
- [19] Kim JM, Sohn DS, Bae MS, et al. Flapless transcrestal sinus augmentation using hydrodynamic piezoelectric internal sinus elevation with autologous concentrated growth factors alone[J]. Implant Dent, 2014, 23(2): 168.
- [20] Qin J, Wang L, Sun Y, et al. Concentrated growth factor increases Schwann cell proliferation and neurotrophic factor secretion and promotes functional nerve recovery *in vivo*[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(2): 493-500.
- [21] Pirpir C, Yilmaz O, Candirli C, et al. Evaluation of effectiveness of concentrated growth factor on osseointegration[J]. Int J Implant Dent, 2017, 3(1): 7.
- [22] Schertl P, Volk J, Perduns R, et al. Impaired angiogenic differentiation of dental pulp stem cells during exposure to the resinous monomer triethylene glycol dimethacrylate[J]. Dent Mater, 2019, 35(1): 144-155.
- [23] D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions *in vivo*[J]. J Bone Miner Res, 2010, 12(12): 2040-2049.
- [24] Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP)[J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(7): 709-721.
- [25] Liu Q, Du J, Fan J, et al. Generation and characterization of induced pluripotent stem cells from mononuclear cells in schizophrenic patients[J]. Cell J, 2019, 21(2): 161-168.

[收稿日期] 2019-03-16

[本文编辑] 吴洋

学术快讯

上海交通大学医学院 3 位学者入选 2019 年度上海市“曙光计划”项目

日前,上海市教育委员会公布了上海市 2019 年度“曙光计划”项目入选名单,上海交通大学医学院 3 人入选该项计划,分别为附属瑞金医院曹亚南、附属第九人民医院孙树洋、附属儿童医学中心段才闻。

曹亚南,研究员,博士生导师,主要研究方向为内分泌代谢病的临床和基础研究。孙树洋,研究员,博士生导师,主要方向为构建全球最大的头颈肿瘤模型(PDX/PDC/PDO)队列,整合模型的药效表型-临床数据-生命组学,建立能反映肿瘤患者个体化遗传特征的药物研发平台,以此开展头颈肿瘤新药发现及临床合作研究。段才闻,副研究员,博士生导师,长期从事骨髓微环境与白血病干细胞(LSC)及造血干细胞(HSC)相互调控的生物医学研究。

“曙光计划”由上海市教育发展基金会倡议、出资,并与上海市教育委员会共同实施,着力打造一支科研创新人才队伍。上海交通大学医学院紧紧围绕建设一流医学院的发展目标,高度重视并不断优化青年科研人才的培养及成长环境,不断释放科研人才活力。据悉,上海交通大学医学院此前已有 75 位曙光学者获得资助。