

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0564-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240233

DMSCs 三维培养方法及其在组织再生和疾病治疗中应用的研究进展

李国鑫, 赵小琳, 李晨曦, 刘影驰, 朱芷墨, 袁 瑶, 安政雯
(吉林大学口腔医院口腔生物学教研室, 吉林 长春 130021)

[摘要] 牙源性间充质干细胞 (DMSCs) 是来源于神经嵴外胚层的间充质干细胞, 具有优越的自我更新和多向分化的能力, 被广泛应用于组织工程和再生医学研究。利用三维培养方法可对 DMSCs 进行大量体外扩增以满足研究和治疗的需要。与传统的二维培养方法比较, 三维培养技术可更有效地模拟干细胞在体内所处的结构和微环境, 从时间和空间上共同调控干细胞的增殖及分化。近年来开展的体外三维培养方法较多, 悬滴培养法操作简单, 但较难控制培养组织的气象环境; 微流控芯片可更好地控制细胞参数, 但成本高昂, 且存在技术平台的难题而难以广泛应用; 磁悬浮培养费用低廉, 操作简便, 细胞成球速度快, 但由于磁化作用难以用来定量分析。其他三维培养方法还包括旋转细胞培养系统、离心成球培养法、液体覆盖法和人工支架法等, 上述培养方法都存在不同的优势和一定的局限性。现对体外三维培养 DMSCs 的不同方法及其在不同组织再生和疾病治疗中的应用进行综述, 为 DMSCs 功能的精准调控和再生医学研究提供参考。

[关键词] 牙源性间充质干细胞; 球体培养; 干性维持; 组织工程; 再生医学

[中图分类号] R780.2 **[文献标志码]** A

Research progress in 3D culture methods for dental mesenchymal stem cells and their applications in regeneration and disease treatment

LI Guoxin, ZHAO Xiaolin, LI Chenxi, LIU Yingchi, ZHU Zhimo, YUAN Yao, AN Zhengwen
(Department of Oral Biology, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT The dental mesenchymal stem cells (DMSCs) are mesenchymal stem cells derived from the neural crest ectoderm and have exceptional self-renewal and multilineage differentiation capabilities. The DMSCs are extensively used in tissue engineering and regenerative medicine research. The DMSCs can be expanded *in vitro* on a large scale to meet the needs of research and therapy by three-dimensional culture technique. Compared with traditional two-dimensional cell culture techniques, three-dimensional culture more effectively simulates the structure and microenvironment that the stem cells encounter *in vivo*, providing simultaneous spatial and temporal regulation of the proliferation and differentiation of the stem cells. Various three-dimensional *in vitro* culture techniques have been developed in recent years. Hanging drop culture is straightforward, but controlling the tissue culture environment is challenging; microfluidic

[收稿日期] 2023-02-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82270960); 科技部国家重点研发计划项目 (2022YFC2504200); 吉林省科技厅科技发展计划项目 (JCSZ2021893-35)

[作者简介] 李国鑫 (1995-), 男, 山西省大同市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤与免疫微环境调控方面的研究。

[通信作者] 安政雯, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: wenny_an@jlu.edu.cn)

chips offer better control over cellular parameters, but are costly and face the technical platform challenges, so their widespread application is limited; magnetic levitation culture is cost-effective and easy to perform with the rapid cell spheroid formation, but its magnetization effect make it unsuitable for the quantitative analysis. Other three-dimensional culture methods include rotating cell culture systems, centrifugation for spheroid culture, overlay culture and artificial scaffold methods, and they all have their own advantages and limitations. This review encompasses the different methods of three-dimensional culturing of DMSCs and their applications in various tissue regeneration and disease treatment, and provide the reference for the precise regulation of the function of the DMSCs and the research of regenerative medicine.

KEYWORDS Dental mesenchymal stem cell; Sphere culture; Stemness maintenance; Tissue engineering; Regenerative medicine

牙源性间充质干细胞 (dental mesenchymal stem cells, DMSCs) 包括牙髓干细胞 (dental pulp stem cells, DPSCs)、牙龈干细胞 (gingival fibroblastic stem cells, GFSCs)、牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs)、乳牙干细胞 (stem cells from human exfoliated teeth, SHED)、牙囊干细胞 (dental follicular stem cells, DFSCs) 和牙乳头干细胞 (stem cells from apical papilla, SCAP) 等。DMSCs 具有多向分化潜能, 且容易获得, 免疫原性低, 这些特性使得 DMSCs 成为再生医学重要的种子细胞, 为多种组织相关疾病的治疗提供可能。将组织内提取的 DMSCs 在体外进行大量扩增, 获取足够的种子细胞, 这对再生医学的研究至关重要。传统的二维细胞培养技术, 往往缺乏组织特异性结构, 难以模拟体内生物学行为和细胞之间的相互作用。与二维培养方法比较, 最新的三维球体培养方法可以更好地模拟干细胞在体内所处的结构与环境, 且能够增加细胞间和细胞与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 间的相互作用, 使干细胞可以更好地维持干性并发挥更大的分化潜能。

目前综述类报道^[1-2]中关于不同细胞三维培养的方法及其优缺点, 多针对其他组织来源的干细胞或肿瘤细胞, 未见针对 DMSCs 不同培养方法及应用的报道。本文作者特异性针对 DMSCs, 系统分析并总结了近年来 DMSCs 不同三维培养的方法及其优缺点以及其在组织再生和疾病治疗中的作用, 为进一步深入研究并探索不同培养方法对 DMSCs 在组织再生和疾病治疗中的应用提供参考。

1 DMSCs 的三维培养方法

1.1 悬滴培养法 三维培养方法中的悬滴培养法是由 HARRION 等创立的一种培养组织和器官的方

法^[3], 利用载有细胞悬滴培养液的表面张力来形成无骨架的三维细胞球体^[4-5]。

与其他三维培养方法比较, 悬滴培养法操作简单, 有利于细胞间紧密聚合, 使细胞间以及细胞与细胞基质间的相互作用增强, 提高了 DMSCs 的分化潜能^[6-7]。在音猬因子 (sonic hedgehog, SHH) 诱导下, DPSCs 可分化成神经细胞用于神经退行性疾病的治疗^[7]。研究^[6, 8]表明: 利用悬滴培养法培养的 DPSCs 和 PDLSCs 分化能力及矿化能力较应用二维贴壁培养法培养的细胞更强。MORITANI 等^[9]基于悬滴培养法设计了微孔芯片用来培养人牙周韧带间充质干细胞 (human periodontal ligament mesenchymal stromal cells, hPDLMSCs), 发现所培养的细胞与调节干性相关的转录因子和 mRNA 表达水平均较单层 hPDLMSCs 升高, 且矿化结节明显增多。

采用悬滴培养法培养细胞也存在一些不足, 如培养所需的气象环境较难控制, 细胞悬滴易被污染, 不易悬挂等。针对悬滴培养法应用过程中气象环境较难控制的缺点, 李秀群等^[3]改良了 Maximow 双盖片法, 即在瓶底加入一定量的 Hanks 缓冲液, 利用碳酸氢钠和水的作用释放二氧化碳, 利用水分蒸发调节相对湿度, 进而创造出适宜的气象环境。针对细胞悬滴培养液不易悬挂的问题, 液滴体积应限制在 50 μL 以下以保证重力和表面张力达到平衡而形成悬滴^[10]。

除此之外, 悬滴培养法培养的细胞聚合物容易由于营养物和氧气的缺乏导致中心坏死, 控制细胞接种数在合适的范围内可避免这种情况的发生^[8]。悬滴培养法可与芯片技术结合, 如微流体悬滴芯片和超疏水芯片, 通过装置泵不断更新培养基, 补充消耗掉的营养物质和氧气, 以实现长期培养^[10-11]。

1.2 微流控芯片 微流控芯片是一种由微米级的

培养室、通道和微泵等功能元件构成的由微流体控制的装置。这种装置可实现对细胞、组织和化学试剂等进行制备、反应、分离及检测等操作^[12-13], 主要由水油两相的两根微米级通道组成, 由于水油不相容, 持续流动的含细胞的水相液体在油相液体中会形成水相多细胞球^[14]。

微流控芯片具有以下特点: ①可以通过改变动态参数来调控微米级通道中细胞的流动, 模拟特定的环境以满足多细胞球体的培养需求^[15]; ②可以控制多细胞球体的体积, 控制剪切应力以减小细胞损伤, 降低试剂损耗; ③可以在相对空间和时间尺度对细胞的微环境进行干预调节, 精确控制物质浓度、溶液温度和pH值等, 更精确地模拟干细胞在体内的复杂环境, 在疾病发病机制研究和药物筛选等方面具有广阔的应用前景。

近年来, 微流控芯片被广泛应用于DMSCs的研究中。微流控芯片可用于监测DMSCs的细胞迁移^[13], RUFAS等^[16]采用微流控芯片技术观察细胞在补体C3a梯度下的迁移情况, 结果显示: 牙髓损伤后, 补体C3a能够募集DPSCs和牙髓成纤维细胞(dental pulp fibroblasts, DPFs)。微流控芯片可通过添加物理和化学刺激因素来研究牙源性细胞的生理及病理活动, 如采用该技术评估氟化二胺银(silver diammine fluoride, SDF)对DPSCs的毒性潜力^[17], 探讨根尖SCAP对微流体中牙科材料的反应^[18]。研究者^[19]利用微流控芯片技术将DPSCs固定在具有生物相容性材料的微胶囊中, 为细胞提供三维细胞外基质环境, 通过更好地控制细胞参数, 使细胞保持增殖和神经元分化的潜能。

微流控芯片技术也存在一些不足, 如生产成本高昂、制备难度大、核心技术缺乏规范和标准化以及相关人才严重不足, 因此很难广泛应用。

1.3 磁悬浮培养法 磁悬浮培养法是细胞在磁悬浮系统中与磁颗粒结合, 受磁力作用而保持悬浮状态的一种三维培养技术, 通过对磁场的空间控制, 可以控制细胞团的几何形状, 使细胞间接触、凝集而形成细胞球体^[20-21]。磁悬浮培养法由SOUZA等^[21]于2010年开创, 使细胞摄取由噬菌体颗粒、磁性氧化铁和金纳米颗粒组成的生物无机水凝胶, 随后进行磁悬浮。在此基础上, 有研究者^[21]提出用金、氧化铁和聚-L-赖氨酸纳米颗粒构成的磁性纳米颗粒以静电及非特异性结合的方式结合到细胞膜上以磁化细胞。

磁悬浮培养法具有费用低廉, 操作简便, 生物兼容性好^[20], 且磁悬浮培养法培养的细胞活力强, 球体核心的坏死少等优势^[22]。与常规三维培养技术相比, 磁悬浮培养法培养的细胞球体成形更快, 可以形成紧密连接并可自行分泌内源性ECM^[23-24], 因此无需使用人工基质或专用介质, 获得的球体可以长期培养。CHAN等^[25]利用磁悬浮培养人DPSCs (human DPSCs, hDPSCs), 结果表明: 磁悬浮培养法可快速形成球体, 且结构牢固, 不损伤细胞, 提高了hDPSCs用于再生医学的治疗效率。磁悬浮培养法的另一个优势是可以通过操纵磁场的强度从而改变细胞培养物的形状, 在组成细胞球体之后, 即使去除磁场, 细胞球体的完整性仍然保持^[26]。与其他无磁性培养物比较, 磁性三维培养物结构更加紧凑, 具有更多的脂滴和细胞外囊泡, 培养的细胞分化能力更强^[27]。同时, 磁悬浮培养法培养的球体多系谱分化能力、表面标志物和胞外基质表达及成骨和血管生成蛋白均高于二维细胞以及三维聚集体。磁悬浮培养法还可以明显激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号转导通路, 改善三维培养的细胞凋亡效应^[22]。

磁悬浮培养法也存在劣势: ①可能会由于磁体的不均匀磁化、单元大小和聚集程度等因素, 使测量区域定义不明确, 从而使定量分析受到影响^[27]; ②高磁引力条件会使人间充质干细胞呈现典型凋亡特征^[28]。

1.4 旋转细胞培养系统(rotary cell culture system, RCCS) RCCS又称转壁式生物反应器, 是一种应用微载体技术, 通过模拟微重力环境使细胞、组织和培养液处于类似自由落体的状态下旋转, 产生贴壁和悬浮的三维球体细胞, 继而进行细胞大规模扩增的三维体外细胞培养系统^[29-30]。

RCCS的微重力环境和低剪切应力有利于细胞的增殖及诱导分化^[31]。王田田等^[32]研究显示: 与普通重力培养的细胞比较, 模拟微重力环境培养的hDPSCs的体内增殖能力更强。侯延华^[33]研究表明: 应用微载体与RCCS相结合的三维球体培养法在体外培养DPSCs, 较普通二维培养在生长曲线图上有显著的差异, 可延长细胞的对数生长期, 快速得到大量扩增的DPSCs。RCCS模拟的微重力环境可以促进间充质干细胞的神经向分化, 适合神经

细胞的培养^[34-35]。李石^[36]关于PDLSCs的增殖分化能力影响的研究结果显示:采用RCCS培养出的细胞最显著的优点是具有非常高的比表面积,其培养效率极高,培养出的细胞生命力旺盛,在骨诱导条件下,RCCS所产生的微重力环境可以促进细胞向成骨方向分化。LI等^[37]研究表明:使用RCCS模拟微重力环境培养DPSCs可以提高其增殖和牙源分化能力。

与细胞的静态培养比较,RCCS培养的细胞受到外界机械力小,受到机械损伤少,细胞自由度高,易形成三维球体^[31]。在RCCS生物反应器中,细胞呈自由落体状态,转动和混合不受单个方向重力向量的影响,从而实现细胞向各个方向生长^[30]。且由于处于微重力环境下,细胞内部微管的聚合、解聚受影响,细胞内部压力小,分子发生相应改变,因此细胞能够维持良好的形态^[31]。同时,细胞额外受到了血液流动产生的剪切力,具有应力纤维,延缓细胞的增殖速度,细胞不易快速衰老,可以更好地参与后续实验^[38]。

RCCS存在的不足之处:①RCCS仪器的使用成本较高,仪器使用和消毒方法较为繁琐^[30];②根据RCCS原理,旋转半径会受到限制,在一定程度上影响其培养规模^[36]。

1.5 离心成球培养法 离心成球培养法是通过离心增加细胞间黏附,随后将细胞沉淀重悬于细胞培养基中,再将细胞分配至具有细胞排斥表面的96孔细胞培养板上获得三维球体细胞团^[39]。

离心成球培养法可以模拟细胞在体内的发育过程,增加细胞间以及细胞与ECM的相互联系^[40]。在细胞聚集成球的过程中,该培养法使用的是非蛋白质水溶性基质,因此可以快速地分离细胞球体^[39]。与单层细胞培养比较,通过离心成球培养法构建的大鼠DPSCs的体外三维培养模型的细胞增殖能力无明显变化,但细胞中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性明显升高^[41]。ALP可能通过调节胶原合成,促进牙本质的高度矿化,可应用于龋病和牙髓病的治疗。FERRÉ等^[42]研究表明:利用离心成球培养法培养的人牙龈干细胞(human gingival stem cells, HGSCs)具有分化为成骨细胞、软骨细胞和滑膜细胞谱系的能力,因此HGSCs应用于牙周病和骨质疏松等疾病治疗的研究。

离心成球培养法的优点是操作简单、可控性

强、效益高、成本低,对于少量细胞的培养制备速度较快^[43]。该方法的不足之处:离心分离获得的细胞团密度过高,缺乏营养物质和代谢产物的运输通道,物质交换困难,导致中心坏死或凋亡^[10, 44-45]。因此这种方法培养的细胞体积受限,培养周期和药物处置时间需要控制^[10]。

1.6 液体覆盖法 液体覆盖法主要原理是利用非贴壁培养板来抑制细胞与培养板间的低黏性表面吸附,使得细胞与细胞之间开始相互吸引,自发地聚集形成细胞球体^[46]。低黏性表面可由琼脂、琼脂糖凝胶或聚甲基丙烯酸甲酯制成,这些材料制成的培养层可有效抑制其对细胞的吸附^[46-47]。

液体覆盖法操作简单,成本较低,不需要专用设备;细胞受到的剪切应力低,培养过程中容易接触细胞球,还可以长期大规模地获取球体细胞^[47-48]。然而,这种方法也存在以下弊端:①液体覆盖法属于静态培养法,即培养基内物质均处于静止状态,代谢产物会随着培养进程的发展不断堆积,可能会影响细胞的正常生理活动^[49];②在非贴壁培养板的低吸附表面上,细胞球体的生长状态易受影响,可重复性低^[48]。

1.7 人工支架法 常规细胞体外培养多缺乏ECM成分,这可能不利于细胞的存活和增殖,特别对于干细胞的培养造成较大的影响。人工支架法可通过模拟天然的ECM来改善细胞的增殖活性^[50]。人工支架法通过将细胞接种在人工基质构成的支架对细胞进行三维培养,细胞附着于支架后逐渐迁移至支架内部,并在支架的间隙中形成细胞球体^[48]。

水凝胶是一种常见的用于模拟ECM的生物材料,具有三维网状结构和良好的生物相容性,可为细胞黏附、生长和迁移提供支持^[10, 51]。通过调整水凝胶的物理特性,或根据研究目的引入不同功能的官能团,可创造出稳定且适合特定细胞生长分化的微环境^[52]。天然水凝胶(胶原蛋白)具有支撑细胞的作用,为细胞间物质交换提供了良好的空间,且具有可降解和低毒性等优点。研究^[53]表明:胶原蛋白,尤其是I型胶原蛋白能较好地促进牙髓干细胞的增殖和矿化。肽段水凝胶材料,即一种含有肽键的高分子水凝胶材料,也是现阶段广泛应用的支架材料^[51]。

FUKUSHIMA等^[54]研究发现:用水凝胶支架培养的DPSCs都能够形成与牙髓相似的结缔组织。纳米纤维素-壳聚糖热敏水凝胶培养的hDPSCs可

用于微创软骨再生^[55]。孔丽欣等^[51]研究表明:凝胶样支架常被用于牙髓组织再生。黄健萍等^[56]研究结果显示:由钙黏蛋白多肽修饰的透明质酸(hyaluronic acid, HA)水凝胶可作为牙髓间充质干细胞分化的理想支架,有助于牙髓-牙本质的再生。李鑫平制备的改性后的 β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)/壳聚糖水凝胶可促进DPSCs的早期黏附、增殖和成骨分化^[57]。

但人工支架法的缺陷在于:①胶原和水凝胶支架法稳定性较差,且支架的引入可能会改变细胞的微环境,干扰细胞与基质间的相互作用,并产生有毒小分子^[52]。若支架含有动物源成分,可能干扰研究结果^[48];②支架材料的浓度控制是一大难点,支架材料浓度较高时,材料流动性下降,常会形成气泡影响后续的细胞实验;支架材料浓度较低时,材料的弹性受到影响,进而抑制牙髓-牙本质复合体的发生^[51]。③支架外形较为固定,导致可重复性低;且细胞仅黏附于支架的表面,细胞培养效率较低,不能形成理想的细胞分布形式^[58]。

2 DMSCs三维培养的应用

DMSCs具有多向分化潜能,在适当条件下可以分化为牙组织细胞、神经细胞、成骨细胞、成软骨细胞和血管内皮细胞等。三维培养方法可以诱导其定向分化为多种需要的组织细胞,可以增强干细胞因子分泌的功能,从而实现有效的干细胞治疗的目的。

2.1 牙体组织再生 根管治疗目前虽广泛应用于龋病引起的牙髓受损或坏死的治疗,但这种疗法会导致牙齿活力丧失。而基于DMSCs的牙髓组织工程利用适当的支架三维细胞培养以修复牙髓,保持牙髓活力^[59],恢复其正常生理功能。研究^[60]显示:将DPSCs与人脐静脉血管内皮细胞联合培养,在三维培养皿中获得微球体,再将微球体置于牙根片段内,将其植入免疫缺陷鼠背部皮下,4周后可见血管和牙髓样组织再生。研究^[61]表明:将SHED和生物支架(Puramatrix™或rhCollagen type I)置入全长根管后移植到裸鼠背部皮下后,SHED可分化成具有分泌功能的成牙本质细胞,并形成与正常牙髓的细胞、血管组分类似的功能性牙髓以及管状牙本质。李欣悦等^[62]研究显示:利用PDLSCs进行三维球体培养,有骨组织和牙周膜类似组织的结合体形成。研究者^[63]将支架法培养的DPSCs进行体内种植,出现了再生牙根,再生牙

根在6个月后初步具备了牙齿的特征,包括牙本质小管状和功能性牙周韧带状结构等。

目前利用DMSCs可分化为牙本质细胞、根尖细胞、神经细胞以及血管内皮细胞等特定细胞的能力,虽已实现牙髓-牙本质再生,但仅局限于异位再生,尚未实现在口腔中的牙髓-牙本质再生。

2.2 骨和软骨再生 骨组织异常常是因严重机械损伤、炎症、先天疾病和肿瘤等导致的^[61],DMSCs具有向成骨细胞和成软骨细胞分化的潜能,且不同来源的DMSCs的各向分化能力有所差异^[64],因此DMSCs在骨组织再生领域的应用前景非常广阔。TATSUHIRO等^[65]研究显示:由细胞、ECM和钙化基质组成的hDPSC构建体可能成为骨再生无支架材料。JAHANBIN等^[66]对SHED进行成骨分化的定向诱导,并与支架胶原蛋白基质一并接种于鼠的上颌牙槽骨缺损处,可介导新骨形成,治疗效果与自体髂骨移植类似。KHAJEH等^[67]发现缺氧条件下DPSCs的软骨分化能力增强。KIM等^[68]研究表明:体外三维培养的人DSFCs(human DFSCs, hDFSCs)球体可用作骨组织再生的自体干细胞。目前利用DMSCs的三维培养已成为提高人工移植骨再生潜力的重要因素^[64]。

2.3 神经系统疾病治疗 神经系统疾病一般较为严重,主要由于神经元细胞为非再生细胞。神经系统的再生修复能力有限,药物和手术等治疗方式很难从根本上解决受损神经系统的结构及功能重建问题^[61]。而DMSCs不仅拥有强大的多向分化潜能,而且与神经细胞均来源于神经嵴外胚层,可用于神经系统疾病的治疗。研究^[69]发现:SHED可向神经细胞系定向分化,SHED诱导分化形成神经球后,经进一步诱导可形成多巴胺能神经元。将SHED植入损伤的鼠坐骨神经,可观察到神经纤维数量增加^[61]。ROOZAFZON等^[69]成功将DPSCs在三维球体培养系统中分化出视网膜神经节样细胞,提示其可用于青光眼等神经退行性疾病的治疗。

2.4 免疫系统疾病的治疗 在我国,牙周病的患病率高于龋病,随着对牙周病发病机制的深入研究,目前认为牙周病的罹患多由宿主的免疫应答引起,而非感染的微生物直接引起^[70]。王松灵^[71]通过对生理以及炎症状态下的DMSCs免疫学特性的研究发现,生理状态下DMSCs具有良好的免疫调节能力。罗傲翔等^[70]研究显示:通过三维培养的

PDLSCs能提高其抗炎特性,降低宿主免疫应答,缓解炎症反应,提示三维培养的PDLSCs对牙周炎的治疗有一定的应用前景。综上,DMSCs在牙周炎和自身免疫疾病的治疗上具有很大的应用潜力。

除了上述疾病的治疗应用,利用三维培养的DMSCs在角膜修复、肝炎治疗、改善糖尿病患者临床症状和肺损伤修复等领域也得到了不同程度的应用^[61]。

3 结 语

随着组织工程和临床治疗技术的不断发展,对DMSCs的需求也在不断增加。三维球体培养的DMSCs自我更新能力强,多向分化潜能大,在临床疾病治疗、组织再生和器官移植等方面具有良好的应用前景。同时,三维球体培养技术存在一定缺陷,主要是球体中心容易因代谢产物堆积、缺氧及营养物质缺乏而发生坏死。如何解决并消除这一弊端可作为DMSCs三维球体培养技术后续的研究方向之一。

综上所述,结合研究需要,选择合适的方法培养DMSCs,通过不断改善三维培养方法,以获得更好的研究效果,并为进一步应用于临床治疗奠定基础。目前已经发现DMSCs在骨分化、软骨分化和神经分化等方面具有巨大分化潜能,后续研究可以继续向其他分化方向进行探索。此外,DMSCs已应用于骨损伤治疗等方面,但口腔治疗领域的应用研究依然较少,可以期待将具有多向分化能力的DMSCs更多地应用在口腔环境中的牙髓再生、牙本质或牙釉质修复等领域。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

安政雯负责论文的整体设计,李国鑫、赵小琳、李晨曦、刘影驰、朱芷墨和袁瑶负责文献检索及论文的撰写。

[参考文献]

- [1] 赵范范,章丽娜,商迎辉,等.神经干细胞的三维培养及其在神经疾病中应用的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2020,33(2):227-231.
- [2] HABANJAR O, DIAB-ASSAF M, CALDEFIE-CHEZET F, et al. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12200.
- [3] 李秀群,薛庆善,保天然,等.改良的悬滴培养法[J].四川解剖学杂志,1995,3(2):119-119.
- [4] 林鹤,王婉秋,焦佳媛,等.培养板悬滴法三维细胞培养模型建立及细胞活力检测方法比较[J].药物评价研究,2017,40(8):1103-1106.
- [5] FOTY R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids [J]. J Vis Exp, 2011(51): 2720.
- [6] 罗傲翔,吴补领,侯晋,等.3D培养牙周膜干细胞生物学特性的初步研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2014(5):264-268.
- [7] FARHANG S, SOLEIMANI M, OSTADSHARIF M, et al. Neurogenic induction of human dental pulp derived stem cells by hanging drop technique, basic fibroblast growth factor, and SHH factors [J]. Dental Res J, 2021, 18: 57.
- [8] 罗傲翔,吴补领.悬滴法培养牙髓干细胞生物学特性的初步研究[C].广州:2014年第九次全国牙体牙髓病学学术会议论文汇编,2014:105.
- [9] MORITANI Y, USUI M, SANO K, et al. Spheroid culture enhances osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells [J]. J Periodontal Res, 2018, 53(5): 870-882.
- [10] SUN B Y, ZHAO Y, WU W M, et al. A superhydrophobic chip integrated with an array of medium reservoirs for long-term hanging drop spheroid culture [J]. Acta Biomater, 2021, 135: 234-242.
- [11] 邓俊豪,李苗,张里程,等.三维悬滴法培养间充质干细胞在组织损伤修复中的应用及优势[J].中国组织工程研究,2020,24(7):1101-1106.
- [12] 关冀弛,刘丹,陈艳阁,等.神经细胞三维培养技术研究进展[J].精准医学杂志,2022,37(6):554-558,564.
- [13] 张荷旋,侯本祥.微流控芯片在口腔医学领域的应用研究进展[J].中国实用口腔科杂志,2021,14(5):610-614.
- [14] 梁瑜,乔勇,刘星志,等.三维成球培养优化间充质干细胞的研究进展[J].中国材料进展,2020,39(4):278-286.
- [15] SHAO C, CHI J, SHANG L, et al. Droplet microfluidics-based biomedical microcarriers [J]. Acta Biomater, 2022, 138:21-33.
- [16] RUFAS P, JEANNEAU C, ROMBOUTS C, et al. Complement C3a mobilizes dental pulp stem cells and specifically guides pulp fibroblast recruitment [J]. J Endodontics, 2016, 42(9):1377-1384.
- [17] SHIJA H. Characterization of silver diamine fluoride cytotoxicity using microfluidic tooth-on-a-chip and gingival equivalents [J]. Dental Mat, 2022, 38(8): 1385-

- 1394.
- [18] FRANÇA C M, TAHAYERI A, RODRIGUES N S, et al. The tooth on-a-chip: a microphysiologic model system mimicking the biologic interface of the tooth with biomaterials[J]. *Lab on a Chip*, 2020, 20(2): 405-413.
- [19] LORENA H S J, PHIL S, BING S, et al. Microfluidic encapsulation supports stem cell viability, proliferation, and neuronal differentiation [J]. *Tissue Eng Part C*, 2018, 24(3): 158-170.
- [20] 李正钧, 梁高峰. 三维肿瘤球聚体的构建及其研究进展[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(9): 147-149.
- [21] SOUZA G R, MOLINA J R, RAPHAEL R M, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation[J]. *Nat Nanotechnol*, 2010, 5(4): 291-296.
- [22] LEWIS N S, LEWIS E E L, MULLIN M, et al. Magnetically levitated mesenchymal stem cell spheroids cultured with a collagen gel maintain phenotype and quiescence[J]. *J Tissue Eng*, 2017, 8: 2041-7314.
- [23] 肖成荣, 李丹丹, 高月. 3D HepG2细胞肝毒性评价模型的建立[C]. 重庆: 2016年第六届全国药物毒理学会论文集, 2016: 201.
- [24] MARQUES I A, FERNANDES C, TAVARES N T, et al. Magnetic-based human tissue 3D cell culture: a systematic review[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12681.
- [25] CHAN Y H, LEE Y C, HUNG C Y, et al. Three-dimensional spheroid culture enhances multipotent differentiation and stemness capacities of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells by modulating MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(5): 1810-1826.
- [26] CALEFFI J T, AAL M C E, GALLINDO H O M, et al. Magnetic 3D cell culture: state of the art and current advances[J]. *Life Sci*, 2021, 286: 120028.
- [27] GAO Q H, WEN B Q, KANG Y N, et al. Pump-free microfluidic magnetic levitation approach for density-based cell characterization [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 204: 114052.
- [28] 关冀弛, 刘丹, 陈艳阁, 等. 肿瘤细胞三维培养技术研究进展[J]. *沈阳医学院学报*, 2022, 24(6): 641-647.
- [29] MENG R, XU H, DI S, et al. Human mesenchymal stem cells are sensitive to abnormal gravity and exhibit classic apoptotic features[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(2): 133-142.
- [30] 来元亮. 旋转式细胞培养系统的原理及应用[J]. *生物化工*, 2020, 6(3): 157-160.
- [31] 张延芳, 陈槐卿, 黄华, 等. 旋转生物反应器的力学环境及其对细胞生长的影响[J]. *生物医学工程学杂志*, 2006, 23(2): 400-404.
- [32] 王田田, 张巍巍, 朱澌洁, 等. 模拟微重力环境对人牙髓干细胞体内增殖能力的影响[J]. *口腔医学研究*, 2014, 30(6): 489-492.
- [33] 侯延华. 人牙髓干细胞体外三维培养扩增的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2006.
- [34] CHEN J, LIU R R, YANG Y, et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 505(2): 171-175.
- [35] ZARRINPOUR V, HAJEBRAHIMI Z, JAFARINIA M. Expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of adipose-derived stem cells in simulated microgravity condition[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(2): 178-186.
- [36] 李石. 模拟微重力环境对人牙周膜干细胞增殖分化的影响及其机制的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2009.
- [37] LI Y P, HE L N, PAN S, et al. Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2): 873-878.
- [38] 赵灵犀, 丁皓, 徐萌, 等. 旋转式三维细胞培养装置的研制[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(19): 3531-3533.
- [39] MARITAN S M, LIAN E Y, MULLIGAN L M. An efficient and flexible cell aggregation method for 3D spheroid production[J]. *J Vis Exp*, 2017(121): 55544.
- [40] 肖杨, 刘然, 邢丽娜, 等. 采用微团培养模型探讨染料木黄酮的发育毒性[J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 22(4): 271-275.
- [41] 王亦菁, 宋九余, 金岩, 等. 牙髓干细胞体外三维培养及生物学特性的研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2009, 23(6): 631-633.
- [42] FERRÉ F C, LARJAVA H, LOISON-ROBERT L S, et al. Formation of cartilage and synovial tissue by human gingival stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(23): 2895-2907.
- [43] 黄亮节, 翁土军, 张春丽, 等. Pellet培养与纤维蛋白凝胶支架体外成软骨能力的比较[J]. *中国骨与关节杂志*, 2017, 6(3): 198-203.
- [44] ZHANG S Y, BUTTLER-BUECHER P, DENECKE B, et al. A comprehensive analysis of human dental pulp cell spheroids in a three-dimensional pellet culture system[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 91: 1-8.
- [45] 刘兰涛, 朱瑜洁, 黄博, 等. Pellet法和Micromass法诱导软骨终板干细胞成软骨的比较[J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21(1): 75-81.
- [46] CARLSSON J, YUHAS J M. Liquid-overlay culture of

- cellular spheroids[J]. *Recent Results Cancer Res*, 1984, 95: 1-23.
- [47] 梁婷婷, 张世昌. 间充质干细胞球形体培养的研究进展[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2021, 11(6): 372-377.
- [48] COSTA E C, DE MELO-DIOGO D D, MOREIRA A F, et al. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: considerations and practical approaches [J]. *Biotechnol J*, 2018, 13 (1). DOI: 10.1002/biot.201700417.
- [49] 马忠义, 庄 华, 常 成, 等. 多细胞肿瘤球体培养技术在膀胱癌治疗中的研究进展[J]. *肿瘤研究与临床*, 2018, 30(7): 490-493.
- [50] ZHANG S H, LIN A Q, TAO Z W, et al. Microsphere-containing hydrogel scaffolds for tissue engineering[J]. *Chem Asian J*, 2022, 17(20): e202200630.
- [51] 孔丽欣, 李 静, 徐丹阳, 等. 凝胶样支架材料对三维培养的人牙髓干细胞增殖的影响[J]. *口腔医学*, 2018, 38(7): 593-597.
- [52] HUANG Q T, ZOU Y J, ARNO M C, et al. Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(20): 6255-6275.
- [53] 帕尔哈提·阿布肚热合曼, 白尔娜·吾守尔, 木合塔尔·霍加, 等. 兔牙髓干细胞与Pluronic F-127嵌段共聚物的体外相容性[J]. *中华口腔医学研究杂志(电子版)*, 2016, 10(2): 97-103.
- [54] FUKUSHIMA K A, MARQUES M M, TEDESCO T K, et al. Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration-a systematic review [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 98: 182-194.
- [55] TALAAT W, ARYAL A C S, KAWAS S A, et al. Nanoscale thermosensitive hydrogel scaffolds promote the chondrogenic differentiation of dental pulp stem and progenitor cells: a minimally invasive approach for cartilage regeneration [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 7775-7789.
- [56] 黄健萍, 王 君, 林思恩. 钙粘蛋白多肽修饰的透明质酸水凝胶诱导牙本质-牙髓再生的研究[J]. *中国卫生产业*, 2018, 15(9): 162-163.
- [57] 李鑫平. β -TCP/壳聚糖水凝胶的改性对牙髓干细胞生长与矿化的影响[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [58] 于海悦, 麻丹丹, 吴补领. 3D打印明胶海藻酸钠凝胶支架对人牙髓细胞的黏附增殖作用[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(5): 668-672.
- [59] RAVINDRAN S, ZHANG Y B, HUANG C C, et al. Odontogenic induction of dental stem cells by extracellular matrix-inspired three-dimensional scaffold[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(1/2): 92-102.
- [60] 马学娟, 陈 旭. 牙源性干细胞应用于牙髓牙本质再生研究进展[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2017, 10(10): 635-638.
- [61] 李晓霞, 方滕姣子, 余 湜, 等. 人乳牙牙髓干细胞在干细胞治疗中的应用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2017, 35(5): 533-537.
- [62] 李欣悦, 李熙恒, 毛天娇, 等. 三维培养人牙周膜干细胞的形态、活性及成骨分化能力[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(6): 846-852.
- [63] 张晓月, 赵 卿, 王小聪, 等. 牙源性干细胞在生物牙根中的应用进展[J]. *临床口腔医学杂志*, 2022, 38(8): 502-504.
- [64] SALGADO C L, BARRIAS C C, MONTEIRO F J M. Clarifying the tooth-derived stem cells behavior in a 3D biomimetic scaffold for bone tissue engineering applications[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 724.
- [65] TATSUHIRO F, SEIKO T, YUSUKE T, et al. Dental pulp stem cell-derived, scaffold-free constructs for bone regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1846.
- [66] JAHANBIN A, RASHED R, ALAMDARI D H, et al. Success of maxillary alveolar defect repair in rats using osteoblast-differentiated human deciduous dental pulp stem cells[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 74(4): 829.e1-829.e9.
- [67] KHAJEH S, RAZBAN V, TALAIE-KHOZANI T, et al. Enhanced chondrogenic differentiation of dental pulp-derived mesenchymal stem cells in 3D pellet culture system: effect of mimicking hypoxia [J]. *Biologia*, 2018, 73(7): 715-726.
- [68] KIM H J, SUNG I Y, CHO Y C, et al. Three-dimensional spheroid formation of cryopreserved human dental follicle-derived stem cells enhances pluripotency and osteogenic induction properties [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, 16(5): 513-523.
- [69] ROOZAFZON R, LASHAY A, VASEI M, et al. Dental pulp stem cells differentiation into retinal ganglion-like cells in a three dimensional network [J]. *Biochem Biophys Res Com*, 2015, 457(2): 154-160.
- [70] 罗傲翔, 吴补领. 3D培养牙周膜干细胞提高其抗炎特性[C]. 北京: 第七次中国老年口腔医学年会暨亚洲老年口腔医学学术研讨会论文集汇编, 2012: 141-142.
- [71] 王松灵. 异体干细胞的牙周再生基础及转化研究[C]. 南京: 2016牙周病学学术研讨会, 2016: 7-8.