

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2020.03.012

• 综述 •

促进再生牙髓血管化的支架研究进展

刘慧敏, 李祥伟

吉林大学口腔医学院牙体牙髓科, 吉林 长春(130021)

【摘要】 牙髓再生是牙体牙髓领域的研究热点,再生牙髓血运重建是牙髓再生的瓶颈,而所应用的支架材料又是血运重建的关键,本文对促进再生牙髓血运重建的支架材料作一综述。文献复习结果表明,牙髓血运重建所用支架材料的来源不同,主要有天然、人工合成和复合材料等。应用于血管再生的天然支架材料包括壳聚糖、透明质酸、细菌纤维素、原花青素等;人工合成支架材料包括水凝胶、冷冻凝胶、电纺丝等。具有双层管状结构的仿生复合支架系统具有低免疫原性和良好的生物相容性。适合根管形态的仿生细胞外基质的支架材料如可注射水凝胶/微球的研究推动了牙髓再生研究的发展,即根管内分布均匀的支架材料促进了牙髓样组织的生成;但新生的牙髓组织是否能够通过根尖孔建立有效的血液循环仍是一个巨大挑战。

【关键词】 牙髓血管; 牙髓再生; 血管化; 组织工程; 支架材料; 壳聚糖; 可注射水凝胶/微球; 仿生支架

【中图分类号】 R782.6 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2020)03-0200-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 刘慧敏,李祥伟.促进再生牙髓血管化的支架研究进展[J].口腔疾病防治,2020,28(3):200-204.

Research progress of scaffolds for promoting the vascularization of regenerated dental pulp LIU Huimin, LI Xiangwei. Department of Conservative Dentistry and Endodontics, School and Hospital of Stomatology, Jilin University, Jilin 130021, China

Corresponding author: LI Xiangwei, Email: lixiangwei@126.com, Tel: 86-431-88796017

【Abstract】 Endothelial regeneration is a research hotspot in the field of dental pulp. The regeneration of endodontic blood flow is the bottleneck of dental pulp regeneration, and the applied scaffold material is the key to revascularization. Stent materials were reviewed. The literature review results show that, depending on the source of the stent material used for endodontic revascularization, there are mainly natural, synthetic and composite materials. The natural scaffold materials used for vascular regeneration include chitosan, hyaluronic acid, bacterial cellulose, and proanthocyanidin; artificial scaffold materials include hydrogel, cryogel, and electrospinning. The bionic composite scaffold system with a double-layer tubular structure is low immunogenicity and good biocompatibility. Studies on the scaffold materials of bionic extracellular matrix, such as injectable hydrogels/microspheres, have promoted the development of dental pulp regeneration, that is, uniformly distributed scaffold materials in the root canal promote the generation of pulp-like tissue; Whether dental pulp tissue can establish effective blood circulation through the apical foramen remains a great challenge.

【Key words】 dental pulp vascular; dental pulp regeneration; vascularization; tissue engineering; scaffold material; Chitosan; injectable hydrogels/microspheres; biomimetic scaffolds

J Prev Treat Stomatol Dis, 2020, 28(3): 200-204.

【收稿日期】 2018-11-19; **【修回日期】** 2019-11-22

【基金项目】 吉林省卫健委科研项目(No.2017J065,2018J112);吉林省教育厅研究项目(No.JJKH20180229KJ);吉林省科技发展计划项目(20140204018SF)

【作者简介】 刘慧敏,住院医师,硕士,Email: aimeehuimin@163.com

【通信作者】 李祥伟,主任医师,博士,Email: lixiangwei@126.com, Tel: 86-431-88796017

牙髓再生是牙体牙髓领域的研究热点,再生牙髓血运重建是牙髓再生的瓶颈,而所应用的支架材料又是血运重建的关键。本文对促进再生牙髓血运重建所应用支架材料的种类、优点及不足等进行综述,为牙髓再生筛选适合根管解剖特点、容易获取和应用、生物相容性良好且生物降解率与组织的生成相协调的促进牙髓组织血运重建的支架提供依据。

1 牙髓组织血液供应的特点

牙齿由硬组织(釉质、牙本质和牙骨质)和具有高度血管化并有神经支配的疏松的结缔软组织(牙髓)组成。牙髓是一种具有高度再生能力的充分血管化的结缔组织,这得益于其独特的血液供应及祖细胞或未分化间充质细胞的存在^[1]。血管与丰富的感觉神经和交感神经一起通过根尖孔进入髓腔,在成牙本质细胞层下形成致密的毛细血管网和神经丛,以满足临近成牙本质细胞层和多细胞层内细胞的功能需求^[2],这有益于维持牙髓的稳态。

牙髓与牙本质在胚胎发生上联系很密切,对外界刺激的应答具有互联的效应,是一个整体,被称为牙髓-牙本质复合体。牙本质-牙髓复合体能够修复因龋、磨耗和窝洞预备等引起的牙体组织损伤,表现为第三期牙本质的形成,即当发生低度炎症时,成牙本质细胞通过血管新生和牙本质生成途径促进再生机制,提高牙髓防御能力,形成反应性牙本质^[3]。如果成牙本质细胞死亡,牙髓间充质细胞取代它们分化为成牙细胞样细胞,形成修复性牙本质,这些过程均需要牙髓充分的血液供应作为必要前提^[4]。因此,牙髓良好的血液供应是牙髓-牙本质复合体发挥生理功能的基础。

在牙髓再生中,血管生成是牙髓牙本质复合体发育和再生的基础,通过狭窄的根尖孔尺度建立充分、有效的血液循环是研究者面临的巨大挑战之一^[5]。

2 牙髓再生中促进血管化的支架材料和结构

在再生医学中应用的功能材料应具有良好的生物相容性和生物学活性,以便为种子细胞附着和在生长因子作用下的细胞分化营造适宜的微环境。由于根管解剖条件的限制和根管环境的特殊性,牙髓组织再生中所应用的支架在组织再生中具有关键作用,支架材料应当可生物降解,允许细

胞附着其表面,促进细胞增殖和分化,并且能够承受一定的机械压力,同时植入物也应该能方便地植入根管内,并能够避免植入物发生松动和其他不良反应^[6]。根据支架材料的来源不同,主要有天然、人工合成和复合材料等。

2.1 应用于血管再生的天然支架材料

2.1.1 壳聚糖 壳聚糖(chitosan, CS)是天然高分子化合物,是甲壳素脱乙酰基的衍生物,是世界上仅次于纤维素的第二大类多糖材料^[7]。甲壳素因溶解性能差而应用受限,壳聚糖的水溶性依赖于pH值,允许在温和的条件下加工,这使该材料具有广阔的应用前景^[8]。壳聚糖具有可生物降解性和生物相容性,无毒且具有抗菌和黏附性能^[7],是组织支架所必需的一种独特性能的聚合物,且其降解的产物是一种无毒的低聚糖,可以被排除或结合到糖胺聚糖或糖蛋白中^[9]。壳聚糖是唯一一种带有正电荷的多糖,正电荷数量增加,细胞与壳聚糖相互作用增加,生物相容性也会改善^[8]。由于壳聚糖与细胞外基质中糖胺聚糖的结构类似,故用于血管工程的研究^[10]。

2.1.2 透明质酸 透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种天然的普遍存在于身体各部位的糖胺聚糖,在天然组织中控制着细胞增殖、分化和运动^[11]。HA在正常组织中起许多作用,包括炎症发生、血管生成、肿瘤发生、水稳态和细胞外基质的粘弹性改变,HA的理化性质(如溶解性)及活性官能团有助于对HA进行化学修饰,使其成为适用于组织再生的生物相容材料^[12]。HA具有非免疫原性、非抗原性、生物相容性与生物学活性^[13]。与其他聚合物相比,它具有较强的保水能力,吸水量达到自身体积的千倍^[7]。有研究证明,透明质酸在其保水能力、为细胞提供营养及清除细胞中的废物等重要生物学活动中发挥重要作用^[7]。在血管发育中,透明质酸通过调节细胞增殖和迁移发挥重要作用。有研究表明,使用HA水凝胶来监测新生血管网形成所需的细胞重塑,HA水凝胶诱导血管内皮细胞集落形成液泡和管腔,以及血管的分支和发芽,逐步形成血管网络^[14]。HA支架也具有一些局限性,如引起异物反应和炎症反应等,造成HA支架表面物理和化学性质的变化,其中,非特异性蛋白吸附可能是引起异物反应的主要原因;同时HA或HA降解产物的异常积聚可对中枢神经系统损伤修复产生负面影响^[12]。

2.1.3 细菌纤维素 细菌纤维素(bacterial cellu-

lose, BC)是一种由细菌产生的新型生物相容性纳米材料^[15],比植物纤维素具有更优良的理化特性,具有结晶度、纯度高、黏附性好、可塑性好和保水能力强以及生物亲和性优异等特点^[16]。由于人体中没有可以分解细菌纤维素的酶或强酸微环境,故不需要担心细菌纤维素的降解以及其它化学衍生聚合物形成的问题。其优异的性能使细菌纤维素成为一种制备人造血管的组织工程材料。细菌纤维素管具有精细的纳米纤维结构、优良的机械性能和高热稳定性,对体内环境有很强的适应性,故在组织工程领域细菌纤维素管作为血管管状支架材料具有广阔的应用前景^[17]。细菌纤维素管具有很好的手术实用性,可以用标准方法消毒,在大鼠、猪和绵羊等动物的体内实验研究中,细菌纤维素管成功地替代了其颈动脉^[16]。在具有内径<8 mm的有机硅管中培养细菌纤维素,获得了所需长度、内径、厚度和单轴取向纤维的管状细菌纤维素凝胶,其具有优异的机械性能,在医学和药物应用中有望用作微血管或软组织材料^[18]。

2.1.4 原花青素 原花青素(Proanthocyanidins, PACs)是植物源的多功能化合物,与细胞外基质成分具有高度的相互作用。PAC二聚体、三聚体和四聚体不仅具有生物相容性,而且还增强了牙髓细胞向有利于生物矿化的表型分化;富含PACs的精制混合物可以作为可再生的、非细胞毒性的药剂,增加生物材料的机械性能,作为生物材料而应用于再生领域;低聚PACs不仅能与牙髓细胞生物相容,而且还能促进该细胞群的增殖,这一点可以通过分化、牙本质生成和生物矿化的关键基因的上调来体现;这些对于评价低聚PACs作为有效的组织修复和再生生物材料具有重要意义^[19]。

2.2 应用于血管再生的合成支架材料

2.2.1 水凝胶 水凝胶(hydrogel)作为药物传递系统或细胞三维培养支架广泛应用于生物医学领域,水凝胶被定义为由亲水性大分子组成的三维系统,其交联可导致水合聚合物网络的形成^[11],它们具有高度的生物相容性、高含水量、多种可调特性、细胞相容性及细胞黏附位点,是支持细胞命运的三维微环境^[20]。凝胶化与生物降解是影响细胞的关键因素^[21]。

HA和 α 弹性蛋白的共聚物——HA-EDA-g- α -elastin/HA水凝胶对于人脐静脉血管内皮细胞的粘附和增殖是最佳基质,该凝胶能吸收大量的水介质,抓住血管内皮生长因子并控制其释放,释放的

生长因子可以刺激人脐静脉血管内皮细胞的存活和迁移^[11]。同时水凝胶在体内有可能降解,HAase酶促降解产物(HA片段),小片段的HA可通过CD44和RHAAM受体介导的一系列事件与内皮细胞相互作用^[11],和/或通过诱导粘着斑激酶(Focal adhesion kinase, FAK)和有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路刺激内皮细胞的粘附、增殖和迁移,以及促进人脐静脉血管内皮细胞的增殖及新血管的生成^[12]。水凝胶通常表现出与软组织类似的非线性应力应变反应以及存在固有的强度和刚度的限制,这妨碍了它们在某些应用中的适用性^[22]。

壳聚糖/明胶复合物具有与糖胺聚糖和胶原蛋白相似的结构,可以模拟细胞外基质的天然成分,从而为细胞存活提供了合适的环境,凝胶形成机制有很多,其中对于治疗有利的是温敏方法。脂肪干细胞分泌多种血管生成生长因子,在利用脂肪干细胞治疗缺血性疾病的研究中,壳聚糖/明胶温敏水凝胶不仅为维持脂肪干细胞的存活提供合适的微环境,而且能够使脂肪干细胞持续释放生长因子促进组织血管的形成,从而在治疗缺血性疾病中显示出巨大的临床潜力^[23]。温敏水凝胶形态可控,可便于将支架材料导入根管,制备出适合根管形态的支架,这推动了牙髓再生的研究。有研究者利用纤维素纳米晶体以及富含血小板的裂解液进行对注射用HA水凝胶进行改进以增强趋化性和促血管生成活性,促进血管化损伤组织的再生;改进后的可注射用HA水凝胶在体外模型及离体模型实验中,可以招募牙源性干细胞和促进新血管样结构的形成^[24]。也有研究者将载VEGF的胶原凝胶液注入空根管模型中,异位移植于裸鼠皮下,3周后组织学观察可见血管化组织的形成^[25]。

2.2.2 冷冻凝胶 冷冻凝胶(cryogel)是克服水凝胶在使用上的一些限制而寻找新的材料;冷冻凝胶是指在零度以下从可聚合前体的冷冻溶液得到的凝胶基质。冷冻凝胶的形成可描述为:冰晶体相分离,交联和通过冰晶体的溶解形成相互连接的多孔网络。以戊二醛为交联剂,以壳聚糖和HA为原料,采用冷冻凝胶技术制备了天然冷冻凝胶支架,聚合物冷冻凝胶具有90%~95%的多孔结构,孔隙度150~200 μm ;表现出可生物降解的性质和迅速膨胀的行为;通过HA的共聚和共聚,提高了膨胀比、柔性和耐久性。在体外细胞实验中,

这些冷冻凝胶适合于3T3成纤维细胞和SAOS-2细胞的发育;MTT法检测显示,HA促进3T3成纤维细胞和SAOS-2细胞的增殖;同时高孔隙率的网络结构有助于3T3成纤维细胞和SAOS-2细胞的粘附和扩散;壳聚糖-HA冷冻凝胶支架的经过进一步的体外和体内研究后,有望应用于组织工程^[7]。

另有研究者采用冻干法制备了以壳聚糖、胶原蛋白、HA为主,辅以纳米羟基磷灰石的支架材料。细胞培养研究表明,在富含羟基磷灰石的情况下,支架表面的细胞附着和生长得到改善,而体内植入兔皮下组织植入6个月后,该支架对周围组织无刺激和炎症等反应^[6]。

2.2.3 静电纺丝 静电纺丝(electrospinning, ESP)技术可以产生与各种组织细胞外基质中胶原纤维形态相似的纤维结构,也可以控制纤维的排列;同时,大多数的静电纺丝都是平的或管状结构,由厚度有限的密集排列的纤维组成,具有很好的强度,但不表现出血管组织的非线性“J形”应力-应变效应;血管移植和组织工程血管的依从性使其在体内长期具有功能;以水凝胶和电纺纤维结合制备的血管支架材料,具有自然血管在平均压力范围内的顺应性特征^[22]。通过静电纺丝技术制备的壳聚糖纤维具有较好的生物相容性,有助于细胞黏附、保持细胞形态和活力^[8]。

2.2.4 微球 Garzon等^[26]检测了两种不同表面(纳米纤维或光滑表面)的具有生物活性的可注射用聚-A-乳酸微球的生物相容、生物安全性以及根管内牙髓再生的能力。Li等^[27]合成了载VEGF的L-聚乳酸-肝素-明胶纳米纤维微球,并将其作为支架材料,牙髓干细胞作为种子细胞,进行牙根异位移植牙髓全长再生的研究中,在长为11 mm的空牙根根管模型中,可见有9 mm的牙髓样组织的形成。

2.3 应用于牙髓再生的仿生复合支架系统

有研究者将自体血管细胞与可生物降解管状支架结合,创造出一种血管替代物,植入自体血管细胞的双层血管支架可以产生完全细胞化的血管结构,可以替代小直径血管,带细胞的血管结构保持了高度的移植通透性、结构完整性和顺应性以及收缩性,血管支架具有生物降解性和生物稳定性,羊动脉模型实验研究发现,6个月内不会引起异物反应,其长期疗效还需进一步观察^[28]。自体血管细胞的应用减少了免疫排斥反应,具有较好的生物相容性。一种具有双层管状结构的壳聚

糖-明胶大孔水凝胶骨架也有助于血管支架的研究发展,外层模拟血管三维基质可促进细胞粘附和增殖,同时具有良好的抗拉强度、生物相容性和可生物降解性,该类支架有望成为血管组织工程很好的管状原型^[29]。

参考文献

- [1] Saghir MA, Asatourian A, Sorenson CM, et al. Mice dental pulp and periodontal ligament endothelial cells exhibit different proangiogenic properties[J]. *Tissue Cell*, 2018, 50: 31-36.
- [2] Hashemi-Beni B, Khoroushi M, Foroughi MR, et al. Tissue engineering: dentin - pulp complex regeneration approaches (A review) [J]. *Tissue Cell*, 2017, 49(5): 552-564.
- [3] Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, et al. The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity[J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2018, 54(3): 105-117.
- [4] Saito K, Ida-Yonemochi H, Ushiki T, et al. Responses of pulp vasculature after cavity preparation in rat molars[J]. *J Oral Biosci*, 2015, 57(3): 157-164.
- [5] Xian X, Gong Q, Li C, et al. Exosomes with highly angiogenic potential for possible use in pulp regeneration[J]. *J Endod*, 2018, 44(5): 751-758.
- [6] Kaczmarek B, Sionkowska A, Golynska M, et al. *In vivo* study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118(Pt A): 938-944.
- [7] Kutlusoy T, Oktay B, Apohan NK, et al. Chitosan-co-hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 103: 366-378.
- [8] Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering[J]. *Eur Polym J*, 2013, 49(4): 780-792.
- [9] Pella MCG, Lima-Tenorio MK, Tenorio-Neto ET, et al. Chitosan-based hydrogels: from preparation to biomedical applications[J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 196(15): 233-245.
- [10] Ahsan SM, Thomas M, Reddy KK, et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 110: 97-109.
- [11] Fiorica C, Palumbo FS, Pitarresi G, et al. Hyaluronic acid and α -elastin based hydrogel for three dimensional culture of vascular endothelial cells[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2018, 46: 28-33.
- [12] Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, et al. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 917-928.
- [13] Walimbe T, Panitch A, Sivasankar PM. A Review of hyaluronic acid and hyaluronic acid-based hydrogels for vocal fold tissue engineering[J]. *J Voice*, 2017, 31(4): 416-423.
- [14] Hanjaya-Putra D, Wong KT, Hirotsu K, et al. Spatial control of cell-mediated degradation to regulate vasculogenesis and angiogenesis in hyaluronan hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6123-6131.
- [15] Stumpf TR, Yang X, Zhang J, et al. *In situ* and *ex situ* modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering

- [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 82: 372-383.
- [16] de Oliveira Barud HG, da Silva RR, da Silva Barud H, et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: bacterial cellulose[J]. Carbohydr Polym, 2016, 153: 406-420.
- [17] Zang S, Zhang R, Chen H, et al. Investigation on artificial blood vessels prepared from bacterial cellulose[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015, 46: 111-117.
- [18] Putra A, Kakugo A, Furukawa H, et al. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface[J]. Polymer, 2008, 49(7): 1885-1891.
- [19] Kulakowski D, Leme-Kraus AA, Nam JW, et al. Oligomeric proanthocyanidins released from dentin induce regenerative dental pulp cell response[J]. Acta Biomater, 2017, 55: 262-270.
- [20] Song HH, Park KM, Gerecht S. Hydrogels to model 3D *in vitro* microenvironment of tumor vascularization[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2014, 79-80: 19-29.
- [21] Hamed H, Moradi S, Hudson SM, et al. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: a review[J]. Carbohydr Polym, 2018, 199: 445-460.
- [22] Liu Y, Zahedmanesh H, Lally C, et al. Compliance properties of a composite electrospun fibre-hydrogel blood vessel scaffold[J]. Mater Lett, 2016, 178: 296-299.
- [23] Cheng NC, Lin WJ, Ling TY, et al. Sustained release of adipose-derived stem cells by thermosensitive chitosan/gelatin hydrogel for therapeutic angiogenesis[J]. Acta Biomater, 2017, 51: 258-267.
- [24] Silva CR, Babo PS, Gulino M, et al. Injectable and tunable hyaluronic acid hydrogels releasing chemotactic and angiogenic growth factors for endodontic regeneration[J]. Acta biomaterialia, 2018, 77(1): 155-171.
- [25] Matsuura T, Sugimoto K, Kawata-Matsuura VKS, et al. Cell migration capability of vascular endothelial growth factor into the root apex of a root canal model *in vivo*[J]. J Oral Sci, 2018, 60(4): 634-637.
- [26] Garzon I, Martin-Piedra MA, Carriel V, et al. Bioactive injectable aggregates with nanofibrous microspheres and human dental pulp stem cells: a translational strategy in dental endodontics[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(1): 204-216.
- [27] 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 biomaterialia, 2016, 35(15): 57-67.
- [28] Ju YM, Ahn H, Arenas-Herrera J, et al. Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels: a preclinical large animal study[J]. Acta Biomater, 2017, 59: 58-67.
- [29] Badhe RV, Bijukumar D, Chejara DR, et al. A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering[J]. Carbohydr Polym, 2017, 157: 1215-1225.

(编辑 张琳)



官网



公众号

• 短讯 •

热烈祝贺《口腔疾病防治》杂志被世界著名检索系统 DOAJ 收录

本刊编辑部于2019年5月16日收到The DOAJ Team的邮件正式通知《口腔疾病防治》杂志已被DOAJ收录。

DOAJ(Directory of Open Access Journals)为全球最具影响力的开放获取期刊数据库之一,由瑞典Lund大学于2003年创建,该系统对期刊遴选和收录的标准高、要求严;收录期刊的文章均经过严格的同行评议或评审,质量高并与期刊同步免费下载全文,在学术研究方面有极高的参考价值。目前,DOAJ已收录全世界130个国家13 280种期刊,涵盖自然科学和社会科学各个领域。截止2017年12月31日,我国被DOAJ收录的期刊为121种,其中大陆71种,香港地区20种,台湾地区30种。

《口腔疾病防治》杂志被DOAJ收录,将进一步提高本刊的国际影响力,促进本刊国际化发展。

南方医科大学口腔医院《口腔疾病防治》编辑部