

基于支架的牙髓组织预血管化技术的研究进展

李甜^{1,2} 李丽洁^{1,2}

1. 内蒙古医科大学附属医院口腔科 呼和浩特 010050;

2. 内蒙古医科大学口腔医学院 呼和浩特 010059

[摘要] 对于牙髓坏死的年轻恒牙,目前临床上多采用牙髓血运重建术进行治疗。因该方法无法重建功能性牙髓样组织,并可能导致根管钙化,因此再生牙髓治疗引起了广泛关注。牙髓组织再生的目的是恢复自体牙髓组织的活性与功能,其成功的关键因素是快速形成功能性血管网。根管和髓腔作为一种相对狭窄、密闭、缺血缺氧的环境,功能性血管网从根管长到髓腔的过程非常缓慢,因此预血管化技术应运而生。该技术是在牙髓的工程化组织构建中预先形成功能性血管网络,确保为构建体提供足够的血液供应;然后将血管网络与宿主脉管系统吻合,最终诱导血管化牙髓组织再生。本文综述了基于支架的预血管化技术在细胞、生长因子和支架方面的研究进展,同时也总结了与预血管化相关的三生物打印技术及其应用,以期为再生医学发展提供理论依据。

[关键词] 牙髓组织工程; 牙髓组织再生; 预血管化技术; 支架; 三生物打印

[中图分类号] R781 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2025061



开放科学(资源服务)
标识码(OSID)

Research progress on scaffold-based prevascularization technique for dental pulp tissue

Li Tian^{1,2}, Li Lijie^{1,2}

1. Dept. of Stomatology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; 2. School of Stomatology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China

Correspondence: Li Lijie, Email: lilijie2007148@126.com

[Abstract] In young permanent teeth with pulp necrosis, the current clinical approach for pulp revascularization does not effectively reconstruct functional pulp-like tissue and may lead to root canal calcification. Consequently, regenerative endodontic treatment has garnered widespread attention from scholars. The primary aim of dental pulp tissue regeneration is to restore the activity and functionality of autologous dental pulp tissue, with the rapid formation of a functional vascular network taken as a critical success factor. However, the root canal and medullary cavity present relatively narrow, airtight, ischemic, and hypoxic environments, which impedes the growth of the functional vascular network from the root canal to the medullary cavity. This challenge has been addressed by researchers who proposed prevascularization technique, which involves the formation of a functional vascular network within engineered tissue to ensure an adequate blood supply to the construct. This vascular network can anastomose with the host vasculature, ultimately facilitating the regeneration of vascularized dental pulp tissue. This article reviews potential cell types, growth factors, and scaffold sources pertinent to scaffold-based prevascularization technology. Three dimension (3D) bioprinting technology related to prevascularization is discussed, and a theoretical foundation for advancements in regenerative medicine is provided.

[Key words] pulp tissue engineering; pulp tissue regeneration; prevascularization technique; scaffold; three dimension bioprinting

[收稿日期] 2024-08-06; [修回日期] 2024-10-07

[作者简介] 李甜, 医师, 硕士, Email: 1785708725@qq.com

[通信作者] 李丽洁, 主任医师, 硕士, Email: lilijie2007148@126.com

牙髓组织再生是将组织工程移植物置入根管内,使牙髓功能恢复到原始状态的技术,目的是使年轻恒牙牙根继续正常生理发育^[1]。移植到牙髓

腔内的工程组织依靠微血管来交换营养物质和氧气,清除代谢废物,维持一系列生理功能,所以功能性血管网络的快速形成是牙髓组织再生的决定性因素。利用细胞归巢或干细胞移植构建工程组织,以达到髓腔内原位血管的生成,是近年来的研究热点。对于髓腔原位血管的生成,通常需要考虑以下3个问题。1) 牙髓腔是一个缺血缺氧的环境,而且宿主血管只能通过相对狭窄的根尖孔进入牙髓腔,并以5 $\mu\text{m}/\text{h}$ 的缓慢延伸速率沿根管向牙冠生长,直至长入构建体^[2],这不利于工程组织的存活或牙髓再生。2) 在微观尺度上,氧气和营养物质的扩散极限直径约为200 μm ^[3],这意味着距离毛细血管较远的细胞会发生缺氧和凋亡。3) 组织植入后的存活和血管形成过程难以监测和控制^[4]。为了克服这些问题,预血管化技术应运而生。预血管化技术是在牙髓的工程化组织构建中,预先形成功能性血管网络,该网络能够快速吻合宿主脉管系统,确保快速输送足够的血液供应,从而促进移植体存活;随后将血管网络与宿主脉管系统吻合,最终诱导血管化牙髓再生。体外预血管化技术可以改善植入后工程组织的血管化、血液灌注和整合^[5]。Guo等^[5]的实验研究表明:在股骨束模型中,植入高度血管化的支架比植入无血管化的支架更能促进血管的生长。

目前牙髓组织再生的理念是:通过再生牙本质-牙髓复合体来恢复正常牙髓的功能。再生的目的是用新的健康组织替换病理或非活体牙髓组织^[6-7]。再生的牙髓须与原始的组织相似,应含有良好的纤维结缔组织、丰富的血管网与神经支配。目前临床上常用的牙髓血运重建术方法是刺激根尖出血,利用从根尖周组织进入根管间隙的血液形成血块,根尖周出血形成的血块可能携带各种干细胞,它们被招募到根管空间,血块可以充当生物支架,从而促进牙髓组织再生^[8]。通过血运重建术在根管中形成的组织并不能代表天然的真实牙本质-牙髓复合物,而预血管化技术则集中在再生一种形态和功能与天然牙髓相似的新牙髓上^[9-11]。

牙髓再生成功标准除了血管化牙髓组织再生之外,还包括新牙本质在现有牙本质表面的沉积、成牙本质细胞层的形成、细胞-基质相互作用、神经支配、生长因子渗入、病原体控制等因素^[11];同时还须观察牙齿变化,如根尖闭合、牙根延长和牙本质壁增厚^[10,12]。此外,预血管化构建体的直接可用性非常重要,特别是对于那些没有

足够的自体细胞来招募的老年患者^[9,12-13]。

近年来,实验研究的路线已从在简单基质上培养单细胞,转向细胞共培养。最初是二维(two dimension, 2D)系统(即Transwell系统),后来是三维(three dimension, 3D)系统。随着从细胞外基质(extracellular matrix, ECM)凝胶(即Matrigel)上的2D培养到具有可调节物理化学和机械性能的3D支架的进步,出现了新的可以模拟细胞生态位的生物材料^[3,14]。目前,这些体外模型常采用新兴的3D生物打印策略来设计更复杂的系统。3D生物打印可用于构建3D支架,生产结构化脉管系统,以取代传统的制造方法。在牙髓组织的再生工程中,从体外组装组织工程构建体到植入患者体内,都需要充足的血管化,而缺乏或低效的灌注和血管化仍然是组织工程构建体的主要限制之一,因此如何在体外开发高度结构化和成熟的微血管网络是目前的研究热点和难点。本文通过总结共培养细胞类型、外部生长因子的提供以及3D生物打印,探讨牙髓预血管化的研究进展。

1 预血管化构建体的主要成分

2001年Iwaya等^[15]报道了1例采用再生性牙髓治疗技术成功治疗年轻恒牙慢性根尖周炎的病例。该病例使用支架、生长因子和干细胞以促进患者的牙根持续发育,结果发现:患者的牙根可继续发育,牙髓可恢复活力,提示再生性牙髓治疗新方案具有应用潜力。但随后大量的临床应用显示:再生性牙髓治疗的失败率很高,对此类失败的案例进行再治疗的难度很大。考虑到这些困难,一次性成功构建预血管化网络至关重要。

构建预血管化移植体需要3种主要的成分,分别是细胞、生物活性分子以及承载细胞和生物活性分子的支架^[6-7,16-17]。细胞主要为血管内皮细胞和干细胞,这些细胞具有再生、增殖和分化为特定细胞的能力。生物活性分子通常为一些生长因子。生长因子是一种蛋白质或信号分子,可与特定的膜细胞受体结合,控制和协调细胞的功能,例如细胞信号传导、细胞增殖和基质合成。生长因子在增强干细胞的再生效果和控制功能方面发挥着重要作用^[7,18]。合适的支架应与天然ECM相似,是细胞生存的生理微环境,为细胞提供3D生长空间并调节细胞功能和代谢^[6,19-20]。组织工程中的每种成分在支持牙髓再生过程中都有不同的作用,这3

种成分的组合可产生最佳的结果^[6-7]。

理想的预血管化组织应模仿体内血管的生理功能。生理上,血管生成涉及复杂的信号通路,包括多种细胞。这些细胞可以为内皮细胞提供迁移和毛细血管形成所需的促血管生成因子。在预血管化过程中,将内皮细胞/内皮祖细胞或具有高血管生成潜力的细胞纳入移植物中,同时使用持续释放血管生成因子的移植物支架,可促进牙本质基质产生血管生成因子,制造内皮化微流体通道^[21]。基于这些研究,目前组织工程中的血管生成增强策略包括以下2种:1)靶细胞和内皮细胞共培养;2)释放生长因子的支架^[22]。

1.1 细胞

目前用于牙髓再生的牙髓组织工程技术主要有2种方法:一种是无细胞的方法,另一种是基于细胞的方法^[23]。无细胞的方法是在损伤部位创建一个专门的生态位,用于宿主细胞的动员和归巢,该位点也适合天然细胞增殖和分化,这样将归巢的细胞用于髓腔内的原位血管生成,通过诱导宿主脉管系统的侵袭,使血管生长、延伸、融合,形成功能性血管网,最终促进牙髓组织再生^[4]。Kim等^[1]使用趋化诱导的细胞归巢实现了牙髓样组织再生,该研究未使用细胞移植技术,提示牙髓组织工程中自然再生具有一定的潜力。然而,另外两项研究^[24-25]则发现:当根管内的牙髓组织被完全去除后,许多基于无细胞的诱导牙髓组织再生的方法并没有显示出牙髓和牙本质的再生。相比之下,Iohara等^[26]和Ishizaka等^[27]的研究表明:基于细胞的再生技术,利用多种不同的细胞(主要是干细胞)在体外分离和培养,然后放置在合适的支架中并移植入根管内,能更好地再生牙髓/牙本质组织。此外,多个研究^[26,28-29]也已证明:牙髓/牙本质组织可以在有血液供应的根管中再生。基于这些研究,本文主要综述基于支架负载细胞的牙髓组织再生方法。

预血管化是包含混合共培养和/或微加工技术的一种技术。该技术将内皮细胞和周细胞共培养以诱导细胞间通信,将细胞共培养物引入定制的人工血管床,或诱导自组装,以模拟细胞与ECM之间的相互作用,从而构建预血管化系统,预形成功能性毛细血管网络,在移植后的组织中快速重建充足的血液供应^[22]。没有成纤维细胞、间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)或其他组织特异性细胞等支持细胞,内皮细胞通常无

法在构建体中长期存活^[30],因此干细胞与内皮细胞共培养是促进血管化和组织再生非常有效的策略。有学者^[23,31]利用内皮细胞和支持细胞共培养,在具有生物相容性和可生物降解的支架上成功设计了血管网络。

1.1.1 内皮细胞 内皮细胞在血管预形成过程中起着至关重要的作用,目前已有多种内皮细胞亚型用于血管预形成研究。自体内皮细胞中,人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cell, HDMEC)、内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)和内皮集落形成细胞(endothelial colony forming cell, ECFC)^[32-34]是最直接的细胞来源,可以最大限度地降低免疫排斥的风险,这些内皮细胞已广泛用于组织工程和血管工程中的牙髓再生。HUVEC是一种分离自脐带组织的成熟的血管生成细胞,具有良好的增殖能力和分化能力,能够分化为多个不同的细胞类型,例如成血管内皮细胞、平滑肌细胞等。此外,HUVEC表达的受体和分泌的细胞因子广泛参与了许多重要的体内生理过程,如血管形成、血液循环调节、血小板聚集等。这些功能使得HUVEC显示出广泛的应用价值。HUVEC具有来源广泛、增殖能力强、易于培养、形态和功能稳定、免疫原性较低及涉及伦理问题较少等优势,应用广泛^[34]。

在体外预血管化策略中,内皮细胞通常与促血管生成细胞(如成纤维细胞、周细胞、MSC、血管平滑肌细胞)以1:1的比例共培养,不仅可以增强血管生成,还可以稳定毛细血管样结构,是在移植物中获得血管样结构、增加血管密度以及与宿主脉管系统快速连接的关键,是获得血管网络的常用技术^[22]。

自体内皮细胞在应用中也存在一些不利因素。内皮细胞的不同捐赠者存在个体方面的遗传和生理差异,会影响研究结果的一致性。内皮细胞的生命周期有限,随着时间的推移,其增殖能力逐渐下降,体外表型标志物表达会快速丧失,限制了它在长期实验中的应用。虽然内皮细胞是良好的研究模型,但是在模拟复杂体内条件方面,仍有一定的局限性,比如长期培养可能导致遗传变异,某些全身性疾病患者的内皮细胞存在潜在的功能障碍等问题,这些因素限制了自体内皮细胞的大规模应用^[33]。

随着细胞工程和基因工程的快速发展,胚胎干细胞、诱导多能干细胞和成体干细胞等干细胞的分化已成为获得内皮细胞的有前途的方法之一,但随之也出现了如伦理问题、致癌性和基因组不稳定的安全问题等一系列问题和挑战^[35]。

综合来说,从合适来源的组织获取足够的内皮细胞仍有一定的挑战。牙源性干细胞(dental stem cells, DSC)表现出强大的增殖能力,而且属于自体来源,具有免疫相容性,可能成为内皮谱系衍生的有前途的替代细胞来源;同时自体DSC具有易于分离、侵袭性小、多能分化能力等优点^[35]。

1.1.2 干细胞 已有多种类型的干细胞成功用于基于细胞的牙髓再生研究。DSC包括多种干细胞:牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSC)、根尖牙乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP)、人脱落乳牙干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)、牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSC)以及牙囊干细胞(dental follicle progenitor cells, DFSC)^[36-38],均根据其组织来源命名。这些细胞中,DPSC和SCAP源自天然牙髓或前体组织^[36],在牙髓再生研究中尤其重要。DPSC具有优异的克隆形成效率和促血管生成能力,是极有潜力的牙髓组织再生干细胞来源。有学者^[39]使用可打印生物墨水成功形成了血管组织,其中包含了HUVEC与DPSC的共培养物。这些共培养物不仅可以增强血管的生成,还可以稳定毛细血管样结构。除了DPSC之外,从未成熟的根尖乳头中分离出来的SCAP也可以增强牙髓组织分化,促进年轻恒牙根继续发育^[40],这对于年轻恒牙的牙髓组织再生有重要的意义。

除PDLSC在体内倾向于形成骨样组织外,所有类型的DSC在体外均具有一定程度的多能性,在体内可与支架材料形成牙髓-牙本质复合物。相比之下,除骨髓间充质干细胞以外的非牙源性干细胞尚未被证实具有牙髓再生的潜力^[36]。

1) SCAP。SCAP在解剖学上位于未成熟年轻恒牙的根端牙乳头内。SCAP的获取方法较为简单:拔牙后,用镊子分离正在发育的牙根尖端的组织,可以轻松分离根尖乳头和SCAP。研究^[41-43]表明:当年轻恒牙牙髓坏死,甚至在根尖周炎症状和体征持续存在的情况下,仍能够完成牙根发育,说明SCAP具有抗感染性质。此外,SCAP可促进血管和神经的生成和生长,这是组织再生需

考虑的重要因素之一。如果没有SCAP的存在,牙根就会停止发育^[43]。SCAP处于相对早期的发育阶段,可能较DPSC具有更大的牙本质和神经组织再生能力。在牙髓组织再生中,SCAP是发挥修复和再生作用的主要祖细胞来源^[42,44]。Yi等^[44]使用一组被命名为GENTonikde的小分子混合物来诱导SCAP转化为内皮细胞,结果发现:诱导8 d后,内皮特异性标志物CD31和血管内皮生长因子受体-2的表达明显增强,提示在基础培养基中添加小分子混合物可驱动SCAP的内皮分化。

2) DPSC。DPSC可以从拔除的第三磨牙中获取,来源广泛,采购过程中涉及的伦理问题较少,而且冷冻保存后DPSC的干细胞活性、增殖和分化能力不会受到影响^[37-38],优点较多。研究^[45]表明:DPSC衍生的ECM具有骨诱导性,提示细胞衍生的ECM可以进一步用于矿化组织的组织工程。

2006年Huang等^[46]的研究发现:将DPSC与牙齿切片或支架材料进行体内移植,DPSC可以分化为成牙本质细胞,并可进一步形成牙髓-牙本质复合物。其他研究^[28,47]也表明:DPSC是牙髓组织再生最有潜力的干细胞之一,但仅含DPSC结构的构建体在植入根管后,无法形成具有完整根长的牙髓样组织,提示DPSC很难从小的根管孔诱导血管,使用无预血管化的支架可能效率低下。Guo等^[5]在大鼠完整脊髓横断模型中证明:经过生物工程预血管化的DPSC嵌入结构具有神经再生和血管生成的潜力。Katata等^[48]利用DPSC的内皮分化能力进一步进行研究。该研究在体外DPSC结构中预先形成血管结构,与植入未预血管化的DPSC构建体相比,预血管化的DPSC构建体形成了具有更高密度的内皮分化标志物(CD31)的牙髓样组织。该结果表明:这些具有血管样网络结构的DPSC结构可用作增强牙髓再生的植入物;在体内植入之前,通过体外诱导3D细胞构建体进行血管分化,可以作为改善植入组织血液灌注的方法。这些研究都表明DPSC具有内皮分化潜力,对于解决自体内皮细胞样本获取困难和增殖扩增效率低下等问题有很大的帮助。

DPSC与SCAP具有增殖和迁移能力,可以实现细胞从其所在微环境到3D支架的迁移,并转化为牙髓组织,这是牙髓再生细胞的重要特征。预血管化技术需要在体外培养DPSC与SCAP,而细胞培养在传代后期,会表现出与天然组织中对应的转录组和表型不同的现象。细胞表型可能受到

供体遗传背景、牙齿发育阶段、培养条件、细胞系产生等因素的影响。例如,来自牙根发育早期的细胞比来自牙根发育晚期的细胞表现出更好的迁移和成骨分化能力。此外,细胞在牙根发育中的作用受其体内生态位调控,而体外培养不可避免地简化了细胞所接受的调控网络^[49-50]。

1.2 生长因子

DPSC及SCAP来源广泛,同时可以分泌生长因子促进血管化,目前已经成为牙齿组织工程的理想的种子细胞^[51-52]。有研究^[53]发现:种子细胞独立移植形成的牙髓-牙本质复合体组织是不完整的,可能是由于移植物中缺乏细胞分化所必需的生长因子。进一步研究^[54]也表明:独立移植的细胞更有可能形成骨样牙本质或钙化组织,而不是牙髓-牙本质复合体。

牙根的发育和伸长是由信号分子精细调节的,重要的信号分子包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和骨形态发生蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7)等^[55]。这些信号分子通过调节负责牙齿伸长的间质干细胞或祖细胞^[50]来影响牙根的长度。Guo等^[5]的体外研究发现:嵌入DPSC的支架可以释放NGF,从而诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞PC12向神经元样细胞分化,提示生长因子在组织再生中发挥重要作用。目前在组织再生研究中,使用生长因子作为诱导剂是一种常见的方法。

1.2.1 VEGF

VEGF是新生血管的强大启动剂,可激活内皮细胞并刺激迁移。此外,VEGF还促进细胞组装、血管形成和成熟。VEGF有多种来源,包括干细胞本身、牙本质、其他细胞或支架材料,通过共同作用来调节未成熟和未分化的DPSC的行为^[56]。生长因子诱导细胞增殖、血管生成和新血管形成,是组织再生过程中的重要步骤。信号分子与趋化剂和其他信号因子一起作用,将干细胞吸引到需要修复的缺损部位并刺激局部再生^[55]。

VEGF可与肝素结合并增加内皮细胞的增殖和新血管形成^[55],在血管生成和血运重建中发挥着关键作用。VEGF信号传导是血管生成最基本的调

节因子之一,可以促进EPC的分化,增强内皮细胞的存活、增殖和迁移,并增加现有血管的渗透性,显示出强烈的促血管生成作用。Yi等^[44]的研究表明:含有VEGF的培养基能诱导DPSC在基质胶上形成血管状结构。

1.2.2 其他生长因子

TGF- β 组生长因子广泛用于干细胞分化的研究。该组生长因子是细胞因子和营养激素家族,具有多种生理功能,是生长、发育、炎症反应、修复和免疫反应中不可或缺的一部分。bFGF具有血管生成潜力,可招募干细胞进行迁移和增殖而不分化^[55],是调节内皮细胞增殖、迁移和细胞间黏附的促血管生成细胞因子^[57]。血小板释放PDGF,对细胞增殖和血管生成非常重要^[55]。PDGF可以显著增强干细胞增殖和成牙本质细胞分化^[44]。在牙齿发育期间,NGF在牙齿缺损区域表达较高,有助于感觉和交感神经元细胞的存活和增殖^[58]。BMP-7可诱导牙本质形成^[55]。EGF是一种营养激素,有助于干细胞的增殖和迁移。由这些研究可以看出,生长因子是一种具有影响和改变细胞增殖、分化和迁移潜力的多肽,利用生长因子及其信号通路可以影响干细胞的增殖和分化,可以实现更好的体外预血管化效果。

尽管使用生长因子可促进牙髓组织预血管化,但目前主要的困扰是在体外预血管化构建体的培养中,如何选择生长因子的问题,未来需要更多的研究来充分证明信号分子之间的协同和拮抗作用。

1.3 支架

牙髓组织再生时,构建适当的ECM微环境非常重要。牙髓的ECM富含胶原纤维,主要是I型和III型胶原蛋白。目前多采用天然和合成的材料支架来模拟牙髓组织的ECM,以利于牙的发育。研究^[59]表明:与提高种子细胞的成牙能力相比,维持再生ECM生态位的完整性更为重要。

支架是组织工程再生的先决条件之一,已成为目前的研究热点。基于支架的预血管化技术是一种利用合适的支架复制ECM生物微环境的再生策略。支架主要由胶原蛋白、弹性蛋白、整合素和层粘连蛋白组成,为细胞提供生存空间,为组织提供生化支持^[60]。通过模仿受损组织的自然ECM,支架可支持细胞的增殖和分化,以修复受损组织^[61-62]。理想的牙髓组织预血管化支架应满足以下标准:1)良好的生物相容性;2)足够的机械性能,以承受咀嚼力;3)严密封闭牙本质小管,以防止微生物渗透;4)具有可生物降解性,

且不产生有害物质^[8,34]。此外,支架降解的速率也非常重要,应与新组织形成的速率互补。因为支架的降解速度过快会导致支架机械性能急剧下降;同时降解过程可能会使周围环境pH升高或者降低,对周围组织或者细胞产生不利影响;此外,降解过程可能产生气体,在植入部位产生气穴,影响组织的再生或者愈合^[63]。目前已有天然、合成和复合生物材料的各种类型的支架用于牙髓再生研究^[11,64],但如何正确选择支架仍然是牙本质牙髓再生过程中的一个挑战^[65]。

1.3.1 天然支架与合成支架 天然支架是来源于宿主或天然材料的支架。来自宿主的支架有血凝块、自体浓缩血小板和脱细胞ECM^[66-67]。来自天然材料的支架有胶原蛋白、海藻酸、壳聚糖、透明质酸和纤维蛋白^[65,67]。其中,血凝块又可以衍生胶原蛋白、壳聚糖、纤维蛋白、透明质酸、明胶、海藻酸盐、肽基支架等天然物质。天然支架具有优异的生物相容性、仿生特性、可用性和易于转化性(转化为水凝胶)等特点,被视为极具牙齿再生潜力的支架^[20]。合成支架包括:聚乳酸-共乙醇酸、聚乳酸[poly(lactic acid), PLA]等聚合物支架^[66]。合成支架具有无毒性、可生物降解性和良好的机械强度及降解率等优点,具有牙髓组织再生潜力^[6]。与天然支架相比,合成支架是在受控的环境中根据理想的形状生产的,因此可以无限制备,并且符合细胞分化特性,具有特定孔隙特性,以及特定机械、化学和降解率特性^[68-69]。

天然支架存在产品变异、病原体传播风险、机械性能差以及对异物的免疫反应等局限性^[70-71]。天然支架大多通过酶来分解,而合成支架通常通过简单的水解来分解。由于水解后副产物为酸性,因此合成聚合物支架在降解后可能导致局部pH值降低,宿主出现急、慢性炎症^[72]。

综合来看,支架材料不应局限于一种,可以结合天然和合成材料使用,以提供更好的牙髓再生治疗支架。

1.3.2 传统2D支架与新型3D支架 传统2D支架进行牙髓再生存在许多难以解决的问题,如受传统工艺支架形状的限制、可重复性差等。目前3D生物打印技术已逐渐应用于医学领域,具有广阔的应用前景^[73]。3D生物打印技术可以精确控制支架的外部形态和内部微结构,有利于调控细胞的生长和分布,促进细胞在模拟体内组织的3D空间中生长。此外,由于计算机辅助设备可以达到精

确控制,因此3D打印制备的支架具有适度的孔隙率。3D打印支架内部具有多孔结构,有利于营养物质和氧气的渗透,从而为细胞的正常代谢活动提供必要的条件。这种制造方法还可以使所需生物材料或细胞在精确的位置上沉积,从而模仿天然生物系统^[74]。

3D生物打印支架技术是将打印材料一层一层地沉积,最终创建出3D组织再生支架。将3D支架植入适当的活细胞中,这些活细胞会分泌自身的ECM,可以提供一个预血管化的微生态环境。能够打印组织的3D打印机使用的是生物墨水,是一种由活细胞构成的打印材料,与生物墨水混合的有数百万的活细胞,以及促进细胞通信和生长的多种化学物质。有的生物墨水只含有单一类型的细胞,有的含有几种不同类型的细胞,能够形成复杂的结构。生物墨水中的细胞最好来源于自体组织,以避免免疫排斥反应。大部分生物墨水是被称为“水凝胶”的富水分子。天然聚合物具有与ECM相似的天然成分,生物相容性好,可生物降解,是用作生物墨水的最常见的聚合物类型^[75]。合成聚合物的使用也比较广泛。与天然聚合物相比,合成聚合物可以大量生产,保质期更长,具有良好的光交联能力、机械性能、温度可控性等优点^[75];但多数合成聚合物缺乏促进细胞黏附和识别的能力,并且生物降解性和生物相容性有限,限制了其临床应用^[76]。目前在制造仿生组织的生物墨水材料方面,倾向于将天然和合成聚合物二者结合使用,其综合特性更具潜力。

与传统支架相比,3D打印支架更能模拟体内自然细胞的生活环境,促进细胞在体内的增殖和黏附功能。3D生物打印的海藻酸盐/明胶水凝胶(alginate/gelatin hydrogel, Alg-Gel)支架与具有自我更新和多向分化潜力的人DPSC共培养技术,在牙髓组织再生中具有良好的应用前景。Yu等^[77]对比观察了传统2D支架Alg-Gel和3D打印的Alg-Gel水凝胶支架上的细胞形态和细胞分布,结果显示:与2D支架相比,3D打印支架具有100%的连通性,具有更好的细胞黏附性和延伸性;3D支架为细胞营养物质、氧气、废物和生物活性物质的运输提供了合理的微环境,同时具有良好的稳定性。这一结果表明3D打印的Alg-Gel支架更适合细胞黏附和增殖,支架提取物能够更好地促进细胞增殖和分化。

传统2D组织工程支架中的细胞只能在构建材

料表面黏附生长,形成随机的2D单层,因此黏附效率低,且难以实现细胞的合理空间分布^[78]。在3D打印的Alg-Gel支架上,细胞不仅可以黏附在材料表面,还可以在支架内部生长,从而实现细胞的3D培养并模仿相应的ECM微环境。由此可以看出,聚合物支架足够的孔隙度和渗透性对于引导和支持培养细胞产生组织的能力至关重要。合成可生物降解聚合物在组织工程应用中具有挑战性^[7],这可能是未来的研究方向。

2 预血管化技术的局限性与需要解决的问题

虽然目前牙髓组织预血管化的基础理论知识较多,但临床试验相对匮乏,而且多数研究缺乏长期试验的全面信息。组织再生的潜在优势已经比较明确,但临床应用困难,其不良作用及局限性往往被忽视,缺乏深入的临床前和临床研究;而3D生物打印技术仍处于早期研究阶段。在牙髓组织预血管化技术中,还有许多未知因素和需要解决的问题有待探索,以真正明确其应用前景和局限性。

第1个是细胞相关的问题。基于伦理及免疫排斥等方面考虑,最适合的细胞是自体细胞。自体内皮细胞的缺点是来源有限,在体外操作过程中,可能会发生污染,细胞也有向恶性转变的可能,因此需要判断移植物的安全性。在移植过程中,需要解决异质细胞群的处理、耗时的离体自体细胞扩增,以及由于细胞凋亡、炎症和不适当的细胞归巢而导致的植入效率低下等问题。Rao等^[79]提出:嵌入模仿天然ECM的组织工程结构中的细胞可以避免其中一些限制,特别是不适当的细胞归巢,从而可以有效地促进血管生成。此外,选择合适的细胞类型也是需要关注的关键问题。因为内皮细胞具有很强的免疫原性,它呈递Ⅱ类人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)分子,因此患者细胞和用于移植构建的细胞之间进行适当的HLA匹配,产生的免疫抑制较低。在移植过程中使用活体干细胞,也存在一些长期问题,包括细胞的不良谱系、不可预测的分化以及免疫反应等^[80],因此进行干细胞/祖细胞移植时,必须考虑到干细胞/祖细胞移植的潜在不良作用^[81]。

第2个是细胞因子相关的问题。微血管网络的形成高度依赖促进血管生长的生长因子。一项与Deltalike配体4(一种负反馈VEGF调节剂)相关的研究^[82]表明:不受控制的VEGF表达会激活内皮

细胞,从而产生高密度和多分支的微血管,然而这些微血管被定义为“无功能”的微血管,因为它们灌注不良,无法为组织提供营养。由此可见,调节外部生长因子刺激以维持血管生长和灌注至关重要^[73]。此外,血管生成因子在体内表现出高度的可降解性及不稳定性,通过设计生物材料降低生长因子的高降解率是有潜力的技术。

生物工程化的预血管网络在植入体内后常面临免疫排斥或功能整合失败的问题,传统观点认为炎症细胞反应是主要原因。Lin等^[83]的研究发现:宿主的非炎症中性粒细胞(non-inflammatory neutrophils)可能在血管网络的定植过程中发挥积极作用,而非传统认知中的促炎破坏作用。在血管网络植入后,宿主中性粒细胞可分化为非炎症细胞亚群(表型标记如CD62Llow/CD11bhigh)。这些细胞不仅可以通过表达抗炎因子(如白细胞介素10、TGF- β)抑制局部巨噬细胞和T细胞的激活,减少组织损伤,还可通过分泌促血管生成因子(如VEGF、基质金属蛋白酶9)支持血管内皮细胞存活和血管网络重构。这一结果提示:在牙髓组织预血管化构建过程中,不仅需要抑制促炎细胞的活性,还可以充分利用抗炎免疫细胞的作用。还有研究^[22,84]表明:短时间的低氧预调节可以增强促血管生成分子的分泌。此外,在预组装微血管培养过程中,阻断Notch信号传导至少24 h,可以明显增加灌注血管的数量^[83]。

总的来说,在组织工程中利用生长因子的策略目前仍不明确,主要是因为构建体内生长因子递送剂量仍没有确切的标准^[75]。研发不需外源性生长因子加入的预血管化系统可能是未来的发展方向。

第3个是支架相关的问题。虽然聚合物或水凝胶等仿生支架材料为体外组织培养和植入预组装微血管网络提供了良好的平台,但其降解速率难以控制,生物降解产物可能抑制体外培养组织与宿主血管的成功吻合。在预血管化构建过程中,应选择生物相容性较好,降解产物无害,降解速率可控的支架材料。因为支架材料降解时,其机械顺应性的变化会显著影响血管的分化和成熟,因此支架降解的速率应与新组织形成的速率互补^[63]。除了上述要求,适当的机械性能^[8,34]对预血管化构建也非常重要,因此支架的机械性能也是必须重视的因素之一。强度太弱不足以承受咀嚼力,同时无法满足良好的封闭要求;但强度也并非越高越好,具有高机械强度的水凝胶可显著阻

碍内皮细胞的迁移和自组装成毛细管状结构^[77]。

如前所述,天然支架存在产品变异、病原体传播风险、机械性能差以及对异物的免疫反应等局限性^[70-71,85],合成聚合物支架分解后可能导致局部pH值降低,最终导致宿主的慢性或急性炎症^[72]。因为天然和合成支架各有优缺点,所以不应局限于一种材料,即结合天然和合成两种材料,可以提供更好的牙髓再生治疗效果。因为支架不可避免地会涉及上述问题,所以基于细胞的无支架预血管化构建成为研究热点。Qian等^[86]通过数字光处理(digital light processing, DLP)打印机成功制造了负载DPSC的GelMA微球,这些负载细胞的微球具有改良的干细胞特性和更高的多向分化潜力,包括血管生成、神经生成和牙源性分化。综合这些研究结果可以看出:关于支架要解决的问题,首先是结合天然与合成材料,筛选出最优的支架材料;其次是是否选择支架,目前已有学者在研究无支架的预血管化构建。这些都是将来实验室与临床关注的重点问题。

第4个是血管网的液体灌注量问题。尽管目前在开发高度组织化、致密且成熟的微血管网络方面取得了很大的进步,但如何计算和优化通过这些工程化血管网络灌注的液体量也同样重要。研究^[73]表明:保持内皮细胞结构的机械性能,可以为适当的液体灌注提供条件,而灌注引起的剪应力,对吻合后新组装的内皮细胞的生物学行为存在明显影响。对预血管化网络的液体灌注是非常值得关注和探讨的问题。

第5个是3D生物打印相关的问题。3D生物打印在复杂的构建过程和细胞行为稳定性方面仍然面临重大挑战。生物墨水对3D生物打印支架的成功至关重要,应具有理想的物理和生物特性,但目前尚缺乏理想的专业针对牙组织再生的生物墨水。在机械性能方面,生物墨水应具有良好的黏度,以实现构建结构的可印刷性和可重复性,还应具有模拟天然组织机械特性所需的强度和弹性。在生物学特性方面,生物墨水应允许细胞在合适的环境中达到存活、生长和分化的目的^[80]。理想的生物墨水,既能适合打印,又可以使预血管化构建体在整个打印过程中,始终保持高细胞活力。在研究生物墨水的同时,为了更好地模仿天然牙组织并实现功能性牙齿重建,还需要研发具有更高打印分辨率的新型3D打印技术。不同的打印技术各有优缺点。目前组织工程领域最常用的打印

技术是挤出式生物打印(extrusion-based bioprinting),该技术材料易得,成本低廉,但打印精度无法达到激光辅助打印的精度^[75]。此外,打印方法、速度、压力、温度、喷嘴内径等打印参数是决定生物打印支架均匀、连续沉积的重要因素,具有一定的技术敏感性,这些都是亟待解决的问题。

第6个是其他因素。首先,整个过程都需要严格的无菌操作,操作过程中,移植体不仅可能在充填的过程中有损失,而且牙髓腔窄长不利于置入移植体支架。其次,要考虑到经济费用。预血管化的牙髓组织再生涉及到细胞的体外培养、储存、运输,细胞生长因子的加入,支架的设计,包括3D生物打印,整个过程经济成本比较高昂,患者可能会面临高额的费用。最后,将包括活细胞和生物材料在内的3D生物打印组织植入人体,对于人体的安全性和有效性等的长期影响仍未知,这也是目前所面临的极大挑战。由此可见,在将3D生物打印技术应用于人体临床之前,需通过国家指南解决和规范伦理、技术和法律问题,以保护患者的健康。

3 应用前景及展望

牙髓组织的预血管化技术,不仅要保留组织工程脉管系统的高密度和完善的组织结构,还要促进植入后的成功灌注^[84]。尽管将预血管化组织工程转化为临床实践仍需努力,但从目前的研究进展中可以预测,不久的将来有望开发出具有良好功能性、可灌注性和生理规模的工程组织。目前亟需解决的问题是如何加快预血管化牙髓组织再生的临床转化,并制定出相应的治疗标准,如牙髓组织再生的适应证、操作流程及疗效判定标准等。

3D生物打印可以根据患者的特定要求定制再生支架,在将组织工程转化为临床应用方面具有巨大的潜力。虽然目前有关3D打印牙组织的实验室研究进展令人鼓舞,但技术仍不成熟,尚未转化为临床实践。为了弥补实验室和临床应用之间的差距,迫切需要进一步的安全性和功能测试。未来在3D生物打印的研究方面,如何完善3D打印技术和材料是重点关注的内容。

随着生物打印技术的发展,新兴4D打印策略也出现在学者们的研究中。Zhao等^[87]的研究表明:新兴的4D打印能够创建受控制的动态细胞微环境支架,为进一步探索牙齿发生和修复的自然过程

提供了工具。Han等^[88]对血管化3D/4D/5D/6D打印生物材料做了综述,其中包括组织修复和再生中血管化的研究进展,该综述表明:尽管已有许多血管化增材制造支架的成功案例,但普及临床应用仍任重道远。目前的主要任务是加快组织再生工程的临床转化,从而更好地为全人类的健康服务。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

4 参考文献

- [1] Kim JY, Xin XJ, Muioli EK, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(10): 3023-3031.
- [2] Utzinger U, Baggett B, Weiss JA, et al. Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(3): 219-232.
- [3] Dellaquila A, Le Bao C, Letourneur D, et al. *In vitro* strategies to vascularize 3D physiologically relevant models[J]. *Adv Sci*, 2021, 8(19): e2100798.
- [4] Ruan Q, Tan SL, Guo L, et al. Prevascularization techniques for dental pulp regeneration: potential cell sources, intercellular communication and construction strategies[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1186030.
- [5] Guo SW, Redenski I, Landau S, et al. Prevascularized scaffolds bearing human dental pulp stem cells for treating complete spinal cord injury[J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(20): e2000974.
- [6] Xie Z, Shen ZS, Zhan PM, et al. Functional dental pulp regeneration: basic research and clinical translation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8991.
- [7] Sugiaman VK, Jeffrey, Naliani S, et al. Polymeric scaffolds used in dental pulp regeneration by tissue engineering approach[J]. *Polymers*, 2023, 15(5): 1082.
- [8] Kumar JK, Surendranath P, Eswaremoorthy R. Regeneration of immature incisor using platelet rich fibrin: report of a novel clinical application[J]. *BMC Oral Health*, 2023, 23(1): 69.
- [9] Jung C, Kim S, Sun T, et al. Pulp-dentin regeneration: current approaches and challenges[J]. *J Tissue Eng*, 2019, 10: 2041731418819263.
- [10] Siddiqui Z, Acevedo-Jake AM, Griffith A, et al. Cells and material-based strategies for regenerative endodontics[J]. *Bioact Mater*, 2022, 14: 234-249.
- [11] Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(1): 58-75.
- [12] Fagogeni I, Metlerska J, Lipski M, et al. Materials used in regenerative endodontic procedures and their impact on tooth discoloration[J]. *J Oral Sci*, 2019, 61(3): 379-385.
- [13] Nakashima M, Iohara K, Bottino MC, et al. Animal models for stem cell-based pulp regeneration: foundation for human clinical applications[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2019, 25(2): 100-113.
- [14] Labour MN, Le Guilcher C, Aid-Launais R, et al. Development of 3D hepatic constructs within polysaccharide-based scaffolds with tunable properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3644.
- [15] Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract[J]. *Dent Traumatol*, 2001, 17(4): 185-187.
- [16] Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications[J]. *J Dent Res*, 2012, 91(3): 227-234.
- [17] Sugiaman VK, Djuanda R, Pranata N, et al. Tissue engineering with stem cell from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and collagen matrix, regulated by growth factor in regenerating the dental pulp[J]. *Polymers*, 2022, 14(18): 3712.
- [18] Kulebyakin KY, Nimiritsky PP, Makarevich PI. Growth factors in regeneration and regenerative medicine: “the cure and the cause”[J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11: 384.
- [19] Park Y, Huh KM, Kang SW. Applications of biomaterials in 3D cell culture and contributions of 3D cell culture to drug development and basic biomedical research[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2491.
- [20] Jazayeri HE, Lee SM, Kuhn L, et al. Polymeric scaffolds for dental pulp tissue engineering: a review[J]. *Dent Mater*, 2020, 36(2): e47-e58.
- [21] Dissanayaka WL, Zhang CF. The role of vasculature engineering in dental pulp regeneration[J]. *J Endod*, 2017, 43(9S): S102-S106.

- [22] Smirani R, Rémy M, Devillard R, et al. Engineered prevascularization for oral tissue grafting: a systematic review[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2020, 26(4): 383-398.
- [23] Deegan AJ, Hendrikson WJ, El Haj AJ, et al. Regulation of endothelial cell arrangements within hMSC-HUVEC co-cultured aggregates[J]. *Biomed J*, 2019, 42(3): 166-177.
- [24] Lin LM, Ricucci D, Huang GT. Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes[J]. *Int Endod J*, 2014, 47(8): 713-724.
- [25] Wang XJ, Thibodeau B, Trope M, et al. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis [J]. *J Endod*, 2010, 36(1): 56-63.
- [26] Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105⁺ stem cells with stromal cell-derived factor-1[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(15/16): 1911-1920.
- [27] Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 1888-1897.
- [28] 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.
- [29] Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, et al. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold[J]. *Pediatr Dent*, 2008, 30(3): 253-260.
- [30] Wright ME, Yu JK, Jain D, et al. Engineering functional microvessels in synthetic polyurethane random-pore scaffolds by harnessing perfusion flow[J]. *Biomaterials*, 2020, 256: 120183.
- [31] Piard C, Jeyaram A, Liu Y, et al. 3D printed HUVECs/MSCs cocultures impact cellular interactions and angiogenesis depending on cell-cell distance[J]. *Biomaterials*, 2019, 222: 119423.
- [32] Mazio C, Casale C, Imperato G, et al. Pre-vascularized dermis model for fast and functional anastomosis with host vasculature[J]. *Biomaterials*, 2019, 192: 159-170.
- [33] Groger A, Megas IF, Noah EM, et al. Proliferation of endothelial cells (HUVEC) on specific-modified collagen sponges loaded with different growth factors[J]. *Int J Artif Organs*, 2021, 44(11): 880-886.
- [34] Wang Y, Kankala RK, Ou CW, et al. Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening[J]. *Bioact Mater*, 2022, 9: 198-220.
- [35] Harding A, Cortez-Toledo E, Magner NL, et al. Highly efficient differentiation of endothelial cells from pluripotent stem cells requires the MAPK and the PI3K pathways[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(4): 909-919.
- [36] Orti V, Collart-Dutilleul PY, Piglionico S, et al. Pulp regeneration concepts for nonvital teeth: from tissue engineering to clinical approaches[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2018, 24(6): 419-442.
- [37] Zhang WB, Walboomers XF, Shi ST, et al. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(10): 2813-2823.
- [38] Pilbauerova N, Soukup T, Suchankova Kleplová T, et al. The effect of cultivation passaging on the relative telomere length and proliferation capacity of dental pulp stem cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(3): 464.
- [39] Duarte Campos DF, Zhang SY, Kreimendahl F, et al. Hand-held bioprinting for de novo vascular formation applicable to dental pulp regeneration[J]. *Connect Tissue Res*, 2020, 61(2): 205-215.
- [40] Shopova D, Mihaylova A, Yaneva A, et al. Advancing dentistry through bioprinting: personalization of oral tissues[J]. *J Funct Biomater*, 2023, 14(10): 530.
- [41] Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, et al. Survival of the apical papilla and its resident stem cells in a case of advanced pulpal necrosis and apical periodontitis[J]. *J Endod*, 2017, 43(4): 561-567.
- [42] Lin LM, Kim SG, Martin G, et al. Continued root maturation despite persistent apical periodontitis of immature permanent teeth after failed regenerative endodontic therapy[J]. *Aust Endod J*, 2018, 44(3): 292-299.

- [43] Nada OA, El Backly RM. Stem cells from the apical papilla (SCAP) as a tool for endogenous tissue regeneration[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 103.
- [44] Yi BC, Dissanayaka WL, Zhang CF. Growth factors and small-molecule compounds in derivation of endothelial lineages from dental stem cells[J]. *J Endod*, 2020, 46(9S): S63-S70.
- [45] Nowwarote N, Petit S, Ferre FC, et al. Extracellular matrix derived from dental pulp stem cells promotes mineralization[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 740712.
- [46] Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin *in vitro*[J]. *J Endod*, 2006, 32(11): 1066-1073.
- [47] Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(5/6): 435-440.
- [48] Katata C, Sasaki JI, Li A, et al. Fabrication of vascularized DPSC constructs for efficient pulp regeneration[J]. *J Dent Res*, 2021, 100(12): 1351-1358.
- [49] Driesen RB, Gervois P, Vangansewinkel T, et al. Unraveling the role of the apical papilla during dental root maturation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 665600.
- [50] Liu Q, Gao Y, He JZ. Stem cells from the apical papilla (SCAPs): past, present, prospects, and challenges[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(7): 2047.
- [51] Ferrúa CP, Centeno EGZ, Rosa LCD, et al. How has dental pulp stem cells isolation been conducted? A scoping review[J]. *Braz Oral Res*, 2017, 31: e87.
- [52] Liu P, Zhang YX, Ma YJ, et al. Application of dental pulp stem cells in oral maxillofacial tissue engineering[J]. *Int J Med Sci*, 2022, 19(2): 310-320.
- [53] Iohara K, Nakashima M, Ito M, et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2[J]. *J Dent Res*, 2004, 83(8): 590-595.
- [54] Yang XC, Walboomers XF, van den Beucken JJJP, et al. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells *in vivo*[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2): 367-375.
- [55] Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration[J]. *Oral Dis*, 2018, 24(5): 696-705.
- [56] Jang JH, Shin HW, Lee JM, et al. An overview of pathogen recognition receptors for innate immunity in dental pulp[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 794143.
- [57] Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2): 159-178.
- [58] Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy[J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2019, 55(1): 5-11.
- [59] Zhang XX, Li H, Sun JJ, et al. Cell-derived microenvironment helps dental pulp stem cells promote dental pulp regeneration[J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(5): e12361.
- [60] El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: progress and challenges[J]. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2013, 2013(3): 316-342.
- [61] Kniebs C, Kreimendahl F, Köpf M, et al. Influence of different cell types and sources on pre-vascularisation in fibrin and agarose-collagen gels[J]. *Organogenesis*, 2020, 16(1): 14-26.
- [62] Masson-Meyers DS, Tabatabaei F, Steinhaus L, et al. Development of fibroblast/endothelial cell-seeded collagen scaffolds for *in vitro* prevascularization [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2023, 111(3): 633-645.
- [63] Putra RU, Basri H, Prakoso AT, et al. Level of activity changes increases the fatigue life of the porous magnesium scaffold, as observed in dynamic immersion tests, over time[J]. *Sustainability*, 2023, 15(1): 823.
- [64] Kafili G, Niknejad H, Tamjid E, et al. Amnion-derived hydrogels as a versatile platform for regenerative therapy: from lab to market[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1358977.
- [65] Jang JH, Moon JH, Kim SG, et al. Pulp regeneration with hemostatic matrices as a scaffold in an immature tooth minipig model[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12536.
- [66] Srivastava S. Current and future perspectives for

- dentin-pulp tissue engineering—an update[J]. *South African Dent J*, 2019, 74(3). doi: 10.17159/2519-0105/2019/V74NO3A1.
- [67] Liu H, Lu J, Jiang QZ, et al. Biomaterial scaffolds for clinical procedures in endodontic regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2021, 12: 257-277.
- [68] Suamte L, Tirkey A, Babu PJ. Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications[J]. *Smart Mater Med*, 2023, 4: 243-256.
- [69] Tran TT, Hamid ZA, Cheong KY. A review of mechanical properties of scaffold in tissue engineering: aloe vera composites[J]. *J Phys: Conf Ser*, 2018, 1082: 012080.
- [70] Raddall G, Mello I, Leung BM. Biomaterials and scaffold design strategies for regenerative endodontic therapy[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 317.
- [71] Nowicka A, Miller-Burchacka M, Lichota D, et al. Tissue engineering application in regenerative endodontics[J]. *Pomeranian J Life Sci*, 2021, 67: 10-17.
- [72] Reddy MB, Ponnamma D, Choudhary R, et al. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds[J]. *Polymers*, 2021, 13(7): 1105.
- [73] Sharma D, Ross D, Wang GF, et al. Upgrading prevascularization in tissue engineering: a review of strategies for promoting highly organized microvascular network formation[J]. *Acta Biomater*, 2019, 95: 112-130.
- [74] de Santis MM, Alsafadi HN, Tas S, et al. Extracellular-matrix-reinforced bioinks for 3D bioprinting human tissue[J]. *Adv Mater*, 2021, 33(3): e2005476.
- [75] Mohd N, Razali M, Ghazali MJ, et al. Current advances of three-dimensional bioprinting application in dentistry: a scoping review[J]. *Materials (Basel)*, 2022, 15(18): 6398.
- [76] Tavelli L, McGuire MK, Zucchelli G, et al. Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration[J]. *J Periodontol*, 2020, 91(1): 17-25.
- [77] Yu HY, Zhang XY, Song WJ, 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.
- [78] Billiet T, Vandenhaute M, Schelfhout J, et al. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(26): 6020-6041.
- [79] Rao DA, Pober JS. Endothelial injury, alarmins, and allograft rejection[J]. *Crit Rev Immunol*, 2008, 28(3): 229-248.
- [80] Mohd N, Razali M, Fauzi MB, et al. *In vitro* and *in vivo* biological assessments of 3D-bioprinted scaffolds for dental applications[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12881.
- [81] Ahmed GM, Abouauf EA, AbuBakr N, et al. Tissue engineering approaches for enamel, dentin, and pulp regeneration: an update[J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 5734539.
- [82] Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1032-1037.
- [83] Lin RZ, Lee CN, Moreno-Luna R, et al. Host non-inflammatory neutrophils mediate the engraftment of bioengineered vascular networks[J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 0081.
- [84] 覃思文, 廖立. 牙髓再生中血管网络重建策略[J]. *国际口腔医学杂志*, 2022, 49(3): 272-282.
- Qin SW, Liao L. Strategies of vascularization in dental pulp regeneration[J]. *Int J Stomatol*, 2022, 49(3): 272-282.
- [85] Whitaker R, Hernaez-Estrada B, Hernandez RM, et al. Immunomodulatory biomaterials for tissue repair [J]. *Chem Rev*, 2021, 121(18): 11305-11335.
- [86] Qian Y, Gong JX, Lu KJ, et al. DLP printed hDPSC-loaded GelMA microsphere regenerates dental pulp and repairs spinal cord[J]. *Biomaterials*, 2023, 299: 122137.
- [87] Zhao FX, Zhang ZJ, Guo WH. The 3-dimensional printing for dental tissue regeneration: the state of the art and future challenges[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1356580.
- [88] Han XY, Saiding Q, Cai XL, et al. Intelligent vascularized 3D/4D/5D/6D-printed tissue scaffolds[J]. *Nanomicro Lett*, 2023, 15(1): 239.