利用细胞膜片技术进行牙周重建的研究进展

边东潇 包幸福 邬浩 胡敏

吉林大学口腔医院, 长春 130021

通信作者: 胡敏, Email: humin@jlu.edu.cn

【摘要】 牙周炎是人类牙齿缺失的最主要病因, 危害人类口腔及全身健康。牙周再生的目标是再生牙周组织和重建功能性牙槽骨-牙周膜-牙骨质牙周复合体。随着组织工程学和牙周再生技术的发展, 细胞膜片技术的出现为牙周重建提供了新思路。现就细胞膜片技术在细胞膜片构建和不同来源种子细胞两方面的研究进展作一综述。

【关键词】 细胞膜片技术; 牙周重建; 牙周复合体; 干细胞

基金项目: 国家自然科学基金(81870795); 吉林省科技发展计划(20200201307JC)

引用著录格式: 边东潇, 包幸福, 邬浩, 等. 利用细胞膜片技术进行牙周重建的研究进展[JOL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2021, 15(2): 119-123.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.02.010

Advances in periodontal reconstruction using cell sheet technology

Bian Dongxiao, Bao Xingfu, Wu Hao, Hu Min

Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China

Corresponding author: Hu Min, Email: humin@jlu.edu.cn

【Abstract】 Periodontal disease is a principal cause of tooth loss in humans, which can affect oral health even general health. The goal of periodontal regeneration is to regenerate the periodontal tissue and reconstruct the functional alveolar bone - periodontal ligament - cementum periodontal complex. With the development of tissue engineering and periodontal regeneration technology, the emergence of cell sheet technology provides a new idea for periodontal reconstruction. This paper reviews the progress of cell sheet technology in the construction of cell sheet and seed cells from different sources.

【Key words】 Cell sheet technology; Periodontal reconstruction; Periodontal complex; Stem cell

Fund programs: National Natural Science Foundation of China(81870795); Science and Technology Development Plan Project of Jilin Province(20200201307JC)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.02.010

牙周炎(periodontal disease)为牙周支持组织的慢性炎症

疾病, 主要表现为牙周组织的渐进性牙周附着丧失和牙槽骨吸收。牙周组织包括牙槽骨、牙周膜、牙骨质, 牙周软硬组织完整精细地组成了牙周复合体(periodontal complex), 使牙齿悬吊在牙槽窝内并形成一种感知、反馈、缓冲咬合力的系统。牙周组织受到破坏后难以修复并重建其功能。由于牙周炎病损部位长期处于炎症环境, 修复功能受损, 牙周再生难度进一步加大。临床上是以长结合方式修复牙周组织, 这种修复虽然恢复了组织的连续性, 控制了炎症的进展, 但并未真正恢复牙周组织的结构和功能即牙周复合体的重建。理想的牙周再生包括牙根上牙骨质、牙槽骨的再生, 新生的Sharpey's纤维嵌入固有牙槽骨与牙骨质中。细胞膜片技术(cell sheet technology, CST)作为一种新的细胞传递方式, 在牙周再生研究中取得了一定成果^[1-4]。本文就细胞膜片技术在牙周组织工程中的研究进展进行综述。

一、细胞膜片技术

1993年, Okano^[5]报道了CST, 该技术不需要蛋白酶的消化和外源性支架材料, 通过细胞外基质、细胞-基质连接及细胞间连接形成膜片, 将细胞膜片从培养皿底壁完整分离, 将其用于修复组织缺损和改善器官功能。近年来, 组织工程学取得很大进步, 但仍存在种子细胞流失、支架材料引起炎症反应、细胞与支架相互作用缺乏控制, 细胞膜片机械性能不足、深层部位的干细胞容易坏死等缺点, 而CST是将种子细胞在一定条件下连续培养, 诱使其形成单层或多层细胞片层, 产生大量细胞外基质作为自源性支架, 其中的结构性蛋白和功能性蛋白为种子细胞的发育及分化提供了良好的微环境, 膜片上的黏附蛋白更好的促使种子细胞最大程度发挥干细胞特性^[6]。

二、细胞膜片构建

1. 温度响应培养法: Okano^[5]将温度响应聚合物聚N-异丙基丙烯酰胺[poly(N-isopropyl acrylamide), PIPAAm]共价结合至普通培养基上, 形成温度响应培养皿。在高于32℃条件下培养细胞, PIPAAm表现为疏水性, 有利于细胞黏附生长; 在温度低于32℃时, PIPAAm表现为亲水性, 细胞膜片即与培养皿分离, 收获的细胞膜片在基底侧仍维持细胞间结合蛋白和黏附蛋白。此法保证了膜片结构完整, 但需要特殊培养皿, 价格昂贵且操作较复杂。

2. 磁力法: 将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)结合磁性阳离子脂质体添加至由亲水性、中性的共价水凝胶层组成培养皿表面, 培养皿下置磁铁培养。种子细胞

增殖延展成细胞片后移去磁铁,由于细胞膜片中有拥有超顺磁性、生物相容性、无毒性的磁性纳米粒子,可在无酶的作用下以磁力将膜片从培养皿分离^[7-8]。在医学再生领域,通过基于磁力的组织工程技术(Mag-TE)创建的细胞膜片已被用于许多器官的再生,包括皮肤、骨骼、肝脏和心脏。

3. 直接刮取法:将种子细胞与富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)混合接种于普通培养皿,待膜片形成后直接沿培养皿底部用细胞刮刮取。此法获取膜片操作简单方便,但存在机械性损伤。Xu等^[9]评估了不同剂量的PRP对牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cell, PDLSC)分化的影响。结果显示,1% PRP介导PDLSC片表现出更好的牙周组织再生能力,将PRP应用于PDLSC片中可增强细胞分化和基质产生。

4. 维生素C法:维生素C可促进细胞分泌细胞外基质,使细胞膜片增厚,可直接用细胞刮铲起膜片。Wei等^[10]的研究表明,维生素C能够诱导PDLSC端粒酶活性,从而导致细胞外I型胶原、纤维连接蛋白、整合素 β 1、干细胞特异性标志物以及成骨标志蛋白的表达上调,这对种子细胞的分化起到促进作用。此法易于操作,材料简单,获得的细胞膜片细胞外基质丰富,弹性和机械性能良好,因此维生素C法成为目前应用较多的方法之一。

5. 聚合电解质法:Guillaume-Gentil等^[11]提出了一种细胞膜片制备的电响应系统。对生长在聚合电解质薄膜表面上的细胞膜片,在电化学控制下改变其表面的极化状态,解除膜片的黏附状态。此法可避免细胞机械性损伤,但需要特殊的材料与设备,且电化学可能对细胞周期以及蛋白表达存在影响。

6. 胶原凝胶法:将种子细胞培养在鲑鱼胶原凝胶(SAC gel)上,胶原酶消化2 h后即获得收缩的细胞膜片。研究显示,此法中胶原酶不会影响细胞活性,细胞骨架和纤维蛋白基质水平保持不变,并且鲑鱼胶原凝胶可促进细胞增殖,有利于细胞膜片形成^[12]。

7. 光控法:将RGD通过简单的物理吸附方法固定在TiO₂纳米点薄膜上,UV365照射30 min即可收获膜片。实验显示,紫外光照射下收获的细胞在RGD固定化的TiO₂纳米点膜上表现出良好的活性^[13]。此法可以促进细胞增殖,是一种安全有效的细胞片构建方法。

三、种子细胞

1. 牙源性干细胞:包括PDLSC、牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)、牙龈间充质干细胞(gingival mesenchymal stem cell, GMSC)、牙囊干细胞(dental follicle progenitor cell, DFC)、脱落乳牙干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)和根尖乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP)等。

(1)牙周膜干细胞:PDLSC作为具有高度更新能力、高度增殖能力、多向分化能力且容易获得而作为牙周组织工程的常用种子细胞。PDLSC是一种异质性多能干细胞,可以分化为成骨细胞、成纤维细胞、成牙骨质细胞,形成牙槽骨、牙周

纤维、牙骨质结构,这些结构形成的功能性牙周复合体对牙周重建有重要意义^[14]。目前,多层细胞膜片构建技术已经较为成熟,而细胞缺氧是亟待解决的问题,因此细胞膜片中血管再生成为热门研究。Panduwawala等^[15]将以PDLSC和人脐静脉内皮细胞制备的复层细胞膜片结构植入到免疫缺陷大鼠的背部皮下,观察到牙周纤维垂直插入新沉积的牙骨质样层以及新生的牙槽骨,血管数量显著增加,在新形成的血管腔中存在红细胞证明了新形成的血管结构与宿主血管系统之间的相互联系。Ding等^[16]将人类PDLSC膜片移植到猪牙周炎模型,促进了牙周再生并且无明显免疫排斥反应。该实验表明,人类PDLSC具有低免疫原性,无法表达人类白细胞抗原(HLA)-II DR和共刺激分子,并且抑制T细胞增殖,这为异源性细胞膜片移植提供了理论基础。Tang等^[17]发现,以适当比例共培养分别来自健康牙周和牙周病来源的PDLSC可使细胞快速扩增并保留细胞分化,提高了总体成骨和再生潜能。PDLSC虽然成骨效果可靠但来源有限,需要从拔除牙齿上获得,从而限制了其在临床上的运用,而Park等^[18]发现只要从发炎的牙周组织中获取炎症肉芽组织就可分离培养PDLSC,且其与健康牙周来源的PDLSC的增殖与分化能力没有显著区别,代表一种全新易得的PDLSC来源,为临床应用提供新思路。

(2)牙髓干细胞:DPSC是一种成体多能干细胞,具有很强的自我更新能力和修复能力。Pedroni等^[19]的实验证明了细胞膜片中的DPSC保留了其干细胞特性和成骨分化潜能,其免疫原性低、高度增殖能力、高分化能力使DPSC膜片特别适用于严重的骨缺损修复。Hu等^[20]将人DPSC膜片植入猪牙周炎模型,显著改善了牙周骨再生和软组织愈合,这为DPSC膜片植入炎性牙周环境以重建牙周提供了实验基础。Cao等^[21]将腺病毒介导的肝细胞生长因子基因转化的人DPSC的细胞膜片植入猪牙周炎模型病灶,与注射游离细胞相比显示了更好的牙周组织再生结果,并且发现腺病毒介导的HGF基因转化可显著降低缺氧环境或无血清培养基中DPSC的凋亡,并促进血管再生。

(3)牙龈间充质干细胞:GMSC来自牙龈固有层,具有自我更新,多向分化的能力,同时还可产生营养因子。有学者研究显示,GMSC能够分化为成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞并证明了其遗传稳定性和缺乏致瘤性^[22]。Vaquette等^[23]用熔融和溶液静电纺丝制造双相支架,分别递送GMSC,骨髓基质细胞和牙周膜细胞三种来源的体外成熟细胞片。该研究表明,通过多相构建体可以实现牙周再生,并且与牙龈间充质干细胞相比,GMSC和PDLSC可获得更好的牙周再生。牙龈间充质细胞易于获得,患者接受率高,但目前未显示出其在牙周再生方面的优越性。

(4)牙囊干细胞:DFC是一类起源于牙囊具备自我更新和多向分化潜能的成体干细胞,能够分化成成牙骨质细胞、牙周膜细胞和成骨细胞。Morsczech等^[24]将人类DFC与基质干细胞相比,发现DFC表达的胰岛素样生长因子2(IGF-2)转录数量更多,在体外条件下证明了DFC的分化能力。Yang

等^[25]将牙本质基质颗粒与DFC膜片结合,发现与羟基磷灰石/ β -磷酸三钙(hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate, HA/ β -TCP)相比,牙本质基质颗粒组DFC的增殖分化能力更强,显示出更好的牙周再生,提示牙本质基质颗粒是较理想的天然支架材料。Guo等^[26]将由PDLSC膜片与牙本质管组成的复合物、DFC膜片与牙本质管组成的复合物植入裸鼠皮下6周,结果显示二者均可再生牙周组织样结构,但DFC比牙周干细胞具有更强的牙周再生潜力,提示从拔除牙废弃的牙囊中提取的DFC可能更有利于牙周组织再生。

(5)脱落乳牙干细胞:SHED为能够分化为包括神经细胞、脂肪细胞和成牙本质细胞多种细胞类型的高度增殖的克隆细胞,还有免疫调节和促进伤口愈合功能,是牙周组织工程理想的种子细胞^[27]。Ma等^[28]发现从冷冻保存25~30个月的乳牙髓组织中分离的SHED和从新鲜组织分离的SHED具有相似的干细胞特性,包括克隆形成能力,自我更新,干细胞标志物表达,干细胞多能性,体内组织再生能力和免疫调节功能。可见低温保存的人脱落乳牙髓组织是牙周组织工程实用的细胞来源。Werle等^[29]的研究显示,龋坏乳牙牙髓内分离出的干细胞表现出与正常乳牙相似的增殖、免疫表型特征和分化能力,推测龋坏乳牙牙髓也是干细胞的可行来源,但仍需要进一步实验验证。

(6)根尖牙乳头干细胞:SCAP来源于年轻恒牙根尖发育中的牙乳头组织,是发育形成牙髓和牙本质的前体细胞。Hu等^[30]对比了三种不同细胞来源细胞膜片的再生特性,结果显示来自DPSC膜片的组织具有疏松排列的结缔组织纤维,富含血管,与牙髓相似;来自PDLSC膜片的组织中,纤维显示出明显的方向性,尽管没有明显的血管再生,但显示纤维排列相对疏松;来自SCAP膜片的组织中观察到更多的矿物组织再生。Fu等^[31]将同种异体猪来源的SCAP培养为细胞膜片,植入猪牙周炎模型,有效促进了牙周软硬组织再生。但目前利用SCAP膜片培养分化出类似牙周复合体的报道罕见。

2. 非牙源性干细胞:包括骨髓基质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)和脂肪干细胞(adipose derived stem cell, ASC)。

(1)骨髓基质干细胞:BMSC在特定条件下可分化为各种间充质干细胞,包括成骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、内皮细胞等。不同的巨噬细胞表型对BMSC的体外增殖、分化和基质产生有不同的影响。He等^[32]发现由M1型巨噬细胞产生的条件培养(conditioned medium, CM)处理组(CM1)介质促进了细胞增殖和基质产生,但细胞的成骨潜能受损严重;M0型巨噬细胞的CM处理组(CM0)介质增强了细胞的成骨性,但膜片的形成能力降低;M2型巨噬细胞的CM处理组(CM2)不仅促进细胞成骨分化,还可促进形成坚固的细胞膜片。提示,M0、M1和M2型巨噬细胞的适当平衡产生的介质最有可能增强干细胞的行为并促进组织再生。Cai等^[33]研究了骨髓间充质干细胞植入前分化方法对体内牙周再生的影响。在保留多向分化潜能、促成骨分化、促软骨分化的三种

不同体外条件下进行预培养,结果显示促软骨分化方法更好地促进了牙槽骨和牙周膜再生,多向分化方法仅支持牙周膜再生,而成骨分化方法则可促进牙槽骨再生。BMSC从骨髓中获得,取材过程痛苦,患者接受率低,自我更新和分化潜能有限,以上缺点限制了BMSC在未来的牙周再生治疗中的临床应用。

(2)脂肪干细胞:ASC是一种从脂肪组织中分离提取的成体干细胞。Sugawara等^[34]在大鼠牙周炎模型中利用ASC膜片进行了牙周组织再生,验证了ASC的分化多向性,可见ASC是牙周组织再生新的有效细胞来源。Akita等^[35]将鼠ASC与聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]支架组合并移植到SD大鼠牙周开窗缺损中,结果实验组的骨、牙周膜和牙骨质层的生长均较对照组厚,该结果证明ASC有着显著修复牙周缺损的能力。Ding等^[36]将富血小板纤维蛋白与ASC膜片结合,与对照组相比,富血小板纤维蛋白提高了ASC的增殖和成骨能力。Silva等^[37]在未补充主要的成骨分化因子,例如地塞米松、抗坏血酸和 β -甘油磷酸酯的情况下将两层磁化的ASC膜片中间加入人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)构成3D细胞膜片并植入裸鼠皮下,发现异型构型(ASC/HUVEC/ASC)较同型构型(ASC/ASC)成骨能力增强,并观察到血管样组织,该结果表明,即使没有添加成骨分化因子,成骨作用也可由于HUVEC和ASC的协同作用实现。ASC分化潜能良好,其微创性获得方式易被患者接受,拥有广阔的发展前景^[38-39]。

四、小结

利用CST已证明可促进牙周组织再生,不同来源的干细胞膜片在诱导过程中显示出向多向分化的能力,但其各自的分化能力仍存在差异,且保留了向组织源方向分化的倾向性。多种因素可以影响干细胞分化,如细胞因子、温度、培养皿表面形态、支架材料,影响细胞膜片中干细胞分化的信号通路调控机制仍需进一步探索。目前的研究显示已经可以再生类似牙周复合体结构,但这种结构能否承受、缓冲咬合力,起到生物学功能仍缺乏实验支持。CST大大提高了种子细胞的利用率,为实现功能性牙周重建带来希望。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Park CH, Kim KH, Lee YM, et al. Advanced Engineering Strategies for Periodontal Complex Regeneration [J]. *Materials*, 2016, 9(1):57. DOI: 10.3390/ma9010057.
- [2] 田卫东. 基于干细胞的牙功能组织模块用于牙及其支持组织再生[J]. *中华口腔医学杂志*, 2017, 52(10):588-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2017.10.002.
- [3] Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, et al. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:28126. DOI: 10.1038/srep28126.
- [4] Wu M, Wang J, Zhang Y, et al. Mineralization Induction of

- Gingival Fibroblasts and Construction of a Sandwich Tissue - Engineered Complex for Repairing Periodontal Defects [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 1112-1123. DOI:10.12659/MSM.908791.
- [5] Okano T. Molecular Design of Temperature-Responsive Polymers as Intelligent Materials [J]. *Advances in Polymer Science*, 1993, 110: 180-197. DOI:10.1007/BFb0021133.
- [6] Carter SSD, Costa PF, Vaquette C, et al. Additive Biomanufacturing: An Advanced Approach for Periodontal Tissue Regeneration [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2017, 45 (1) : 12-22. DOI:10.1007/s10439-016-1687-2.
- [7] Ito A, Ino K, Kobayashi T, et al. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(31) : 6185-6193. DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.03.039.
- [8] Wataru K, Yoshinori S, Kazuyuki K, et al. Porcine Dental Epithelial Cells Differentiated in a Cell Sheet Constructed by Magnetic Nanotechnology [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, 7 (10):322. DOI:10.3390/nano7100322.
- [9] Xu Q, Li B, Yuan L, et al. Combination of platelet-rich plasma within periodontal ligament stem cell sheets enhances cell differentiation and matrix production [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(3):627-636. DOI:10.1002/term.1953.
- [10] Wei F, Qu C, Song T, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9) : 3216-3224. DOI:10.1002/jcp.24012.
- [11] Guillaume-Gentil O, Akiyama Y, Schuler M, et al. Polyelectrolyte Coatings with a Potential for Electronic Control and Cell Sheet Engineering [J]. *Advanced Materials*, 2008, 20(3) : 560-565. DOI:10.1002/adma.200700758.
- [12] Nobuhiro N, Shunji Y, Yasuharu S, et al. A method of cell-sheet preparation using collagenase digestion of salmon atelocollagen fibrillar gel [J]. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98(6) : 493-496. DOI: 10.1016/S1389-1723(05)00319-1.
- [13] Cheng K, Wang T, Yu M, et al. Effects of RGD immobilization on light-induced cell sheet detachment from TiO₂ nanodots films [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 63: 240-246. DOI: 10.1016/j.msec.2016.02.072.
- [14] Liu J, Zhao Z, Ruan J, et al. Stem cells in the periodontal ligament differentiated into osteogenic, fibrogenic and cementogenic lineages for the regeneration of the periodontal complex [J]. *J Dent*, 2019, 92: 103259. DOI: 10.1016/j.jdent.2019.103259.
- [15] Panduwawala CP, Zhan X, Dissanayaka WL, et al. In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs [J]. *J Periodontol Res*, 2016, 52(3) : 408-418. DOI: 10.1111/jre.12405.
- [16] Ding G, Liu Y, Wang W, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(10) : 1829-1838. DOI:10.1002/stem.512.
- [17] Tang HN, Xia Y, Jie X, et al. Assessment of cellular materials generated by co-cultured 'inflamed' and healthy periodontal ligament stem cells from patient-matched groups [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 346(1) : 119-129. DOI:10.1016/j.yexcr.2016.05.003.
- [18] Park JC, Kim JM, Jung IH, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations [J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38(8) : 721-731. DOI: 10.1111/j.1600-051x.2011.01716.x.
- [19] Pedroni ACF, Sarra G, de Oliveira NK, et al. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement [J]. *Clin Oral Investig*, 2018, 23(6) : 2713-2721. DOI:10.1007/s00784-018-2630-8.
- [20] Hu J, Cao Y, Xie Y, et al. Periodontal regeneration in swine after cell injection and cell sheet transplantation of human dental pulp stem cells following good manufacturing practice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1) : 130. DOI: 10.1186/s13287-016-0362-8.
- [21] Cao Y, Liu Z, Xie Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1):249. DOI:10.1186/s13287-015-0244-5.
- [22] Santamaría S, Sanchez N, Sanz M, et al. Comparison of periodontal ligament and gingiva-derived mesenchymal stem cells for regenerative therapies [J]. *Clin Oral Investig*, 2017, 21(4) : 1095-1102. DOI:10.1007/s00784-016-1867-3.
- [23] Vaquette C, Saifzadeh S, Farag A, et al. Periodontal Tissue Engineering with a Multiphasic Construct and Cell Sheets [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(6) : 673-681. DOI: 10.1177/0022034519837967.
- [24] Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth [J]. *Matrix Biol*, 2005, 24(2) : 155-165. DOI: 10.1016/j.matbio.2004.12.004.
- [25] Yang H, Li J, Hu Y, et al. Treated dentin matrix particles combined with dental follicle cell sheet stimulate periodontal regeneration [J]. *Dent Mater*, 2019, 35: 1238-1253. DOI: 10.1016/j.dental.2019.05.016.
- [26] 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 [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(6) : 1061-1073. DOI:10.3727/096368912x656036.
- [27] Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(10) : 5807-5812. DOI:10.1073/pnas.0937635100.
- [28] Ma L, Yusuke M, Haruyoshi Y, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12) : e51777. DOI:10.1371/journal.pone.0051777.
- [29] Werle SB, Lindemann D, Steffens D, et al. Carious deciduous

- teeth are a potential source for dental pulp stem cells [J]. Clin Oral Investig, 2015, 20(1): 75-81. DOI: 10.1007/s00784-015-1477-5.
- [30] Hu L, Zhao B, Gao Z, et al. Regeneration characteristics of different dental derived stem cell sheets [J]. J Oral Rehabil, 2019, 00: 1-7. DOI: 10.1111/joor.12839.
- [31] Fu X, Jin L, Ma P, et al. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine [J]. J Periodontol, 2014, 85(6): 845-851. DOI: 10.1902/jop.2013.130254.
- [32] He XT, Li X, Yin Y, et al. The effects of conditioned media generated by polarized macrophages on the cellular behaviours of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. J Cell Mol Med, 2017, 22(2): 1302-1315. DOI: 10.1111/jcmm.13431.
- [33] Cai X, Yang F, Yan X, et al. Influence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells pre-implantation differentiation approach on periodontal regeneration in vivo [J]. J Clin Periodontol, 2015, 42(4): 380-389. DOI: 10.1111/jcpe.12379.
- [34] Sugawara A, Sato S. Application of dedifferentiated fat cells for periodontal tissue regeneration [J]. Human Cell, 2014, 27(1): 12-21. DOI: 10.1007/s13577-013-0075-6.
- [35] Akita D, Morokuma M, Saito Y, et al. Periodontal tissue regeneration by transplantation of rat adipose-derived stromal cells in combination with PLGA-based solid scaffolds [J]. Biomed Res, 2014, 35(2): 91-103. DOI: 10.2220/biomedres.35.91.
- [36] Ding L, Tang S, Liang P, et al. Bone Regeneration of Canine Peri-implant Defects Using Cell Sheets of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Fibrin Membranes [J]. J Oral Maxillofac Surg, 2019, 77(3): 499-514. DOI: 10.1016/j.joms.2018.10.018.
- [37] Silva AS, Santos LF, Mendes MC, et al. Multi-layer pre-vascularized magnetic cell sheets for bone regeneration [J]. Biomaterials, 2020, 231: 119664. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119664.
- [38] Akita D, Kano K, Saito-Tamura Y, et al. Use of Rat Mature Adipocyte-Derived Dedifferentiated Fat Cells as a Cell Source for Periodontal Tissue Regeneration [J]. Front Physiol, 2016, 7: 50. DOI: 10.3389/fphys.2016.00050.
- [39] Suzuki D, Akita D, Tsurumachi N, et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells into three-wall defects in the rat periodontium induces tissue regeneration [J]. J Oral Sci, 2017, 59(4): 611-620. DOI: 10.2334/josnusd.16-0878.

(收稿日期: 2020-08-10)

(本文编辑: 王嫚)