[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2020.02.013

·综述·

牙本质在骨组织工程学中的应用

肖闻澜[1]，　胡琛[1,2]，　荣圣安[1]，　朱宸佑[1,2]，　伍颖颖[1,2]
1. 四川大学口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心，四川 成都(610041)；　2. 四川大学华西口腔医院种植科，四川 成都(610041)

【摘要】　由各种原因导致的口腔硬组织缺损会严重影响牙列修复的效果。近年来，骨组织工程学因材料来源广泛、不良反应少等优势成为口腔骨组织重建研究的热点内容。本文就牙本质的组成结构及其在骨组织工程学中的运用作一综述，为进一步优化其性能提供新的思路。文献复习结果表明，牙本质的结构与自体骨非常类似，无机成分以羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)为主，有机成分以I型胶原为主，还包括非胶原蛋白(noncollagenous proteins, NCPs)和生长因子等。因为其独特的组成，牙本质可通过不同的加工方式起到支架和(或)生长因子来源的作用。脱蛋白加工去除大部分有机物质，形成以HA为主的支架材料，其结构疏松多孔，有利于血管化和细胞浸润；脱矿通过降低矿化成分结晶度增大牙本质孔隙率，保留HA、胶原纤维及其搭载的生长因子，因此所得材料功能多样，包括促进细胞成骨分化、黏附和增殖等；提取的牙本质NCPs则属于生物活性分子，通过调控未分化细胞、晶体成核和矿化等参与骨的形成过程，可以配合其他支架材料。

【关键词】　牙本质；　支架材料；　骨组织工程学；　骨缺损；　骨修复；　生物材料；　脱蛋白质；　脱矿；　非胶原蛋白；　生长因子；　孔隙率

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【中图分类号】　R781　【文献标志码】　A　【文章编号】　2096-1456(2020)02-0127-04

【引用著录格式】　肖闻澜, 胡琛, 荣圣安, 等. 牙本质在骨组织工程学中的应用[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28(2): 127-130.

Application of dentin in bone tissue engineering

XIAO Wenlan[1], HU Chen[1,2], RONG Shengan[1], ZHU Chenyou[1,2], WU Yingying[1,2]. 1. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Implantology, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: WU Yingying, Email: yywdentist@163.com, Tel: 86-28-85503579

【Abstract】　Defects in oral hard tissue caused by various factors have a negative impact on the functional and aesthetic results of prosthetic treatment. In recent years, the usage of bone tissue engineering for bone reconstruction has drawn widespread attention. Bone tissue engineering exhibits significant advantages, including the abundance of building materials and few side effects. In this paper, the composition and structure of dentin and its application in bone tissue engineering are reviewed, providing a new way to further optimize its performance. The results of a literature review show that the structure of dentin is very similar to that of autogenous bone. The inorganic component is mainly hydroxyapatite (HA), while the organic component is mainly collagen I, noncollagenous proteins (NCPs) and growth factors. Because of its unique composition, dentin can act as a scaffold and/or growth factor source through different processing methods. The deproteinization process removes most of the organic substances and creates a HA-based scaffold material with high porosity, which allows for vascularization and cellular infiltration. Demineralization increases dentin porosity by reducing the crystallinity of the mineralized components, so that part of HA, collagen fibers and growth factors are preserved. Demineralized dentin possesses various regulation functions ranging from differentiation, adhesion and prolif-

【收稿日期】2018-11-18；【修回日期】2019-10-16
【基金项目】国家自然基金面上项目(81870801)
【作者简介】肖闻澜，学士，Email：2509871803@qq.com
【通信作者】伍颖颖，副教授，博士，Email：yywdentist@163.com, 86-28-85503579

eration of primitive cells and bone forming cell lineage. Extracted NCPs, as bioactive molecules, have been proved to play important roles that control cell differentiation, crystal nucleation and mineralization in bone formation. NCPs could be combined with variety of scaffold materials and modify their properties.

【Key words】 dentin; scaffold material; bone tissue engineering; bone defect; bone reconstruction; biomaterial; deproteinization; demineralization; noncollagenous proteins; growth factors; porosity

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(2): 127-130.

牙周疾病、肿瘤、外伤等均可造成口腔硬组织的缺损。为了实现骨组织的再生,组织工程学是一个很有前景的治疗方向[1]。结合生命科学和工程学的原理和技术,以生物材料为支架,搭载患者自身的干细胞,联合生长因子进行移植,可以在修复组织的同时减少免疫排斥、病原体转移等问题[2]。牙本质是一种很有潜力的生物材料,它的无机、有机成分构成与骨组织类似。无机成分以羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)为主,有机成分以I型胶原为主,这些成分均为制备支架的常用物质。另外,牙本质本身含有多种生长因子[3]。近年来,牙本质在骨组织工程学中的应用引起了很大关注。

1 牙本质的组成概述

人牙本质由65%的无机成分与35%的有机成分构成,无机成分以HA为主[4]。需要注意的是,牙本质中HA的含量和结晶程度与其所在部位有很大关系。相较于牙冠部分,牙根部牙本质由结晶度更低、Ca/P更小的磷酸盐构成,因此与自体骨具有更加接近的理化性质[5]。

近90%的牙本质有机成分由I型胶原构成[6]。这种3股超螺旋结构的胶原相互交联形成网架状结构,容纳沉淀于其中的矿化结晶以及其他有机组分,包括非胶原蛋白(noncollagenous proteins, NCPs)、蛋白多糖、脂质等[7]。NCPs大致可以分为两类,第一类包括牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP),牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)及牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1, DMP1)。从前认为这类NCPs由成牙本质细胞合成,仅存在于牙本质基质中,为牙本质特异性蛋白。但是,最近也有很多研究在骨等矿化组织中发现它们[8]。另一类NCPs定位于牙本质、牙骨质、骨组织的细胞外基质,包括骨涎蛋白(bone sialoproteins, BSP)、骨钙蛋白和骨钙素(bone gla-protein, BGP),NCPs在牙本质和骨组织的矿化过程中均起到重要作用[9-10]。牙本质中贮藏有丰富的生长因子与生物活性分子。如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP),这种糖蛋白定位于牙本质、牙骨质与骨组织的细胞外基质,被证实可诱导间充质干细胞向软骨和骨组织分化[11]。胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF),血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)也被发现存在于人牙本质基质中[12]。牙本质的组成结构赋予了它在组织工程学中承担各种角色(支架、生长因子来源等)的潜能,接下来本文将阐述牙本质的各种应用方式。

2 牙本质在组织工程学中的应用

2.1 脱蛋白质

脱蛋白质加工的出发点在于发挥HA等磷酸钙的支架作用。对于HA类生物材料来说,高孔隙率和足够的孔径是有效促进骨再生的重要因素,多孔区域允许血管化和细胞浸润[13]。牙本质原本是致密的矿化组织,去除蛋白质后可以提高其孔隙率。Fichant等[14]对牙本质进行脱蛋白质处理,扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察到材料表面除牙本质小管的天然孔隙之外,出现了胶原纤维消失后形成的新孔隙,这种新孔隙使材料的总体孔隙度增大到约20%。脱蛋白后,牙本质的弹性模量、硬度等机械性能有所下降,与已经在组织工程学中用作支架的珊瑚外骨骼材料的性能接近。研究者认为这些结果展现了脱蛋白牙本质作为支架的潜能。Tabatabaei等[15]比较了脱蛋白、脱矿和天然牙本质材料,在模拟体液中,SEM显示脱蛋白牙本质组具有最高的HA晶体形成速率,培养的人牙髓干细胞也在脱蛋白牙本质表面显示出更好的细胞黏附、活力和分化情况。

脱蛋白牙本质或许可作为一种合适的支架,但是这种方法仍然有争议,很多研究者认为NCPs、

生长因子等对于牙本质促进骨再生的作用是必须的。目前运用较为广泛的脱蛋白方法是使用质量分数为2.6%的NaOCl溶液于37 ℃下浸泡样品，使用摇动平台持续混合，每天换液一次，总流程持续14 d[16]。

2.2　脱矿

脱矿处理是目前研究较多的一种方式。这种方式保留胶原纤维，通过去除部分矿物质提高孔隙率。Kim等[4]分析了脱矿与未脱矿牙本质的组成结构，X线能量色散谱显示脱矿牙本质由Ca/P比较小、结晶度较低的磷酸盐构成，SEM显示脱矿牙本质小管直径更大，伴有胶原纤维的网状暴露。这些改变有利于增强骨组织再生材料的两种重要性能，即骨传导性和骨诱导性。牙本质的骨传导性与无机成分结晶度呈负相关，高结晶度的磷酸钙往往难以由破骨细胞直接降解，在移植部位吸收缓慢，反之脱矿牙本质结晶度低，易降解[17]。Bono等[18]将MG63和SAOS-2细胞接种至脱矿牙本质材料表面，观察到了显著的细胞黏附与增殖，这表明了脱矿牙本质优秀的骨传导性。脱矿牙本质骨诱导性的增强则与各种生长因子容易通过增宽的牙本质小管释放有关。以目前研究较多的BMP-2为例，脱矿牙本质可以作为储藏库，在移植后不断释放BMP-2，募集和诱导未分化细胞向骨组细胞分化。Kim等[19]在裸鼠背部的皮下组织植入脱矿牙本质，在植入位点发现了新骨形成，证实牙本质具有骨诱导性。

由于这两种性能，研究者们不仅关注脱矿牙本质的支架作用，还在考虑其作为生长因子来源的可行性。还有学者认为，将重组骨形态发生蛋白（recombinant human BMP-2，rhBMP-2）搭载至脱矿牙本质将获得更好的效果[20]。Kim等[21]在骨缺损模型中，通过联用脱矿牙本质与rhBMP-2实现了与自体骨接近的新骨形成水平。

在技术上，目前运用的脱矿方式非常多样。一般认为由于酸性物质对有机成分的影响，过度脱矿是不利的。Li等[22]提出运用5%、10%、17%浓度的EDTA逐级脱矿牙本质，从而保留蛋白质等有机成分的方案。杨禾丰等[23]在这种脱矿牙本质表面成功观察到了骨髓间充质干细胞的增殖及成骨分化。Tabatabaei等[15]也在其体外实验中得到了相似的结果。

2.3　提取非胶原蛋白

在组织工程学领域，运用人体或非人体组织的提取物是很常见的做法。考虑到牙本质中非胶原蛋白的丰富含量，单独提取NCPs，再联合其他支架材料是一个可行的选择。NCPs被证实参与调控骨的形成，控制未分化细胞的黏附、增殖和分化，以及羟基磷灰石的成核与胶原蛋白的矿化等。DPP是牙本质基质中最丰富的非胶原蛋白，被证实参与生物矿化过程初始阶段HA结晶的成核[24]。DSP可作为一种配体，通过诱导未分化的间充质细胞内的信号传导级联反应，指导其分化[25]。DSP通过加速成骨细胞增殖以及随后的成骨细胞分化来促进骨的形成[26]。在DMP1的环境下培养人牙周膜干细胞，通过碱性磷酸酶染色和von Kossa硝酸银染色观察向成骨细胞的分化，DMP1处理组分化程度明显高于无DMP1的对照组[27]。因此，NCPs被视为一种很有前景、可搭载至支架的生物活性分子。

目前从牙本质中分离NCPs的过程基本遵循三步法，三步依次使用盐酸胍、EDTA溶液、盐酸胍，每一步分别提取非矿化成分中的、紧邻和结合HA的、以及其他剩余的NCPs[28]。

3　小　结

目前，各种形式的牙本质材料已在体外和体内实验中展现了其有效性与安全性。牙本质含有磷酸盐、胶原蛋白、生长因子等成分。脱蛋白加工可得到高孔隙率、大孔径的以HA为主的支架材料；脱矿加工可得到兼有胶原和HA，且搭载多种生长因子的多功能材料；提取NCPs加工可以得到生物活性分子，用于交联、改性其他材料。因此，在骨组织工程学的探索中，可以考虑将牙本质作为一个合适的选择。但是，牙本质材料的应用仍有许多问题。各种加工方式得到的牙本质材料的优劣势还需要分析，每种制作工艺还需要优化，这些都需要进一步的研究来完善。

参考文献

[1]　Chu C, Deng J, Xiang L, et al. Evaluation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) cross-linked collagen membranes and concerns on osteoblasts[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 67: 386-394.

[2]　Caddeo S, Mattioli-Belmonte M, Cassino C, et al. Newly-designed collagen/polyurethane bioartificial blend as coating on bioactive glass-ceramics for bone tissue engineering applications[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 96: 218-233.

[3]　Salehi S, Cooper P, Smith A, et al. Dentin matrix components ex-

tracted with phosphoric acid enhance cell proliferation and mineralization[J]. Dent Mater, 2016, 32(3): 334-342.

[4] Kim YK, Kim SG, Oh JS, et al. Analysis of the inorganic component of autogenous tooth bone graft material[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(8): 7442-7445.

[5] Kim YK, Kim SG, Yun PY, et al. Autogenous teeth used for bone grafting: a comparison with traditional grafting materials[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2014, 117(1): e39-e45.

[6] Tabatabaei FS, Tatari S, Samadi R, et al. Different methods of dentin processing for application in bone tissue engineering: a systematic review[J]. J Biomed Mater Res A, 2016, 104(10): 2616-2627.

[7] de Mattos Pimenta Vidal C, Leme-Kraus AA, Rahman M, et al. Role of proteoglycans on the biochemical and biomechanical properties of dentin organic matrix[J]. Arch Oral Biol, 2017, 82: 203-208.

[8] Villarreal-Ramirez E, Eliezer D, Garduño-Juarez R, et al. Phosphorylation regulates the secondary structure and function of dentin phosphoprotein peptides[J]. Bone, 2017, 95: 65-75.

[9] Zurick KM, Qin C, Bernards MT. Mineralization induction effects of osteopontin, bone sialoprotein, and dentin phosphoprotein on a biomimetic collagen substrate[J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(6): 1571-1581.

[10] Gulseren G, Tansik G, Garifullin R, et al. Dentin phosphoprotein mimetic peptide nanofibers promote biomineralization[J]. Macromol Biosci, 2019, 19(1): e1800080.

[11] Zhang Y, Yang W, Devit A, et al. Efficiency of coculture with angiogenic cells or physiological BMP-2 administration on improving osteogenic differentiation and bone formation of MSCs[J]. J Biomed Mater Res A, 2019, 107(3): 643-653.

[12] Avery SJ, Sadaghiani L, Sloan AJ, et al. Analysing the bioactive makeup of demineralised dentine matrix on bone marrow mesenchymal stem cells for enhanced bone repair[J]. Eur Cell Mater, 2017, 34: 1-14.

[13] Maté Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, et al. Influence of hydroxyapatite granule size, porosity, and crystallinity on tissue reaction in vivo. Part A: synthesis, characterization of the materials, and SEM analysis[J]. Clin Oral Implants Res, 2016, 27(11): 1331-1338.

[14] Fichant C, David B, Reiss T, et al. Characterization of deproteinized dentin for its use in bone tissue engineering[J]. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2017, 20(sup1): 73-74.

[15] Tabatabaei FS, Tatari S, Samadi R, et al. Surface characterization and biological properties of regular dentin, demineralized dentin, and deproteinized dentin[J]. J Mater Sci Mater Med, 2016, 27(11): 164.

[16] Chen PY, Toroian D, Price PA, et al. Minerals form a continuum phase in mature cancellous bone[J]. Calcif Tissue Int, 2011, 88(5): 351-361.

[17] Rijal G, Shin HI. Human tooth-derived biomaterial as a graft substitute for hard tissue regeneration[J]. Regen Med, 2017, 12(3): 263-273.

[18] Bono N, Tarsini P, Candiani G. Demineralized dentin and enamel matrices as suitable substrates for bone regeneration[J]. J Appl Biomater Funct Mater, 2017, 15(3): e236-e243.

[19] Kim KW. Bone induction by demineralized dentin matrix in nude mouse muscles[J]. Maxillofac Plast Reconstr Surg, 2014, 36(2): 50-56.

[20] Um IW. Demineralized dentin matrix (DDM) as a carrier for recombinant human bone morphogenetic proteins (rhBMP-2)[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1077: 487-499.

[21] Kim SY, Kim YK, Park YH, et al. Evaluation of the healing potential of demineralized dentin matrix fixed with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone grafts[J]. Materials (Basel), 2017, 10(9): 1049.

[22] Li R, Guo WH, Yang B, et al. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration[J]. Biomaterials, 2011, 32(20): 4525-4538.

[23] 杨禾丰, 胡瑜, 孙晶晶, 等. 处理的牙本质基质对骨髓间充质干细胞成骨分化影响的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2016, 34(3): 281-285.
Yang HF, Hu Y, Sun JJ, et al. Treated dentin matrix enhances proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. West Chin J Stomatol, 2016, 34(3): 281-285.

[24] Zhang H, Xie X, Liu P, et al. Transgenic expression of dentin phosphoprotein (DPP) partially rescued the dentin defects of DSPP-null mice[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195854.

[25] Li W, Chen L, Chen Z, et al. Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 300.

[26] Jaha H, Husein D, Ohyama Y, et al. N-terminal dentin sialoprotein fragment induces type I collagen production and upregulates dentinogenesis marker expression in osteoblasts[J]. Biochemistry and biophysics reports, 2016, 6: 190-196.

[27] Chandrasekaran S, Ramachandran A, Eapen A, et al. Stimulation of periodontal ligament stem cells by dentin matrix protein 1 activates mitogen-activated protein kinase and osteoblast differentiation[J]. J Periodontol, 2013, 84(3): 389-395.

[28] Huang B, Sun Y, Maciejewska I, et al. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone[J]. Eur J Oral Sci, 2008, 116(2): 104-112.

（编辑 罗燕鸿）

官网 公众号