

综述

釉基质蛋白衍生物对牙周组织再生相关细胞的生物学作用及其成血管作用的研究进展

庄齐翔, 董家辰, 束 蓉

上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周病科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011

[摘要] 釉基质蛋白经研究证实能促进牙周组织再生, 随后其被开发成釉基质蛋白衍生物(enamel matrix derivative, EMD)。目前在临床上, EMD已应用20余年, 多项临床研究表示其亦具有较突出的牙周组织再生功能。血管生成是组织再生的关键步骤, 即新生血管可将多种细胞因子运送到组织缺损区, 以促进组织再生。同时, 另有文献指出, EMD有成血管作用。该文就EMD对牙周组织再生相关细胞的作用及其成血管作用进行综述。

[关键词] 釉基质蛋白衍生物; 血管生成; 血管内皮细胞; 牙周组织再生

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.08.017 **[中图分类号]** R781.4² **[文献标志码]** A

Biological and angiogenic effects of enamel matrix derivative on periodontal regeneration-related cells

CHUANG Chi-hsiang, DONG Jia-chen, SHU Rong

Department of Periodontology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China

[Abstract] Enamel matrix protein has been proved to promote periodontal regeneration, and later developed into enamel matrix derivative (EMD). At present, EMD has been used in clinic for more than 20 years, and a number of clinical studies have shown that it also has a prominent role in periodontal regeneration. Angiogenesis also plays an essential role in tissue regeneration. This process allows the transportation of numerous cytokines to tissue defect areas via newly formed blood vessel, which can then stimulate periodontal regeneration. Several researches have indicated that EMD can stimulate angiogenesis. In this paper, the effects of EMD on periodontal regeneration-related cells and angiogenesis are reviewed.

[Key words] enamel matrix derivative (EMD); angiogenesis; vascular endothelial cell; periodontal regeneration

牙周病是口腔两大疾病之一, 可引起牙周支持组织不可逆的破坏, 临床表现为牙龈退缩、牙齿松动甚至出现牙列缺损或缺失。牙周病较理想的治疗结果是牙周组织再生。引导性组织再生术(guided tissue regeneration, GTR)被认为是临床上牙周再生性手术的“金标准”^[1]。早在1982年, GTR这一概念被Nyman等^[2]提出。随后, Ivanovski等^[3]的研究发现该技术可通过膜性材料阻挡牙龈上皮在愈合期沿根面生长, 提供空间引导牙周膜细胞优先占领根面, 进而达到牙周组织的再生。同期, 又有学者证实釉基质蛋白(enamel matrix protein, EMP)在牙根发育中可发挥重要作用。而后, EMP被开发成釉基质蛋白衍生物(enamel matrix derivative, EMD), 研究^[4]显示在临床上其可被直接植入

牙槽骨缺损处, 促进病损区域牙周组织的再生; 且20多年的临床应用成果表明, EMD是鲜少能够促进牙周组织再生的生物材料之一。

1 EMD概述

1982年Lindskog^[5]对猴子发育过程中的牙根表面进行检测, 发现了釉质特异性蛋白。7年后, Slavkin等^[6]在动物实验中证实, 此蛋白是上皮根鞘内层细胞所分泌的EMP, 同时还指出EMP与牙骨质形成间可能存在关联。采用放射自显影及扫描电镜的相关研究^[7]证实, 包绕牙根的上皮根鞘细胞会释放EMP到牙根表面, 牙囊的外

[基金项目] 国家自然科学基金(81570977); 上海市科学技术委员会资助项目(18ZR1422400)。

[作者简介] 庄齐翔(1995—), 男, 中国台湾, 硕士生; 电子信箱: bensongchuang1995@163.com。

[通信作者] 束 蓉, 电子信箱: shurong1977@163.com。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81570977); Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (18ZR1422400).

[Corresponding Author] SHU Rong, E-mail: shurong1977@163.com.



胚间充质细胞与根面接触后可在EMP的诱导下分化为成牙骨质细胞,由该细胞分泌的基质可矿化形成牙骨质,而这些新生的牙骨质可诱导牙周膜及牙槽骨的形成^[7]。

EMD是从牙齿发育期的釉质中提取的蛋白质混合物,主要活性成分为釉原蛋白(amelogenin, Am),占蛋白总量的90%;其他成分还包含釉蛋白及成釉蛋白等,且EMD的成分和生理功能与EMP相似^[4,8-9]。由于人的牙胚不易获取,且Am的基因序列在不同种属来源间高度保守,因此研究者常采用酸提取法从猪的牙胚组织中获得EMD,并与相应载体结合后冻干保存。如瑞典Biora公司的Emdogain[®],即是从猪的胚胎发育期釉质中提取EMD后溶于载体丙二醇藻酸酯内制成的针剂。临床上该针剂可直接注射在牙周组织缺损处,主要应用于垂直骨缺损、根分叉病变和牙龈退缩等治疗^[4,8-10]。

2 EMD与牙周组织再生技术的发展

传统的牙周治疗可通过清除病原体 and 坏死组织以控制疾病的发展,但只有少量的牙周组织可在治疗部位再生^[11]。为进一步提升牙周病的治疗效果,在菌斑控制的基础上获得牙周缺损组织的再生是牙周病治疗的目标。Wennström等^[12]比较了28例受试者的深牙周袋在翻瓣清创后植入EMD(实验组)或丙二醇藻酸酯(对照组)的术后情况,结果显示在为期3周的临床试验中,实验组受试者的探诊深度和牙龈指数在第1周就有明显好转,在2周后的探诊深度均小于4 mm、牙龈指数均为0,且实验组受试者的术后反应也小于对照组;提示EMD有助于牙周组织的愈合。另有多中心研究^[11]指出,发生牙龈退缩的患牙可采用EMD联合冠向复位瓣(coronally advanced flap, CAF)及结缔组织移植术(connective tissue graft, CTG)进行修复,以提高患牙的根面覆盖率;该研究的组织学证据显示,CAF+EMD组的患牙根面有新生牙骨质的形成,而CAF+CTG组则无新生牙骨质形成(组织学表现为长结合上皮愈合);提示EMD可促进牙周组织的再生。除了上述临床文献外,以往研究发现EMD有良好的牙周缺损修复效果,不仅可促进无细胞牙骨质再生及牙周膜细胞的增殖和分化,还能在组织学上呈现出真正的牙周组织再生^[4,10]。

3 EMD对牙周组织再生相关细胞的作用

近年来,随着组织工程和干细胞再生技术的日趋成

熟,结合种子细胞、生长因子及支架材料的牙周组织工程已成为该领域研究中的新兴热点。也正是基于上述研究结果,EMD成为了生长因子的最佳选择之一,许多着重于EMD对牙周组织相关细胞作用的研究也相继增多^[10,13-16]。

牙龈成纤维细胞(gingival fibroblast, GF)是牙龈固有层的主要细胞,具有分泌胶原纤维、维持及改建牙龈结缔组织的功能。Sakoda等^[17]的实验结果显示,一定剂量的EMD可刺激人牙龈成纤维细胞(human gingival fibroblast, HGF)分泌转化生长因子- β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),而该2个因子又可通过胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)和磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3-kinase/AKT serine-threonine kinase, PI3K/AKT)等通路刺激HGF分泌血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。Wang等^[18]的研究表明一定剂量的EMD能促进HGF的增殖和迁移,同时还可上调HGF中I型胶原纤维和VEGF-A的表达水平。Wyganowska-Swiatkowska等^[19]的研究指出EMD不仅可刺激HGF的增殖,还可促进HGF分泌透明质酸和蛋白聚糖。综合上述文献我们发现,EMD能够促进HGF的增殖,提高胞外基质蛋白的合成,调节组织的炎症反应,促进新生血管形成及组织的修复和再生。

牙周膜成纤维细胞(periodontal ligament cell, PDLC)是牙周膜中数量最多、功能最重要的细胞,不仅能够高效率地合成及分解胞外基质的胶原蛋白,还具备分化为成骨细胞和成牙骨质细胞的潜能,可参与牙周组织的改建、更新及修复。Miron等^[20]研究发现,人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament cell, hPDLC)受EMD刺激一定时间后,可下调白介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-8和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达。Qi等^[21]研究显示,病变的牙骨质可刺激体外hPDLC表达牙骨质附着蛋白(cementum attachment protein, CAP)和牙骨质蛋白-1(cementum protein-1, CEMP1);同时,该研究还发现EMD在体内实验中可促进这一行为,在牙骨质表面形成新生牙骨质样结构。Villa等^[22]的研究发现EMD的不同成分可对hPDLC发挥不同作用,其中相对分子质量大于20 000的成分可促进VEGF和IL-6的分泌,相对分子质量在5 000左右的成分可促进IL-4、IL-8和单核细胞趋化因子-1

(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的分泌。Heng 等^[23]的研究表明, EMD 可上调 hPDLSC 对结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 和 TGF- β 的分泌。综合上述文献可知, EMD 能够促进 hPDLSC 的增殖, 下调炎症相关细胞因子的表达, 上调牙周骨质和成血管相关基因的表达, 有利于牙周组织的再生。

牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cell, PDLSC) 存在于牙周膜中, 属于牙源性间充质干细胞的成员之一, 具有自我更新及多向分化的潜能^[24-25]。Wang 等^[26]的研究表明, EMD 能促进人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cell, hPDLSC) 的增殖, 上调 I 型胶原纤维、成骨细胞特异因子-2 (periostin, *POSTN*)、*RUNX2* (runt-related transcription factor 2)、骨桥蛋白 (osteopontin, *OPN*)、骨钙素 (osteocalcin, *OCN*) 和 *CAP* 的基因表达水平, 上调碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和 *CAP* 的蛋白表达水平; 继而提示, EMD 能够上调 hPDLSC 对牙周骨质和成骨相关基因的表达, 促进细胞分化为成牙骨质细胞和成骨细胞, 生成新的牙骨质和牙槽骨。

除上述细胞外, Miron 等^[20]的研究发现 EMD 可上调成骨细胞表达核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL), 进而促进成骨细胞的增殖。Miron 等^[27]的另一项研究也表明, EMD 可上调成骨细胞中 TGF- β 1、ALP 和 I 型胶原纤维的基因表达水平, 下调 IL-1 β 的基因表达水平。上述文献均提示, EMD 能够促进成骨细胞的增殖和分化, 上调成骨相关基因的表达, 下调炎症相关基因的表达, 从而促进牙槽骨再生。另外, Wyganowska-Swiatkowska 等^[28]的研究显示, 一定浓度的重组猪釉原蛋白 (recombinant porcine amelogenin, rPAm) 可抑制人舌鳞癌细胞 (SCC-25) 的增殖和迁移, 提示 EMD 中的蛋白质成分可防止上皮细胞过早定植于缺损区, 给予再生相关细胞 (如 PDLSC 等) 充足的时间来分化、增殖并迁移到组织缺损处, 从而增进牙周组织的再生。

4 EMD 的成血管作用

成血管作用 (angiogenesis) 是从既有血管延伸产生新生血管的过程, 可在组织再生过程中发挥重要作用。血管内皮细胞是参与成血管作用的主要细胞, 需历经脱离基底膜、细胞迁移、细胞增殖和生成管状样结构等一系列步骤实现血管新生。血管内皮细胞的成血管作用是由 TGF- β 、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor,

HGF)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、血管生成素-2 (angiopoietin-2, ANG-2)、IL-8、bFGF、血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 和 VEGF 等多种细胞因子共同作用的结果。Aspriello 等^[29]对比了 28 例受试者的深牙周袋在翻瓣清创后植入 EMD (实验组) 或丙二醇藻酸酯 (对照组) 的术后情况, 于术后 48 h 行牙龈组织活检, 免疫组织化学的检测结果显示试验组受试者的内皮细胞来源的 VEGF 浓度和组织微血管密度 (microvessel density, MVD) 均较对照组升高。Amin 等^[30]的研究表明, EMD 及富含酪氨酸的釉原蛋白多肽 (tyrosine-rich amelogenin peptide, TRAP) 可促进 hPDLSC 分化成血管内皮细胞, 其中 TRAP 又可上调 hPDLSC 对血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, *VEGFR2*)、酪氨酸激酶含免疫球蛋白样和 EGF 样域 1 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1, *TIE1*)、血管生成素-1 受体和血管内皮细胞钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 的基因表达水平。Miron 等^[20]的研究指出, EMD 可促进人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 的增殖和迁移, 上调 HUVEC 中细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule 1, *ICAM-1*)、E-选择素 (E-selectin) 和 *ANG-2* 的基因表达水平。Andruxhov 等^[31]的研究显示, EMD 可提高 HUVEC 中 E-选择素的基因表达水平, 其中相对分子质量小于 8 000 的成分还可上调 *ICAM-1*、血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF)、*VEGFR1* 和 *VEGFR2* 的表达。同样地, Jonke 等^[32]的研究发现 EMD 和 TRAP 可提高 HUVEC 中 *ICAM-1*、E-选择素、vWF、*VEGFR1* 和 *VEGFR2* 的表达水平, 且在体外成血管实验中刺激 HUVEC 形成血管样结构。Park 等^[33]的实验显示, EMD 可促进 HUVEC 的增殖和黏附。

5 总结与展望

综上所述, EMD 可通过促进牙周组织再生相关细胞的增殖和迁移、上调成骨和成牙骨质相关基因的表达、下调炎症相关细胞因子的分泌、刺激成血管相关膜蛋白的表达及细胞因子的分泌, 促进牙周组织的再生。此外, EMD 的成血管作用不是仅针对血管内皮细胞, 而是对整体牙周再生相关细胞进行刺激后的结果。血管内皮细胞是成血管作用中的基础细胞, EMD 在促进血管内皮细胞增殖的同时, 还可刺激 hPDLSC 分化成血管内皮细胞。

EMD可刺激GF和PDLC分泌VEGF和TGF- β ,而后两者可作为血管内皮细胞的趋化因子,同时EMD也可上调血管内皮细胞表达VEGFR1和VEGFR2,在上述2个过程的共同作用下促进血管内皮细胞向组织缺损区迁移。GF和PDLC分泌的VEGF可诱导血管内皮细胞在组织缺损区组建成血管样结构,同时EMD可刺激血管内皮细胞分泌ANG-2,进而促使血管样结构成熟为新生血管。另外,

EMD对炎症因子、炎症细胞及血小板的调节也能够促进组织愈合和血管新生。EMD对整体牙周组织再生相关细胞的作用增强了牙周组织成血管化的效应,但目前有关牙周组织血管化再生的具体机制尚不清楚,且不同EMD成分的作用也不尽相同,不同成分间的交互作用还有待厘清,因此这都将是今后的重点研究方向。

参·考·文·献

- [1] Menicanin D, Hynes K, Han J, et al. Cementum and periodontal ligament regeneration[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 881: 207-236.
- [2] Nyman S, Lindhe J, Karring T, et al. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease[J]. *J Clin Periodontol*, 1982, 9(4): 290-296.
- [3] Ivanovski S. Periodontal regeneration[J]. *Aust Dent J*, 2009, 54(Suppl 1): S118-S128.
- [4] Miron RJ, Sculean A, Cochran DL, et al. Twenty years of enamel matrix derivative: the past, the present and the future[J]. *J Clin Periodontol*, 2016, 43(8): 668-683.
- [5] Lindskog S. Formation of intermediate cementum. I: early mineralization of prismatic enamel and intermediate cementum in monkey[J]. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1982, 2(2): 147-160.
- [6] Slavkin HC, Bessem C, Fincham AG, et al. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 991(1): 12-18.
- [7] Rathva VJ. Enamel matrix protein derivatives: role in periodontal regeneration[J]. *Clin Cosmet Investig Dent*, 2011, 3: 79-92.
- [8] 王爽, 丰培勋, 陈悦, 等. 釉基质蛋白衍生物对牙周膜干细胞分化、增殖的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(23): 3716-3722.
- [9] 温玉洁, 冯馨仪, 葛颂. 釉基质蛋白对牙及牙周组织再生的研究进展[J]. 2016, 26(6): 390-391.
- [10] 陈发明, 高丽娜, 陈芳. 牙周再生治疗现状和进展[J]. *口腔疾病防治*, 2019, 27(1): 9-16.
- [11] Tavelli L, McGuire MK, Zucchelli G, et al. Biologics-based regenerative technologies for periodontal soft tissue engineering[J]. *J Periodontol*, 2020, 91(2): 147-154.
- [12] Wennström JL, Lindhe J. Some effects of enamel matrix proteins on wound healing in the dento-gingival region[J]. *J Clin Periodontol*, 2002, 29(1): 9-14.
- [13] Liu AQ, Hu CH, Jin F, et al. Contributions of bioactive molecules in stem cell-based periodontal regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1016.
- [14] 吕雪雯, 潘春玲. 牙周组织工程的研究进展[J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(12): 1132-1136.
- [15] 董正谋, 刘锐, 刘鲁川, 等. 种子细胞在牙周组织再生治疗中的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2019, 46(1): 48-54.
- [16] 韩佳吟, 孙坚炜, 雷利红, 等. 牙周膜再生研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2019, 12(5): 300-306.
- [17] Sakoda K, Nakajima Y, Noguchi K. Enamel matrix derivative induces production of vascular endothelial cell growth factor in human gingival fibroblasts[J]. *Eur J Oral Sci*, 2012, 120(6): 513-519.
- [18] Wang Y, Zhang Y, Jing D, et al. Enamel matrix derivative improves gingival fibroblast cell behavior cultured on titanium surfaces[J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(4): 685-695.
- [19] Wyganowska-Swiatkowska M, Urbaniak P, Lipinski D, et al. Human gingival fibroblast response to enamel matrix derivative, porcine recombinant 21.3-kDa amelogenin and 5.3-kDa tyrosine-rich amelogenin peptide[J]. *Hum Cell*, 2017, 30(3): 181-191.
- [20] Miron RJ, Dard M, Weinreb M. Enamel matrix derivative, inflammation and soft tissue wound healing[J]. *J Periodontol Res*, 2015, 50(5): 555-569.
- [21] Qi Y, Feng W, Cai J, et al. Effects of conservatively treated diseased cementum with or without EMD on *in vitro* cementoblast differentiation and *in vivo* cementum-like tissue formation of human periodontal ligament cells[J]. *Cell Prolif*, 2014, 47(4): 310-317.
- [22] Villa O, Brookes SJ, Thiede B, et al. Subfractions of enamel matrix derivative differentially influence cytokine secretion from human oral fibroblasts[J]. *J Tissue Eng*, 2015, 6: 2041731415575857.
- [23] Heng NH, Zahltén J, Cordes V, et al. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor- β 1 on connective tissue growth factor in human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Periodontol*, 2015, 86(4): 569-577.
- [24] Liu J, Zhao Z, Ruan J, et al. Stem cells in the periodontal ligament differentiated into osteogenic, fibrogenic and cementogenic lineages for the regeneration of the periodontal complex[J]. *J Dent*, 2020, 92: 103259.
- [25] 都沙沙, 蔡智国, 杨琨, 等. 牙源性间充质干细胞促进牙周组织再生的可能性与前景[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(17): 2782-2788.
- [26] Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, et al. *In vitro* studies on human periodontal ligament stem cell sheets enhanced by enamel matrix derivative[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 141: 102-111.
- [27] Miron RJ, Chandad F, Buser D, et al. Effect of enamel matrix derivative liquid on osteoblast and periodontal ligament cell proliferation and differentiation[J]. *J Periodontol*, 2016, 87(1): 91-99.
- [28] Wyganowska-Swiatkowska M, Urbaniak P, Lipinski D, et al. Effects of enamel matrix proteins on adherence, proliferation and migration of epithelial cells: a real-time *in vitro* study[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1): 160-168.
- [29] Aspriello SD, Zizzi A, Spazzafumo L, et al. Effects of enamel matrix derivative on vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in gingival tissues of periodontal pocket: a comparative study[J]. *J Periodontol*, 2011, 82(4): 606-612.
- [30] Amin HD, Olsen I, Knowles J, et al. A tyrosine-rich amelogenin peptide promotes neovascularogenesis *in vitro* and *ex vivo*[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(5): 1930-1939.
- [31] Andrukhov O, Gemperli AC, Tang Y, et al. Effect of different enamel matrix derivative proteins on behavior and differentiation of endothelial cells[J]. *Dent Mater*, 2015, 31(7): 822-832.
- [32] Jonke E, Gemperli AC, Zhang TW, et al. Effect of tyrosine-rich amelogenin peptide on behavior and differentiation of endothelial cells[J]. *Clin Oral Investig*, 2016, 20(8): 2275-2284.
- [33] Park JS, Pabst AM, Ackermann M, et al. Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrix using enamel matrix derivative and platelet-rich fibrin: influence on mature endothelial cell characteristics *in vitro*[J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 22(2): 909-917.

[收稿日期] 2020-05-05

[本文编辑] 邢宇洋