

新型培养基促进牙乳头细胞成骨分化及其在牙周骨组织再生中的应用*

王涛^{1,2,3}, 王世恺^{1,2,3}, 陈国庆³, 田卫东^{1,2,3△}

1. 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 四川大学华西口腔医院(成都 610041);

2. 四川大学华西口腔医院 创伤与整形外科(成都 610041);

3. 口腔再生医学国家地方联合工程实验室 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】目的 探讨新型化学成分明确培养基(chemically defined medium, CDM)对牙乳头细胞(dental papilla cells, DPCs)成骨分化潜能及体内牙周骨再生的影响。**方法** 分离大鼠 DPCs, 按培养基不同分为传统培养基(conventional medium, CM)组和CDM组, 分别在CM和新型CDM中培养, 评估两组DPCs细胞表面标记、增殖、迁移、成骨分化潜能; 制备SD大鼠牙周骨缺损模型, CM和CDM两组DPCs分别复合胶原凝胶植入缺损区域内, 评估两组DPCs在牙周骨缺损中的骨再生修复能力。**结果** 在CM和CDM组中, DPCs细胞均显示相似的细胞表面标记; 与CM相比, CDM可促进DPCs增殖、克隆形成及细胞迁移($P<0.05$); 定量PCR显示CDM组DPCs成骨相关基因Runx2、Alp和Opn上调($P<0.05$); 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色显示CDM组DPCs细胞 ALP活性高于CM组($P<0.05$); 细胞经成骨诱导后, 茜素红染色显示CDM组DPCs细胞成骨分化能力高于CM组($P<0.05$)。在大鼠体内牙周骨缺损模型中, 移植CDM组DPCs细胞8周后, HE染色显示缺损区域皮质骨连续的新生骨, 而CM组新生骨较少, 骨皮质仍未愈合, microCT扫描定量分析显示CDM组骨体积分数(BV/TV)高于CM组($P<0.05$)。**结论** CDM培养基可促进DPCs增殖和成骨分化能力, 为未来细胞治疗中干细胞培养基的选择提供了新的方案。

【关键词】 牙周骨再生 化学成分明确培养基 牙乳头细胞 组织工程

A Novel Chemically Defined Medium Enhanced the Osteogenic Potential and Periodontal Bone Regeneration of Dental Papilla Cells WANG Tao^{1,2,3}, WANG Shi-kai^{1,2,3}, CHEN Guo-qing³, TIAN Wei-dong^{1,2,3△}. 1. State Key Laboratory of Oral Disease, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. National Engineering Laboratory for Oral Regenerative Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: drtwd@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the role of a novel chemically defined medium (CDM) in the regulation of dental papilla cells (DPCs) functional phenotype in vitro and periodontal bone regeneration in vivo. **Methods** DPCs were isolated and cultured in conventional medium (CM) or CDM. The surface makers, and the proliferation, migration and osteogenic differentiation abilities of DPCs were evaluated. In vivo, the DPCs that mixed with collagen gel were implanted into the model rats in the defect of periodontal to repair the periodontal tissue. Regeneration of the tissues was examined by microcomputed tomography and histological observation. **Results** DPCs in the CM group and CDM group showed similar surface markers. Compared to the CM group, the CDM significantly enhanced the proliferation, colony-forming efficiency and migration of DPCs in vitro. In addition, real time PCR showed that the expression levels of osteogenesis-related genes, Runx2, Alp and Opn. were significantly enhanced in DPCs in the CDM group. DPCs cells treated with CDM also exhibited higher alkaline phosphatase activity and stronger ability of formation of mineralized nodules in vitro. In vivo, DPCs from CDM group significantly enhanced the periodontal bone regeneration and the reconstruction of periodontal bone tissues in rat periodontal defect model. **Conclusion** CDM is a suitable medium to culture DPCs for periodontal bone regeneration. This research provided a substitute for basic research and set the stage for future clinical application of stem cell transplantation.

【Key words】 Periodontal tissue regeneration Chemically defined medium Dental papilla cells
Tissue engineering

严重牙周炎、外伤、颌骨肿瘤、颌骨髓炎等疾病引

起的牙周骨组织破坏, 常会导致牙齿丧失, 后期由于不同程度的牙槽骨骨量不足, 种植修复困难。很多治疗方法已经应用于牙周骨组织的再生, 包括引导骨组织再生、骨

* 国家重点研发计划(No.2017YFA0104800)资助

△ 通信作者, E-mail: drtwd@sina.com

移植以及使用生物材料和生物活性因子^[1-4]。目前自体骨移植虽然具有良好的临床效果,但也存在供体来源受限、二次手术造成额外创伤等缺陷^[5]。随着干细胞治疗的发展,以干细胞为导向的组织工程技术已应用于牙周骨再生的研究中^[6-7]。牙乳头细胞(dental papilla cells, DPCs)是牙间充质干细胞的一种,来源于发育过程中的牙乳头,体外研究表明DPCs能够分化为成骨细胞、成牙本质细胞、脂肪细胞、软骨细胞和神经细胞等^[8-10]。阻生牙在临床诊疗中常被拔除,因而DPCs的获取较为便利。在以干细胞为导向的牙周骨组织再生研究中,DPCs是一类很有应用前景的种子细胞。然而,在干细胞体外培养过程中,往往伴随着细胞干性丢失、细胞衰老、分化能力降低的发生,限制了在组织再生中的广泛应用^[11]。此外,传统的含血清培养基在细胞培养中仍然具有争议。血清中含有许多生长因子和激素,可以促进细胞黏附和增殖,但也可能因血清来源和批次的差异导致其培养后的细胞的差异,且增加疾病感染风险等^[12-13]。因此,开发新型的成分明确、不含血清、且能够在细胞培养过程中维持细胞干性和分化潜能的培养基,是干细胞治疗及其在组织再生中广泛应用的关键。本项目前期通过多次实验,开发出一种新型的化学成分明确的干细胞培养基;本研究应用该培养基培养DPCs,发现可以促进细胞增殖和干细胞维持,促进细胞成骨分化的能力,其培养的DPCs移植动物体内后,可显著促进骨再生,是一种良好的牙间充质干细胞培养基。现报道如下。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 20只新生SD大鼠和9只8周龄雄性SD大鼠购自成都达硕生物科技有限公司。本研究已通过四川大学动物伦理委员会的伦理审查并备案,实验过程遵循我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35 892 2018)》提出的原则与要求。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清、 α -MEM培养基、基础培养基购自美国Gibco公司; I 型胶原酶、胰蛋白酶、青链霉素混合液、茜素红染色剂、肾上腺素、胰岛素、转铁蛋白、皮质醇、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、维生素C、Y-27632等购自美国Sigma公司; 流式抗体CD31、CD45、CD24、CD29购自美国BD公司; 细胞增殖活性检测CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司; 结晶紫染色液、茜素红染色液购自江苏凯基生物公司; 性别决定

区Y框基因-2(sex-determining region of Y chromosome-box 2, Sox-2)抗体购自英国Abcam公司; 八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, Oct-4)抗体购自上海生工公司; 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒、氯化十六烷基吡啶试剂购自上海碧云天公司; 胶原凝胶购自日本Nitta Gelatin公司; Transwell小室购自美国Corning公司; RNAiso Plus RNA提取试剂及逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司; 体视显微镜、倒置显微镜、激光共聚焦显微镜购自日本Olympus公司; SYBR染料、酶标仪及二氧化碳培养箱购自美国Thermo公司; Eco实时PCR系统购自美国Illumina公司; 流式细胞仪购自美国Beckman公司; μ CT80 microCT系统购自瑞士Scanco Medical公司。

1.2 体外实验

1.2.1 DPCs的培养及鉴定 在无菌的体式显微镜下,分离并收集新生SD大鼠下颌第一磨牙的牙乳头组织,用酶消化法获得DPCs,将单细胞悬液分别接种至两种培养基中。传统培养基(conventional medium, CM)含 α -MEM、10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素; 化学成分明确培养基(chemically defined medium, CDM)由 α -MEM培养基、肾上腺素、胰岛素、转铁蛋白、皮质醇、IGF-1、FGF和EGF组成。待原代细胞融合至80%时,常规传代并扩大培养。取第3代的DPCs用于后续实验。流式细胞术鉴定DPCs表面标记物CD31、CD45、CD24和CD29。

1.2.2 DPCs细胞增殖检测 CM组和CDM组中的DPCs分别以 2×10^3 细胞/孔的密度接种至96孔板。在培养的第1、2、3、4、5天,每孔加CCK-8试剂10 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h后,通过酶标仪测定各孔在450 nm处的吸光度值。

1.2.3 DPCs细胞克隆形成实验(CFU) CM组和CDM组中的DPCs分别以 1×10^3 细胞/孔的密度接种至10 cm直径的培养皿中。细胞在培养7 d之后,采用体积分数为4%多聚甲醛固定,1%结晶紫染色液染色,并在倒置显微镜下观察。超过50个细胞的克隆被计数。

1.2.4 免疫荧光染色检测DPCs细胞Oct4和Sox2表达 实验步骤及分析方法均参考既往文献^[14]。CM组和CDM组中的DPCs分别经体积分数为4%多聚甲醛固定30 min, 0.1% TritonX-100处理10 min, 0.5%牛血清白蛋白(BSA)封闭30 min后,与一抗(Oct4稀释浓度1 : 200, Sox2稀释浓度1 : 200)在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, PBS漂洗后孵育相应二抗,激光共聚焦显微镜下进行观察。

1.2.5 DPCs细胞迁移实验 细胞迁移实验采用Transwell孔板中8 μ m孔径的膜进行检测。100 μ L DPCs悬液以 1.5×10^5 细胞/孔的密度接种至Transwell上室,下室内分别

含600 μL CM和CDM。24 h后, 迁移的细胞经体积分数为4%多聚甲醛固定, 1%结晶紫染色, 在倒置显微镜下随机视野拍照并计数。

1.2.6 DPCs的成骨分化诱导 CM组和CDM组中的DPCs分别以5×10⁴细胞/孔的密度接种至24孔板。待细胞融合至80%左右, 培养基换为自行配制的含10%胎牛血清、10 mmol/L β-甘油磷酸钠、10⁻⁸ mol/L地塞米松、50 μg/mL维生素C和10 nmol/L维生素D₃的成骨诱导培养基。在成骨诱导液培养5 d后, 通过ALP染色试剂盒检测细胞ALP活性; 在成骨诱导液培养4周后, 采用茜素红染色观察矿化结节的形成, 倒置显微镜采集图像。茜素红染色的细胞经PBS漂洗后, 加入100 mmol/L氯化十六烷基吡啶

溶液, 均匀震荡释放其中的钙结合茜素红, 并吸取100 μL溶液至96孔板, 在562 nm光谱下通过酶标仪测定各孔吸光度(A)值, 定量分析细胞矿化结节的形成。

1.2.7 实时定量PCR检测DPCs成骨基因*Alp*、*Runx2*和*Opn*的表达 如前所述, 两组来源的DPCs在成骨诱导培养基中分别培养1 d、2 d和3 d时提取其总RNA。使用RNA提取试剂盒提取总RNA, 逆转录试剂盒转录为cDNA。实时PCR通过SYBR染料和Eco实时PCR系统完成, 反应条件: 95 ℃孵育2 min, 95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s进行40个循环。以β-actin为内参, 采用2^{-ΔΔCt}法定量分析各基因表达水平。PCR引物由生工生物公司(上海)设计并合成, 各引物序列见表1。

表 1 定量PCR引物序
Table 1 Primer sequence used for real-time PCR analysis

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Product length/bp
<i>Alp</i>	CGTTGACTGTGGTTACTGCTGA	CTTCTTGTCGGTGTGCTCAC	113
<i>Runx2</i>	TCATTTGCACTGGGTCACAT	TCTCAGCCATGTTTGTGCTC	142
<i>Opn</i>	AAGCGTGGAACACACAGC	CTTTGGAAGCTCGCCTGACTG	161
β-actin	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	GGCATAGAGGTCTTTACGGATG	155

Alp: Alkaline phosphatase; *Runx2*: Runt-related transcription factor 2; *Opn*: Osteopontin.

1.3 体内实验

1.3.1 DPCs在体内的牙周骨组织再生 9只8周龄雄性SD大鼠随机分为3组: 空白对照组, CM组, CDM组, 每组3只大鼠。大鼠腹腔注射1%戊巴比妥进行麻醉后, 依据文献制备大鼠牙周骨缺损动物模型^[4, 15]。无菌条件下, 切开皮肤, 暴露下颌骨, 翻起咬肌及骨膜。于下颌第一磨牙牙根颊侧的下颌骨通过圆形的牙科钻头备洞, 形成直径约4 mm、深度约1 mm的圆柱形缺损。CM组及CDM组的DPCs细胞与适量的胶原水凝胶混合后, 分别移植充填缺损区域, 而空白对照组中骨缺损以胶原水凝胶充填。在手术后8周, 所有动物经麻醉被处死并获取下颌骨标本, 多聚甲醛固定后用于后续实验。

1.3.2 Micro CT分析 下颌骨标本经microCT(μCT80, Scanco公司, 瑞士)扫描后进行定量分析, microCT扫描设定的分辨率为15 μm (70 kV, 200 μA, 300 ms)。扫描后经三维重建后分析下颌骨缺损区域骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)评价骨缺损区域的再生修复情况。

1.3.3 组织学评估 大鼠下颌骨标本在体积分数4%多聚甲醛中固定24 h, 10%EDTA溶液脱矿6周, 石蜡包埋后制做10 μm组织切片。切片经过HE染色后显微镜观察并采集照片。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牙乳头细胞的培养及鉴定

由图1可见, 两组DPCs均为成纤维细胞样形态。CDM组中的细胞较小, 而CM组中的细胞则更为扁平, 伴有多个突起。流式细胞术显示CM和CDM组中的细胞均较强表达CD24和CD29, 较弱表达CD31和CD45, 且结果未见明显差异, 表明CDM不改变DPCs的细胞谱系。

2.2 两种培养基中DPCs的特性

CCK8实验结果表明, CDM组DPCs细胞增殖能力高于CM组($P < 0.05$)(图2A)。两组细胞均有克隆形成的能力, 但CDM组DPCs细胞的克隆形成效率高于CM组($P < 0.05$)(图2B)。免疫荧光染色显示, 与CM组相比, CDM组的细胞干性因子Oct4和Sox2阳性表达水平明显增高(图2C, 阳性表达为绿色荧光, 蓝色荧光显示细胞核)。Transwell实验显示在CDM中, DPCs迁移能力明显增强($P < 0.05$)(图2D)。

2.3 CDM促进DPCs的体外成骨分化

如图3所示, 定量PCR显示CDM组中DPCs成骨相关

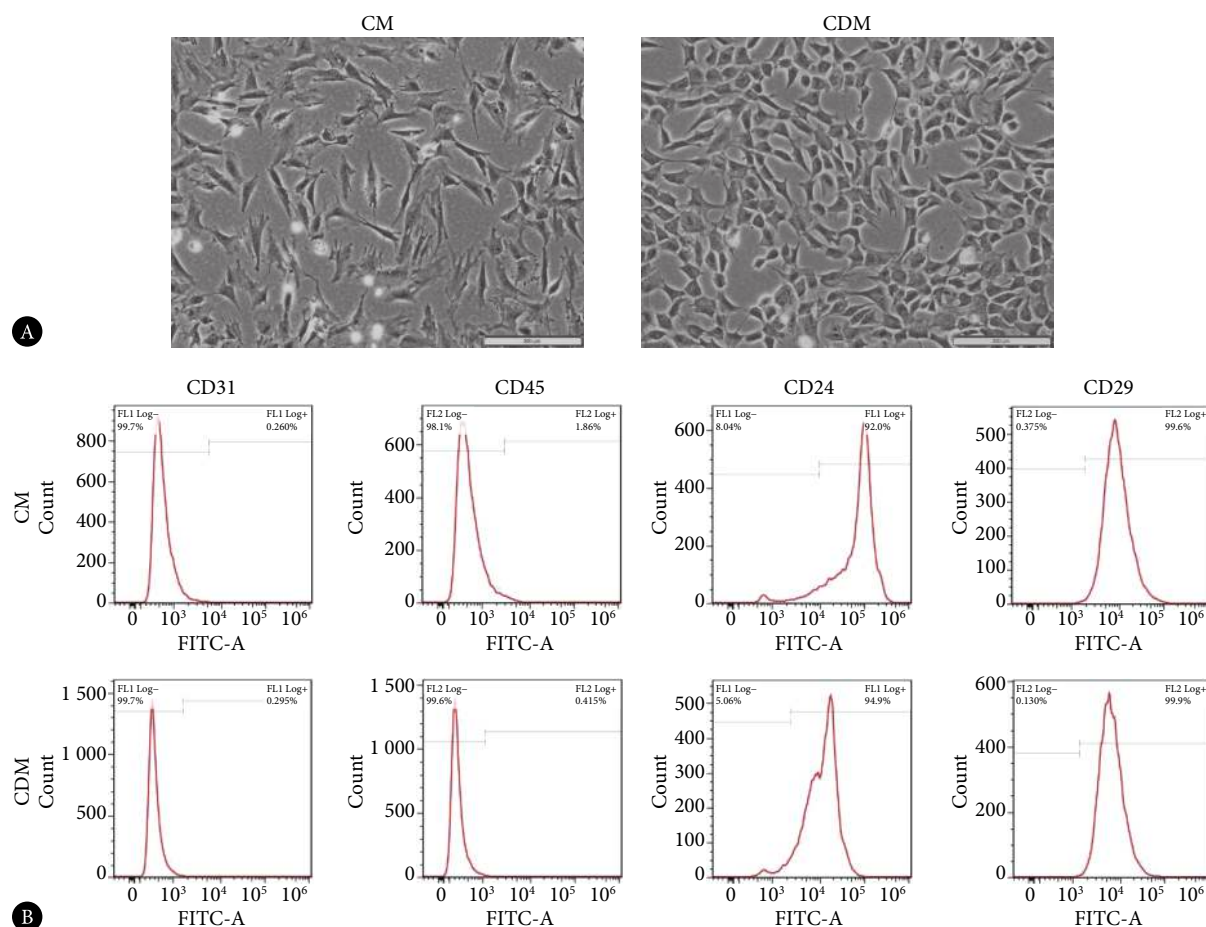


图 1 DPCs的形态及表面标记鉴定

Fig 1 Morphology and surface marker of rat dental papilla cells (DPCs)

A: Cell morphology of DPCs in the CM and CDM groups ($\times 400$); B: Surface markers of DPCs detected by flow cytometry.

基因*Runx2*、*Alp*和*Opn*表达较CM组增加($P < 0.05$)。ALP染色结果显示,与CM组相比,CDM组中DPCs的ALP活性增强;DPCs细胞经成骨诱导后茜素红染色结果也显示,CDM可明显促进DPCs矿化结节形成($P < 0.05$)。综上可知,与CM相比,CDM中的DPCs具有更强的成骨分化能力。

2.4 CDM促进DPCs在体内再生牙周骨组织

如图4所示,在术后8周,microCT扫描显示各组大鼠的骨缺损区域均可见不同程度的骨再生修复。BV/TV定量分析结果显示,与空白对照组($21.22\% \pm 1.59\%$)相比,CM组($45.42\% \pm 0.83\%$)和CDM组($59.81\% \pm 0.16\%$)的BV/TV均增加($P < 0.05$),其中CDM组的骨体积分数高于CM组($P < 0.01$)。组织切片的HE染色结果发现,3组大鼠的下颌骨缺损区域均显示有骨重建,空白对照组和CM组均可见新生骨小梁形成,但其骨皮质仍不连续;而在CDM组中可见排列整齐的骨小梁再生和完整的皮质骨愈合。以上结果提示CDM组中的DPCs具有更强的成骨能力,相较于CM组DPCs,可显著促进牙周骨缺损的再生

修复。

3 讨论

牙周骨缺损的治疗目标是促进牙周骨再生和重建。组织工程技术,包括种子细胞、支架材料及生长因子的结合,是治疗组织缺损修复的重要手段^[16-17]。同时,随着干细胞治疗技术的发展使得以干细胞为基础的组织工程技术在牙周骨再生应用中可行性大大增加^[18-20]。

干细胞具有良好的可塑性以及多向分化潜能,在再生医学中具有很好的应用前景。然而,在体外的分离培养过程中,干细胞会逐渐丧失其干性、自我更新能力及多向分化潜能。传统的含血清培养基培养后的干细胞常导致干细胞的均一性较差,因此,开发成分明确的培养基,用于干细胞体外培养,以期获得预期表型的细胞群体并促进干细胞特定基因的表达,从而提高干细胞应用潜能,是当前再生医学领域亟需解决的难题^[21]。在本研究中,我们评估了一种新的培养基CDM对DPCs功能表型的影响。DPCs来源于发育中的牙乳头组织,具备良好的自我

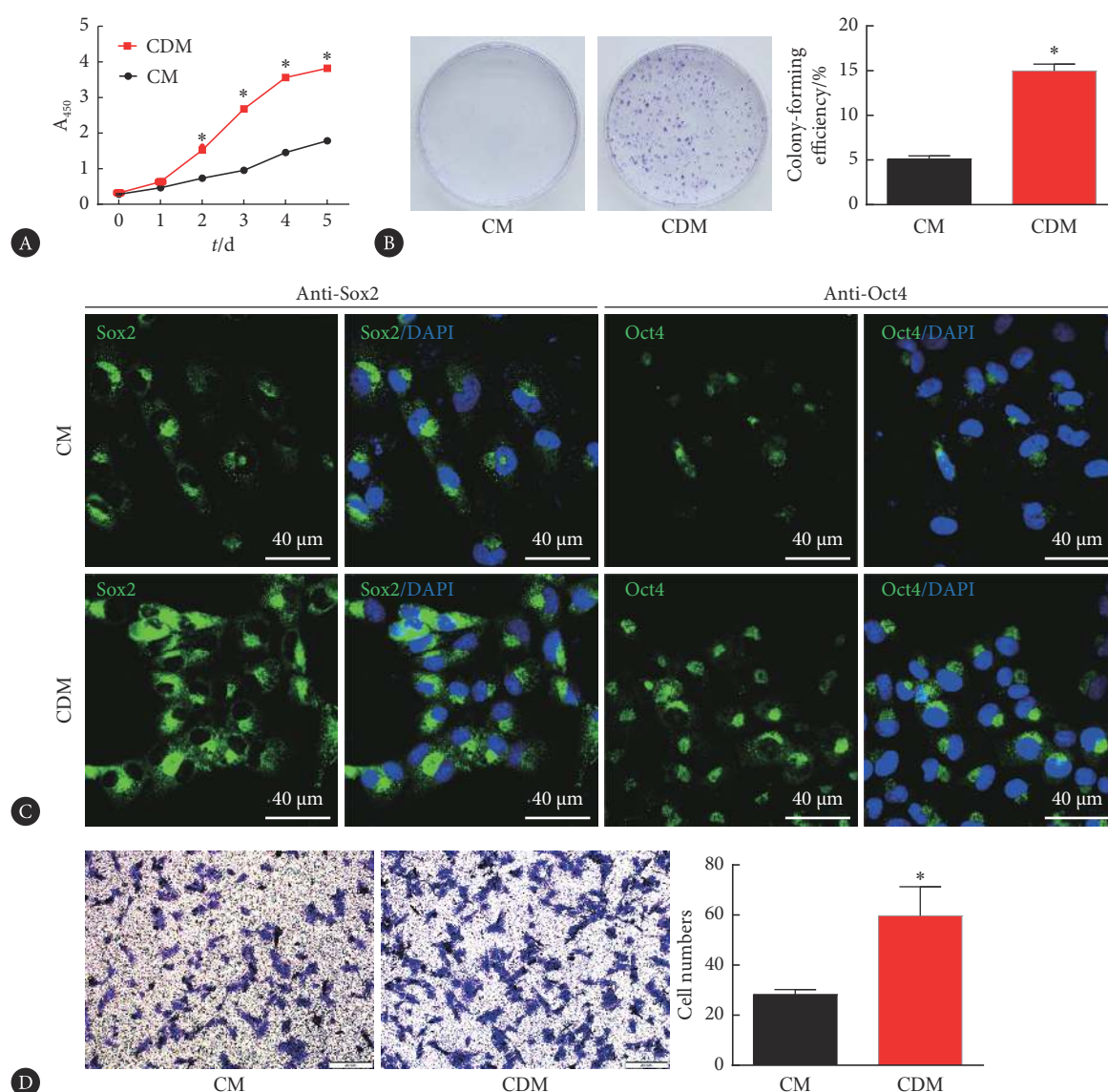


图2 两种培养基中DPCs的特性

Fig 2 Characterization of DPCs

A: Growth curve of DPCs ($n=5$); B: Crystal violet staining and quantitative analysis of colony-forming unit of DPCs (CFU) ($n=3$); C: Immunofluorescence staining of Oct4 and Sox2 in DPCs; D: Cell migration assay and quantitative analysis ($\times 100$, $n=3$). * $P<0.05$, vs. CM.

更新能力及多向分化潜能^[22]。正如结果所示, DPCs在两种培养基中的细胞表面标记较为相似, 表明CDM不改变DPCs的谱系。DPCs在CDM中呈现更小的成纤维细胞形态, 而CM中的DPCs则细胞体积增大, 类似衰老的间充质干细胞形态^[23]。此外, CCK-8实验和克隆形成实验均显示CDM可显著促进细胞增殖。干细胞在每次分裂之后, 其端粒酶就会缩短, 最终促使细胞的逐渐衰老。体外培养过程中的环境因素及不同处理方法可显著影响细胞衰老^[15]。同样, Oct4和Sox2免疫荧光染色表明DPCs在CDM中的干性及自我更新能力得到很好的维持。干细胞在组织再生中的作用取决于其归巢能力和移植至受损区域的迁移能力。细胞迁移能力主要受化学因素(趋化因子、细

胞因子和生长因子等)和物理因素(剪切力、细胞外基质硬度等)的影响^[24]。本实验中CDM可显著促进DPCs的迁移能力, 与CDM内特殊的化学成分密切相关。结合以上结果可知, CDM可作为一种合适的培养基, 可用于高效培养DPCs, 维持细胞的自我更新能力和增殖能力。

牙周骨组织的再生及重建主要依赖于干细胞的增殖及分化能力。成骨细胞的生长发育分为3个阶段: 增殖与基质形成, 成熟和矿化。本研究ALP染色和茜素红染色显示CDM可显著促进DPCs成骨分化。这些结果均提示了DPCs在牙周骨再生中的潜能, 且与以往的研究结果相一致^[25-26]。人DPCs在临床诊疗中易获取, 同时包含着具有类似胚胎干性的高活性干细胞^[27-29]。因此, DPCs可能

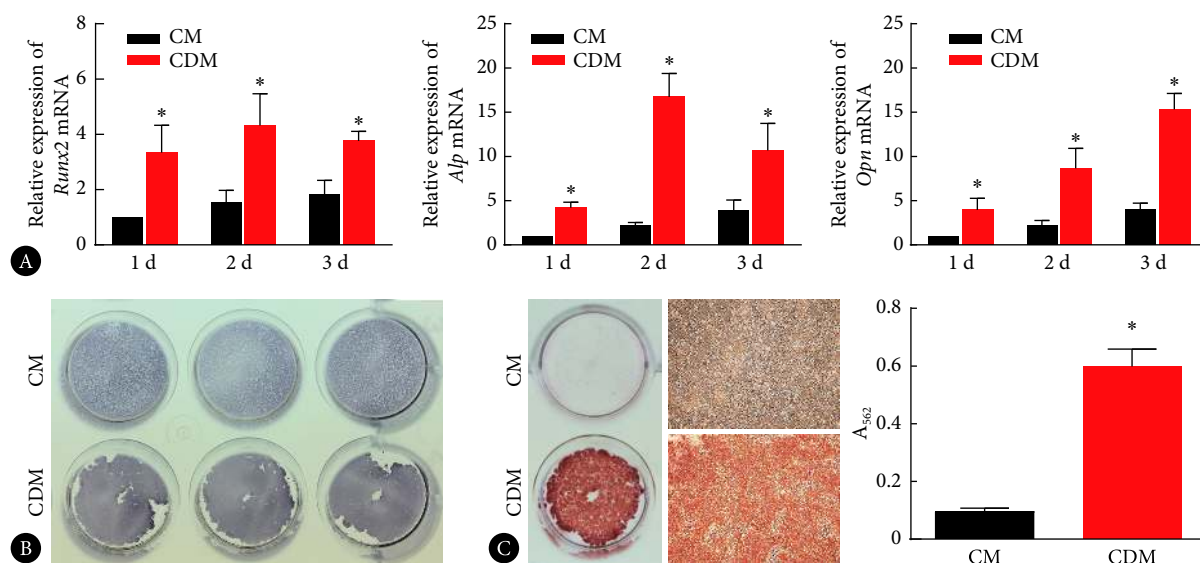


图3 两种培养基中DPCs成骨分化能力比较

Fig 3 Comparison of osteogenic differentiation capability of DPCs cultured in CM and CDM

A: Relative expression of *Runx2*, *Alp* and *Opn* of DPCs cultured in CM and CDM ($n=3$); B: The ALP staining of DPCs cultured in CM and CDM; C: Alizarin Red S staining and quantitative analysis of mineralized bone nodules ($\times 100$, $n=3$). * $P<0.05$, vs. CM.

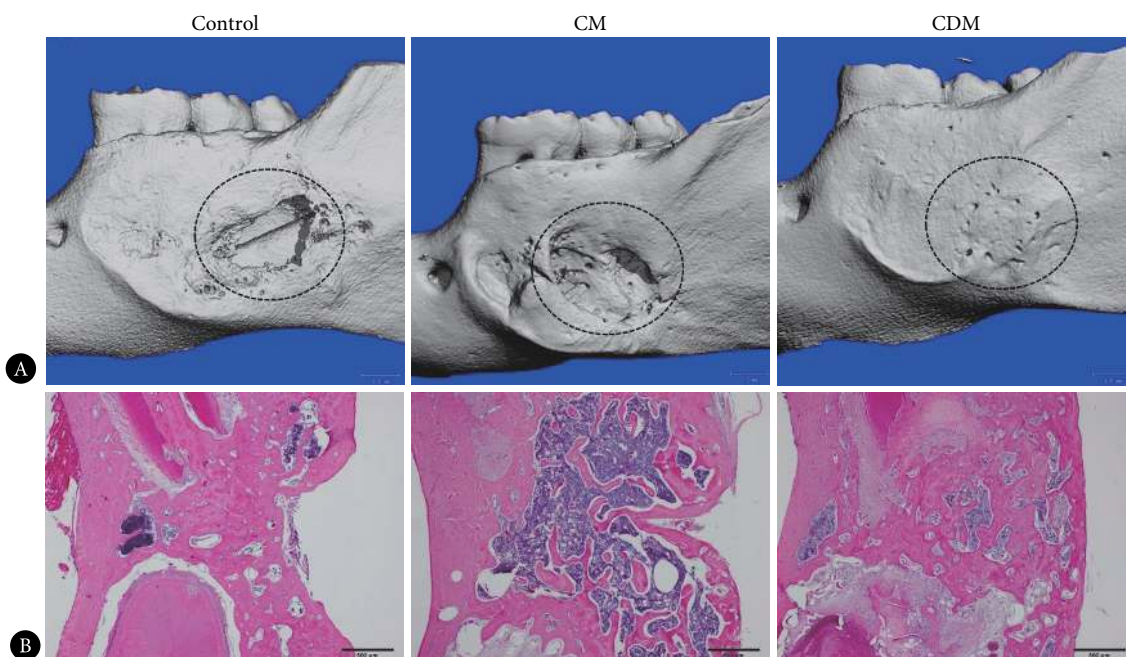


图4 动物体内移植DPCs用于牙周骨缺损的修复

Fig 4 Regeneration of periodontal bone defect by transplantation of DPCs

A: MicroCT analysis the regeneration of periodontal bone defect; B: HE staining showed the new formed bone tissue in bone defect area ($\times 40$).

是牙周骨再生及未来临床应用中较为合适的一类种子细胞。本研究体内实验结果显示,在骨缺损区域移植干细胞术后8周,CDM组中新生骨量较CM组及空白对照组均显著增加,CDM组中可见规则的骨小梁再生和完整的皮质骨形成。这些结果都显示了CDM组中的DPCs具备更强的成骨能力,且可显著促进牙周骨缺损的重建。

总之,本研究采用一种新型培养基CDM并证实其在

体外DPCs培养过程中可促进细胞增殖、迁移和分化潜能,并在动物体内证实其培养的DPCs可显著促进牙周骨组织再生。研究表明新型CDM培养的DPCs移植可作为牙周骨再生的治疗方法,具有良好的临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] CARMAGNOLA D, PELLEGRINI G, DELLAVIA C, *et al.* Tissue

- engineering in periodontology: biological mediators for periodontal regeneration. *Int J Artif Organs*, 2019, 42(5): 241–257.
- [2] KINANE D F, STATHOPOULOU P G, PAPAPANOU P N. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17038[2020-05-20]. <https://www.nature.com/articles/nrdp201738>. doi:10.1038/nrdp.2017.38.
- [3] TAN J, ZHANG M, HAI Z, *et al*. Sustained release of two bioactive factors from supramolecular hydrogel promotes periodontal bone regeneration. *ACS Nano*, 2019, 13(5): 5616–5622.
- [4] SHANG F, LIU S, MING L, *et al*. Human umbilical cord MSCs as new cell sources for promoting periodontal regeneration in inflammatory periodontal defect. *Theranostics*, 2017, 7(18): 4370–4382.
- [5] SUBRAMANIAM S, FANG Y H, SIVASUBRAMANIAN S, *et al*. Hydroxyapatite-calcium sulfate-hyaluronic acid composite encapsulated with collagenase as bone substitute for alveolar bone regeneration. *Biomaterials*, 2016, 74: 99–108.
- [6] BASSIR S H, WISITRASAMEEWONG W, RAANAN J, *et al*. Potential for stem cell-based periodontal therapy. *J Cell Physiol*, 2016, 231(1): 50–61.
- [7] XU X Y, LI X, WANG J, *et al*. Concise review: periodontal tissue regeneration using stem cells: strategies and translational considerations. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(4): 392–403.
- [8] CHEN H, FU H, WU X, *et al*. Regeneration of pulpo-dentinal-like complex by a group of unique multipotent CD24a⁺ stem cells. *Sci Adv*, 2020, 6(15): eaay1514[2020-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7141825/>. doi:10.1126/sciadv.aay1514.
- [9] TZIAFAS D, KODONAS K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*, 2010, 36(5): 781–789.
- [10] YOON H H, MIN J, SHIN N, *et al*. Are human dental papilla-derived stem cell and human brain-derived neural stem cell transplantations suitable for treatment of Parkinson's disease? *Neural Regen Res*, 2013, 8(13): 1190–1200.
- [11] NERI S, BORZÌ R M. Molecular mechanisms contributing to mesenchymal stromal cell aging. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 340[2020-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072652/>. doi:10.3390/biom10020340.
- [12] CIMINO M, PARREIRA P, BIDARRA S J, *et al*. Effect of surface chemistry on hMSC growth under xeno-free conditions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 189: 110836[2020-05-20]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110836>.
- [13] KACHROO U, ZACHARIAH S M, THAMBIAH A, *et al*. Comparison of human platelet lysate versus fetal bovine serum for expansion of human articular cartilage-derived chondroprogenitors. *Cartilage*, 2020:1947603520918635[2020-05-20]. <https://doi.org/10.1177/1947603520918635>.
- [14] GUO S, GUO W, DING Y, *et al*. Comparative study of human dental follicle cell sheets and periodontal ligament cell sheets for periodontal tissue regeneration. *Cell Transplant*, 2013, 22(6): 1061–1073.
- [15] WANG Y J, ZHAO P, SUI B D, *et al*. Resveratrol enhances the functionality and improves the regeneration of mesenchymal stem cell aggregates. *Exp Mol Med*, 2018, 50(6): 1–15.
- [16] YANG X, MA Y, GUO W, *et al*. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth as an alternative cell source in bio-root regeneration. *Theranostics*, 2019, 9(9): 2694–2711.
- [17] XU X, GU Z, CHEN X, *et al*. An injectable and thermosensitive hydrogel: promoting periodontal regeneration by controlled-release of aspirin and erythropoietin. *Acta Biomater*, 2019, 86: 235–246.
- [18] VENKATAIAH V S, HANDA K, NJUGUNA M M, *et al*. Periodontal regeneration by allogeneic transplantation of adipose tissue derived multi-lineage progenitor stem cells *in vivo*. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 921[2020-05-20]. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-37528-0>. doi:10.1038/s41598-018-37528-0.
- [19] IWASAKI K, AKAZAWA K, NAGATA M, *et al*. The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 192[2020-05-20]. <https://doi.org/10.3390/ijms20010192>.
- [20] CHEN F M, GAO L N, TIAN B M, *et al*. Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 33[2020-05-20]. <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0288-1>. doi:10.1186/s13287-016-0288-1.
- [21] TOZETTI P A, CARUSO S R, MIZUKAMI A, *et al*. Expansion strategies for human mesenchymal stromal cells culture under xeno-free conditions. *Biotechnol Prog*, 2017, 33(5): 1358–1367.
- [22] HUANG G T, GRONTHOS S, SHI S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 2009, 88(9): 792–806.
- [23] TURINETTO V, VITALE E, GIACHINO C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1164[2020-05-20]. <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>.
- [24] FU X, LIU G, HALIM A, *et al*. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 2019, 8(8):784[2020-10-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721499/>. doi:10.3390/cells8080784.
- [25] SEO H, KIM J, HWANG J J, *et al*. Regulation of root patterns in mammalian teeth. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12714[2020-05-20]. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-12745-1>. doi:10.1038/s41598-017-12745-1.
- [26] SONOYAMA W, LIU Y, FANG D, *et al*. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 2006, 1(1): e79[2020-05-20]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>.
- [27] SECIU A M, CRACIUNESCU O, STANCIUC A M, *et al*. Tailored biomaterials for therapeutic strategies applied in periodontal tissue engineering. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15): 963–973.
- [28] ZHAI Q, DONG Z, WANG W, *et al*. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med*, 2019, 13(2): 152–159.
- [29] AYDIN S, ŞAHİN F. Stem cells derived from dental tissues. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1144: 123–132.

(2020-02-12收稿, 2020-05-29修回)

编辑 余琳