

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.04.010

## 3D 打印技术在牙髓再生领域的研究进展

谭国忠, 江千舟

广州医科大学附属口腔医院牙体牙髓科·广州市口腔再生医学基础与应用研究重点实验室, 广东 广州(510182)

**【摘要】** 近年来,牙髓再生成为了口腔医学领域的研究热点,3D打印能够实现支架结构和形状的精准调控,为种子细胞黏附和生长因子释放提供基础,通过3D打印组织工程支架构建的3D打印“牙髓复合体”为牙髓再生研究提供了新的方向。本文就3D打印技术应用于牙髓再生的研究作一综述。文献复习结果表明,3D打印“牙髓复合体”中的支架材料、种子细胞和生长因子在牙髓再生的研究中都扮演着重要角色,其中,支架材料能发挥载体作用负载种子细胞和生长因子,并为其提供合适微环境;牙髓干细胞、根尖乳头干细胞和人脱落乳牙牙髓干细胞等常用种子细胞为牙髓再生提供细胞基础;生长因子的引入可以进一步支持牙髓组织的分化和牙髓血管重建,促进牙髓再生。目前,3D打印“牙髓复合体”在牙髓再生的研究中取得了一定进展,在实验室阶段可诱导牙髓样组织的形成,但制备生物活性良好且具有仿生血管和神经效果的3D打印“牙髓复合体”,为根管内细胞提供氧气和营养物质仍是一个巨大的挑战,需进一步的探索和研究。

**【关键词】** 牙髓再生; 组织工程; 3D打印; 牙髓复合体; 支架材料; 种子细胞; 生长因子; 牙髓血管重建

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)04-0279-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



**【引用著录格式】** 谭国忠,江千舟. 3D打印技术在牙髓再生领域的研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(4): 279-283. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2021.04.010.

**Applications and prospects of 3D printing technology in pulp regeneration** TAN Guozhong, JIANG Qianzhou.

Department of Endodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Key Laboratory of Basic and Applied Research of Oral Regenerative Medicine, Guangzhou 510182, China

Corresponding author: JIANG Qianzhou, Email: jqianzhou@126.com, Tel: 86-20-61350524

**【Abstract】** In recent years, pulp regeneration has become a research hotspot in the field of stomatology. 3D printing can realize precise control of structure and shape of scaffolds, which provide basis for seed cell adhesion and growth factor release. The 3D printing "pulp complexes" constructed by 3D printing scaffolds for tissue engineering provides a new direction for pulp regeneration research. This paper reviews the applications of 3D printing technology in pulp regeneration. The results of literature review showed that the scaffold materials, seed cells and growth factors in the 3D printing "pulp complexes" all play an important role in the pulp regeneration research. Among them, the scaffold materials act as carriers to load seed cells and growth factors and provide a suitable microenvironment for them. The common seed cells such as dental pulp stem cells, stem cells from apical papilla and stem cells from the human pulp of exfoliated deciduous teeth can provide the cellular basis for pulp regeneration. Moreover, the introduction of growth factors can further support the differentiation of pulp tissue and the reconstruction of pulp vessels and promote pulp regeneration. At present, the 3D printing "pulp complexes" in the study of dental pulp regeneration has made some progress and can induce the formation of pulp-like tissues in the laboratory. However, preparing 3D-printing "pulp complex" with good biological activity, which integrates biomimetic blood vessels and nerves to supply oxygen and nutrients to the cells in the root canal, remains a huge challenge and still needs further exploration and research.

**【Key words】** pulp regeneration; tissue engineering; 3D printing; pulp complexes; scaffold materials; seed cells; growth factors; pulp vascular reconstruction

**【收稿日期】** 2020-06-11 **【修回日期】** 2020-12-25

**【基金项目】** 广东省科技计划项目(2018B050502012)

**【作者简介】** 谭国忠, 医师, 硕士, Email: 957885020@qq.com

**【通信作者】** 江千舟, 主任医师, 博士, Email: jqianzhou@126.com, Tel: 86-20-61350524

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(4): 279-283.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Science and Technology Project of Guangdong Province (No.2018B050502012)

牙髓根尖周病常规治疗方法为根管治疗术,但治疗后由于牙髓和部分牙体组织的丧失牙齿营养缺失和抗折能力下降易导致牙折发生。理想的牙髓治疗形式是用健康的牙髓组织取代病变或坏死的牙髓组织,实现牙髓再生,以恢复牙齿的正常活力。目前,潜在的方法包括根管血运重建、干细胞治疗、牙髓植入、支架植入、三维细胞打印、可注射支架和基因治疗<sup>[1]</sup>。但由于牙髓再生治疗技术尚未成熟,暂无统一治疗标准,确切疗效也尚未可知,因此,牙髓再生在牙体牙髓领域的研究仍需更多的探索与深入研究。许多学者应用组织工程技术,从支架材料、种子细胞和生长因子等方面对牙髓再生的研究进行探索,并取得一定进展。近年来随着3D打印技术逐渐应用于组织再生领域,通过3D打印构建的组织工程支架——3D打印“牙髓复合体”为牙髓再生的研究提供了新的方向,本文针对相关研究作一综述。

## 1 3D生物打印技术

3D打印技术又称增材制造(additive manufacturing, AM)或快速成型,是一种与传统减材制造方式相反,以三维数字模型为基础,通过逐层叠加的方式将材料结合起来的工艺<sup>[2]</sup>。基本流程是:首先通过软件设计和各种扫描系统进行数据采集,然后将数据导入计算机软件进行三维重建,以STL格式保存,最后数据经3D打印机识别进行3D打印。其主要优点包括:精准制作、快速成型、节能环保和可制作个性化结构等<sup>[3-4]</sup>。在组织工程牙髓再生的应用中,3D打印存在明显优势,可以实现支架结构和形状的可变性和可控性。在3D打印对支架结构的控制上,能将支架设计成微米级甚至纳米级的多孔各向同性纤维,从而诱导细胞的分布表现出规律性和方向性。Hsiao等<sup>[5]</sup>利用3D打印设计微丝间隙宽度为150 μm和200 μm聚乳酸支架,体外探讨不同微丝间隙对人牙髓干细胞生长方向性的影响,结果显示前者更容易诱导细胞定向生长。3D打印还可设计适应患者的个性化结构支架,Han等<sup>[6]</sup>通过3D生物打印生产一个具有特异性形状的三维牙本质-牙髓复合体,能诱导人牙髓

干细胞在单一结构内的局部分化,细胞的存活率可达到88%以上。3D打印技术在神经再生的研究中也取得一定的进展,Hu等<sup>[7]</sup>采用3D打印技术制备了由低温聚合明胶甲基丙烯酸酯凝胶和脂肪干细胞组成的生物导管,成功地连接10 mm缺损的坐骨神经间隙,该技术在周围神经再生展示了很大的潜力。因此,利用3D打印支架负载不同干细胞形成牙髓神经构建体,有望在牙髓神经再生的研究加以应用。近年来,3D打印可实现将生物材料、活细胞和生物活性分子打印成复杂的3D功能组织结构,被定义为“生物打印”<sup>[8]</sup>。3D生物打印能精确锚定各种种子细胞在制造支架上的某些位置,对细胞和生物材料定位具有显著可控性,同时在内部和外部细节上保持了很高的准确性<sup>[9]</sup>。由此可见,3D生物打印在牙髓再生的研究中具有较大潜力。

## 2 3D打印“牙髓复合体”的支架材料

在牙髓再生过程中,理想的支架材料发挥重要作用,其良好的生物相容性和生物活性有利于种子细胞的附载和生长因子的持续缓慢释放,也为细胞的迁徙、增殖和分化提供适宜的微环境,最终诱导牙髓样组织的形成。目前应用于牙髓再生研究的支架材料主要是天然和人工合成材料两大类。

天然材料是从自然界提取的可降解材料,成分与细胞外基质相似,通常具备良好的生物活性和细胞相容性,结合种子细胞或生长因子制备成水凝胶可作为牙髓再生研究的支架材料。Yu等<sup>[10]</sup>将明胶与海藻酸钠结合,通过3D打印技术制备凝胶支架,验证了该支架可为人牙髓细胞的生长提供适宜微环境,促进细胞的生长与增殖,可作为组织工程牙髓再生的候选材料。

人工合成材料以聚合物和生物陶瓷类为主,通常具有较好的机械性能,且能避免病原体传播和减少免疫原性,但亲水性和细胞相容性较差,在一定程度上限制其应用<sup>[11-12]</sup>。目前,在探索牙髓再生的过程中,利用光交联聚合物(如明胶甲基丙烯酸酯水凝胶)进行3D制造,由于具有良好的生物

相容性和高效的血运重建功能,已被证明在牙髓和全牙再生方面前景良好<sup>[13-14]</sup>。也有一些研究报道聚合物纳米纤维在牙髓再生中可取得一定效果<sup>[15-16]</sup>。在生物陶瓷类的应用中,Hilkens等<sup>[17]</sup>利用3D打印制备羟基磷灰石支架,将三维支架负载牙髓干细胞和根尖乳头干细胞后植入小鼠皮下,结果表明有血管化牙髓样组织的形成,为3D打印“牙髓复合体”在牙髓再生领域的应用带来了新的希望。近年来,多种新型3D支架材料也已被尝试应用于牙髓再生研究,Ho等<sup>[18]</sup>将人牙髓细胞培养于3D打印的聚己酸内酯复合支架,结果显示支架有利于人牙髓细胞的增殖和分化。

### 3 3D打印“牙髓复合体”的种子细胞

应用于牙髓再生的种子细胞通常是干细胞,基于干细胞的移植方法已被研究来取代牙髓和根尖周组织的功能。干细胞作为牙髓再生的一个关键要素,主要包括牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)、根尖乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAPs)和人脱落乳牙牙髓干细胞(stem cells from the human pulp of exfoliated deciduous teeth, SHEDs),这些干细胞在牙髓再生方面存在较大潜能<sup>[19]</sup>。

牙髓干细胞具有高增殖率和多分化能力,而且还容易获取,可在恒牙或乳牙拔除后收集提取。在牙髓再生研究中,Park等<sup>[20]</sup>使用3D生物打印技术创建包含人牙髓干细胞的生物工程结构体,结果显示细胞活性在14 d后超过90%,牙本质涎磷蛋白也有高表达,提示3D打印结构体可加速牙髓干细胞的牙源性分化,具有用于牙髓再生的巨大潜力。

根尖乳头干细胞与根尖孔接近,有学者认为这些细胞在再生过程中可进入根管间隙<sup>[21]</sup>。最重要的是,根尖乳头干细胞在根尖位置能使这些细胞获得侧支血液循环,这让它们在髓鞘感染和坏死时也能存活<sup>[22]</sup>。基于以上研究,根尖乳头干细胞被认为是牙髓再生研究的候选细胞。Athirasala等<sup>[23]</sup>从人第三磨牙的根尖乳头中提取根尖乳头干细胞,并将细胞包裹在牙本质衍生水凝胶中,经DIW系统生物打印后细胞培养5 d,存活率高于90%。

人脱落乳牙牙髓干细胞同样具有高度增殖能力,能够形成牙髓样组织并分化为成牙髓细胞。Rosa等<sup>[24]</sup>研究表明,接种于支架上的人脱落乳牙

牙髓干细胞在植入小鼠皮下能够形成血管化的牙髓和牙本质样组织。

### 4 3D打印“牙髓复合体”的生长因子

组织工程中,生长因子是再生过程中的关键因素,其能与特定的细胞膜受体结合,可激活组织工程中的各种机制和途径,如细胞迁移、存活、粘附、增殖,生长和分化为所需的细胞类型<sup>[25]</sup>。许多生物活性生长因子在牙本质生成过程中形成于牙本质基质内,不仅有包括驱动根尖乳头干细胞的牙源性分化的转化生长因子-1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)和骨形成蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2),也有促进形成血管和牙髓再生的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)<sup>[26]</sup>。在牙髓再生的应用中,生长因子可促进根管内干细胞和祖细胞的趋化、增殖和分化,为牙髓再生提供基础<sup>[27-29]</sup>。因此,负载生长因子的支架可以进一步支持牙源性分化和推动牙髓血管重建,促进牙髓再生。Ashiry等<sup>[30]</sup>用VEGF-2、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、PDGF、神经生长因子和BMP-7处理后的自体牙髓嵌入在壳聚糖水凝胶支架,后续移植到狗的坏死年轻恒牙中,牙髓再生和牙本质样组织的形成均取得理想的效果。虽然生长因子在牙髓再生过程中起到关键作用,但是如何在时间和空间上精准调控生长因子的释放剂量,进一步提高牙髓再生成功率尚有待解决。Huang等<sup>[31]</sup>采用3D打印技术制备介孔硅酸钙支架作为药物载体释放BMP-2,新型三维支架在BMP-2传递系统中表现良好,人牙髓干细胞牙源性相关蛋白表达上调。3D打印支架对于生长因子在时间和空间上的剂量调控是未来研究的方向,有利于生长因子在牙髓再生过程中发挥更高的效率。

### 5 展望

3D打印给牙再生研究带来重大创新。其中,3D打印生物工程支架在牙齿及其支持结构(牙周韧带、牙槽骨和牙骨质等)的研究中取得了一定进展<sup>[8]</sup>。由于牙髓系统是一个高度血管化和神经支配的组织,牙髓再生包括牙髓及相关组织再生、牙本质形成、血管重建和神经再生,被认为是一个巨大的挑战。现阶段中,采用3D打印技术打印细胞

或生长因子在牙髓再生的研究尚处于起步阶段, 通过将活细胞和基质材料结合进行3D生物打印用于牙髓再生仍存在一定局限性。其中, 如何有效为3D牙髓构造体中的细胞提供氧气和营养物质是研究的一大难点<sup>[32]</sup>。随着3D打印技术的不断完善发展, 期待在不久将来通过3D打印可构建出功能完整的牙髓支架, 形成生物活性良好且具有仿生血管和神经效果的3D打印“牙髓复合体”, 为牙髓再生提供新的选择和可能性。

**【Author contributions】** Tan GZ collected the references and wrote the article. Jiang QZ revised and guided the writing of the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

### 参考文献

- [1] 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.013>.
- [2] Wang C, Huang W, Zhou Y, et al. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds[J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(1):82-91. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.01.004.
- [3] Ni J, Ling H, Zhang S, et al. Three-dimensional printing of metals for biomedical applications[J]. *Mater Today Bio*, 2019, 3: 100024. doi: 10.1016/j.mtbio.2019.100024.
- [4] Shirazi AG, Kamlow MA, Norton IT, et al. How to formulate for structure and texture *via* medium of additive manufacturing--a review[J]. *Foods*, 2020, 9(4): 497. doi: 10.3390/foods9040497.
- [5] Hsiao D, Hsu SH, Chen RS, et al. Characterization of designed directional polylactic acid 3D scaffolds for neural differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *J Formos Med Assoc*, 2020, 119(1Pt2): 268-275. doi: 10.1016/j.jfma.2019.05.011.
- [6] Han J, Kim DS, Jang H, et al. Bioprinting of three-dimensional dentin-pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *J Tissue Eng*, 2019, 10: 2041731419845849. doi: 10.1177/2041731419845849.
- [7] Hu Y, Wu Y, Gou Z, et al. 3D-engineering of cellularized conduits for peripheral nerve regeneration[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32184. doi: 10.1038/srep32184.
- [8] Ma Y, Xie L, Yang B, et al. Three-dimensional printing biotechnology for the regeneration of the tooth and tooth-supporting tissues [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2019, 116(2): 452 - 468. doi:10.1002/bit.26882.
- [9] Amrollahi P, Shah B, Seifi A, et al. Recent advancements in regenerative dentistry: a review[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 69:1383 - 1390. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.045>.
- [10] Yu H, Zhang X, Song W, et al. Effects of 3-dimensional bioprinting alginate/gelatin hydrogel scaffold extract on proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *J Endod*, 2019, 45(6): 706-715. doi: 10.1016/j.joen.2019.03.004.
- [11] Chrepa V, Austah O, Diogenes A. Evaluation of a commercially-available hyaluronic acid hydrogel (restylane) as injectable scaffold for dental pulp regeneration: an *in vitro* evaluation[J]. *J Endod*, 2017, 43(2): 257-262. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.026.
- [12] Chang B, Ahuja N, Ma C, et al. Injectable scaffolds: preparation and application in dental and craniofacial regeneration[J]. *Mater Sci Eng*, 2017, 111: 1-26. doi: 10.1016/j.mser.2016.11.001.
- [13] Monteiro N, Smith EE, Angstadt S, et al. Dental cell sheet biomimetic tooth bud model[J]. *Biomaterials*, 2016, 106:167-179. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.024.
- [14] Smith EE, Zhang W, Schiele NR, et al. Developing a biomimetic tooth bud model[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(12):3326-3336. doi: 10.1002/term.2246.
- [15] Li X, Ma C, Xie X, et al. Pulp regeneration in a full-length human tooth root using a hierarchical nanofibrous microsphere system[J]. *Acta Biomater*, 2016, 35: 57-67. doi: 10.1016/j.actbio.2016.02.040.
- [16] Tao O, Wu DT, Pham HM, et al. Nanomaterials in craniofacial tissue regeneration: a review[J]. *Appl Sci*, 2019, 9(2): 317. doi: 10.3390/app9020317.
- [17] Hilken P, Bronckaers A, Ratajczak J, et al. The angiogenic potential of DPSCs and SCAPs in an *in vivo* model of dental pulp regeneration[J]. *Stem Cells Int*, 2017: 2582080. doi: 10.1155/2017/2582080.
- [18] Ho CC, Fang HY, Wang B, et al. The effects of biodegradable polycaprolactone three-dimensional-scaffold with odontogenesis properties on human dental pulp cells[J]. *Int Endod J*, 2018, 51(Suppl4): e291-e300. doi: 10.1111/iej.12799.
- [19] Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, et al. Chitosan biomaterials application in dentistry[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 956-974. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.211.
- [20] Park JH, GJ G, Copus JS, et al. The effect of BMP-mimetic peptide tethering bioinks on the differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs) in 3D bioprinted dental constructs[J]. *Biofabrication*, 2020, 12(3): 035029. doi: 10.1088/1758-5090/ab9492.
- [21] Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, et al. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure[J]. *J Endod*, 2011, 37(2): 133 - 138. doi: 10.1016/j.joen.2010.10.009.
- [22] Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, et al. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bio-root engineering[J]. *J Endod*, 2008, 34(6): 645-651. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.001.
- [23] Athirasala A, Tahayeri A, Thirivikraman G, et al. A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry[J]. *Biofabrication*, 2018, 10(2): 024101. doi: 10.1088/1758-5090/aa9b4e.
- [24] Rosa V, Zhang Z, Grande RH, et al. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(11): 970-975. doi: 10.1177/0022034513505772.
- [25] Ahmed GM, Abouauf EA, Abubakr N, et al. Tissue engineering approaches for enamel, dentin, and pulp regeneration: an update[J].

- Stem Cells Int, 2020: 5734539. doi: 10.1155/2020/5734539.
- [26] Zein N, Harmouch E, Lutz JC, et al. Polymer-based instructive scaffolds for endodontic regeneration[J]. Materials (Basel), 2019, 12(15): 2347. doi: 10.3390/ma12152347.
- [27] Paryani K, Kim SG. Regenerative endodontic treatment of permanent teeth after completion of root development: a report of 2 cases [J]. J Endod. 2013, 39(7): 929 - 934. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.029.
- [28] Mu X, Shi L, Pan S, et al. A Customized self-assembling peptide hydrogel-wrapped stem cell factor targeting pulp regeneration rich in vascular-like structures[J]. ACS Omega, 2020, 5: 16568-16574. doi: 10.1021/acsomega.0c01266.
- [29] 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 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathways[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40161. doi: 10.1038/srep40161.
- [30] El Ashiry EA, Alamoudi NM, El Ashiry MK, et al. Tissue engineering of necrotic dental pulp of immature teeth with apical periodontitis in dogs: radiographic and histological evaluation[J]. J Clin Pediatr Dent, 2018, 42(5): 373-382. doi: 10.17796/1053-4625-42.5.9.
- [31] Huang KH, Chen YW, Wang CY, et al. Enhanced capability of bone morphogenetic protein 2-loaded mesoporous calcium silicate scaffolds to induce odontogenic differentiation of human dental pulp cells[J]. J Endod, 2018, 44(11): 1677-1685. doi: 10.1016/j.joen.2018.08.008.
- [32] Obregon F, Vaquette C, Ivanovski S, et al. Three-dimensional bio-printing for regenerative dentistry and craniofacial tissue engineering[J]. J Dent Res, 2015, 94(Suppl9): 143S-152S. doi: 10.1177/0022034515588885.

(编辑 张琳)



官网



公众号

· 短讯 ·

## 《口腔疾病防治》杂志入选 RCCSE 中国核心学术期刊

由广东省卫生健康委员会主管,南方医科大学口腔医院、广东省牙病防治指导中心主办的《口腔疾病防治》杂志在2020年推出的《中国学术期刊评价研究报告》(第6版)中被评为“RCCSE中国核心学术期刊(A-)”。

在此,编辑部谨向全体编委、审稿专家、广大读者和作者表示衷心的感谢!希望大家一如既往地关心、支持杂志的发展,并提出宝贵的意见与建议。

《口腔疾病防治》编辑部