

干细胞微球在牙髓再生领域的研究进展

王晓怡 孙喆轶 霍丽珺

昆明医科大学附属口腔医院牙体牙髓病科, 云南省口腔医学重点实验室, 昆明 650106

通信作者: 霍丽珺, Email: huolijun1039@kmmu.edu.cn



霍丽珺

【摘要】 牙髓及根尖周病是口腔多发病,但目前临床常用治疗方法均存在一定局限。牙髓功能性再生逐步成为口腔医学研究的重点与热点,其中干细胞移植技术尤为关键。相较于单细胞移植,干细胞微球可提升移植后细胞存活率;同时,与二维培养相比,微球能更精准地模拟体内微环境,维持干细胞更优异的生物学特性,在组织

再生中展现出巨大潜力。本文系统概述干细胞微球的结构、形成机制和影响因素,重点总结其在牙髓再生领域的研究进展,分析现存挑战与发展方向,为其后续基础研究与临床转化提供参考。

【关键词】 微球; 干细胞; 牙髓再生; 三维细胞培养; 再生医学

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金(2023Y0664); 云南省科技厅科技计划(202201AY070001-171); 云南省级临床医学中心科研项目(2024YNLCYXZX0307)

引用著录格式: 王晓怡, 孙喆轶, 霍丽珺. 干细胞微球在牙髓再生领域的研究进展[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2026, 20(5): 383-388.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.119285-20260410-00037

Research progress on stem cell spheroids in the field of dental pulp regeneration

Wang Xiaoyi, Sun Zheyi, Huo Lijun

Department of Endodontics, Kunming Medical University Affiliated Stomatological Hospital, Yunnan Key Laboratory of Stomatology, Kunming 650106, China

Corresponding author: Huo Lijun, Email: huolijun1039@kmmu.edu.cn

【Abstract】 Pulp and periapical diseases are prevalent conditions in dentistry, yet current clinical treatment approaches all exhibit certain limitations. Functional regeneration of dental pulp has progressively become a focal point and hot topic in oral medicine research, with stem cell transplantation technology being particularly significant. Compared to single-cell

transplantation, stem cell spheroids can enhance post-transplantation cell survival rates; simultaneously, compared to two-dimensional culture, spheroids more accurately mimic the *in vivo* microenvironment, maintaining superior biological properties of stem cells and demonstrating significant potential in tissue regeneration. This article systematically reviews the structure, formation mechanism, and influencing factors of stem cell spheroids, with a particular emphasis on summarizing research progress in the field of pulp regeneration. It analyses existing challenges and future directions, providing a reference for subsequent basic research and clinical translation.

【Key words】 Spheroids; Stem cells; Dental pulp regeneration; Three-dimensional cell culture; Regenerative medicine

Fund programs: Scientific Research Fund of Yunnan Provincial Department of Education (2023Y0664); Science and Technology Program of Yunnan Provincial Department of Science and Technology (202201AY070001-171); Scientific Research Project of Yunnan Provincial Clinical Medical Center (2024YNLCYXZX0307)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.119285-20260410-00037

牙髓对牙体组织至关重要,当牙髓遭受创伤或细菌侵袭时,易引发不可逆的牙髓及根尖周疾病。长期以来,临床治疗的核心目标集中于感染控制与症状消除,根管治疗虽能控制感染,但需彻底去除牙髓组织,导致牙齿丧失营养供应、剩余牙体组织脆性增加且未成熟恒牙难以继续发育;而活髓切断术、牙髓血运重建术等保留牙髓的方法,虽可部分维持牙髓功能,但适应证较为严格,且再生的组织多为骨样或牙骨质样结构,并非真正意义上的功能性牙髓组织^[1-2]。如何最大程度保留或重建牙髓的生物学功能,始终是牙髓病学领域的重要挑战。随着组织工程与再生医学的发展,干细胞移植策略为牙髓再生提供了新思路。研究者将体外扩增的牙源性干细胞移植入根管系统后,所再生的牙髓在临

床测试中的反应与正常牙髓相似,展现出良好的牙髓样组织再生潜力^[1,3-5]。然而,传统单细胞悬液移植模式在细胞存活、细胞间信号交流、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)支持及早期血管化等方面存在明显局限。如何使移植细胞在根管这一特殊的三维微环境中“存活下来、组织起来并发挥功能”,成为决定牙髓再生能否真正实现的重要环节。近年来,三维干细胞微球(stem cell spheroid)移植策略受到广泛关注。相较于单细胞悬液,干细胞微球通过细胞间紧密连接和自分泌细胞外基质形成仿生微环境,能够显著提高细胞移植后的存活率,维持自然的细胞骨架组织与顶端-基底极性,增强干性维持与旁分泌功能,促进血管新生及组织有序再生^[6-8]。干细胞微球已在心肌损伤^[9-10]、骨组织缺损^[11-12]及神经退行性疾病^[13]等研究领域显示出一定的应用潜力。

目前,干细胞微球在牙髓再生中的研究尚处于探索阶段,其形成方式、细胞来源及培养条件等关键参数与牙髓再生结局之间的关系尚未得到系统阐明。基于此,本文以干细胞微球在牙髓再生中的应用为切入点,系统梳理其结构特征、形成机制及关键影响因素,分析其在牙髓组织重建中的潜在作用、当前研究进展及临床转化瓶颈。在此基础上,探讨干细胞微球由“体外三维培养模型”走向“根管内功能性组织再生载体”所面临的关键科学问题与技术挑战,以期从细胞移植向组织化、功能化牙髓再生的转变提供新的研究思路。

一、干细胞微球

目前常用的细胞体外培养三维模型包括微球、类器官及器官芯片等^[14-15]。其中,微球与类器官在文献中常存在概念模糊、标准不一的问题。微球是由单一或多种细胞通过自发聚集或外力诱导形成的简单三维细胞簇,广泛用于药物筛选与组织再生。干细胞微球是微球的一种特殊类型,特指由干细胞经自组装或外力诱导形成的三维结构,具有维持干细胞的干性及其多向分化潜能的优势^[16-17]。相比之下,类器官和器官芯片更侧重于模拟真实器官的复杂结构与功能,但操作较为烦琐^[17-19]。

微球内部呈现典型的三层结构(图1),最内层为坏死核心,周围分布凋亡细胞;中间层为静止但仍保持活性的非增殖细胞;最外层为增殖活跃、迁移能力强的细胞^[15]。各层之间形成明显的物质浓度梯度:从表层向核心,氧气与营养物质浓度逐渐

降低、pH值下降,而二氧化碳、乳酸盐及代谢废物含量不断积累,这种结构特征与微环境梯度共同调控细胞命运^[20]。相较于单细胞悬液,干细胞微球的移植存活率更高^[8],这一优势与其内部缺氧微环境密切相关:缺氧可增强细胞血管生成能力以适应根管缺血环境,提升细胞抵抗氧化应激诱导凋亡的能力,同时强化抗炎与免疫调节功能,促进巨噬细胞向抗炎表型转化,为牙髓修复营造有利局部微环境^[4,7]。相较于二维培养体系,微球能更精准地模拟体内生理微环境^[4,16],使细胞在形态、表型等方面展现显著优势,包括维持干性、增强细胞间通讯和延缓细胞衰老等^[21-22]。此外,该模型还能减少动物模型使用,符合美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)相关政策为非动物试验技术提供的支撑^[23],有利于推动个性化医疗与临床转化,为牙髓再生研究提供更理想的体外平台。

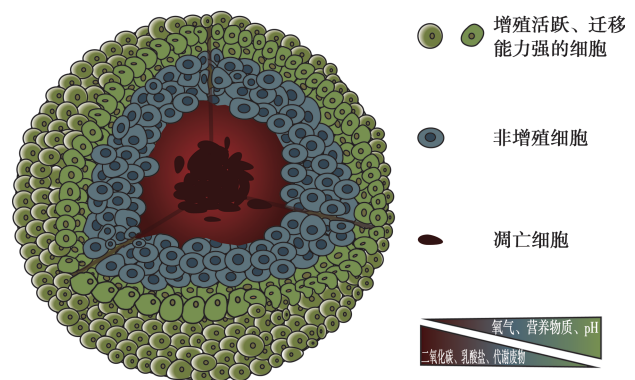


图1 细胞微球示意图

二、干细胞微球的形成机制与影响因素

干细胞微球的形成可通过自发聚集或物理方式启动^[15],是由黏附分子、皮层张力与细胞骨架重排协同调控的主动自组装过程。高表达钙黏蛋白的细胞分布于微球内部,而高表达整合素的细胞则位于外周。该过程可分为3个连续阶段:(1)初始聚集。钙黏蛋白介导细胞间接触,整合素与ECM的相互作用影响聚集速率。(2)黏附增强。钙黏蛋白积累激活 β -catenin信号通路,同时整合素-ECM相互作用促进细胞存活与聚集,其中钙黏蛋白的上调是实现细胞从松散堆积向致密化转变的关键。(3)致密化。外周区域的高皮层张力通过Rho/ROCK信号通路调控细胞骨架重组,形成微球内部与外周之间的力学差异,进而调控细胞命运。在整个自组装过程中,钙黏蛋白-连环蛋白复合体参与信号转导,而

细胞骨架系统提供收缩动力,二者共同主导微球的自组装^[7,16,22,24]。

干细胞微球的功能受其尺寸影响。尺寸通常以直径或细胞数量来表征^[25],由初始接种密度决定,并受到缺氧耐受性的制约;尺寸的变化会直接影响营养物质的扩散效率、细胞间相互作用强度及基因表达。若尺寸过大,内部易形成缺氧核心,进而诱导细胞凋亡。此外,不同培养方法因介质体积和气液界面的差异,会直接影响供氧效率,Fuentes等^[25]和 Schmitz等^[26]对比发现,采用悬挂滴法制备的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)微球在直径达 920 μm 时才出现缺氧核心,而低黏附培养板制取的微球在直径超过 600 μm 时即已形成缺氧核心。

三、干细胞微球的制备与培养技术

制备干细胞微球的方法多样,可根据实验需求选择。悬滴法操作简便但换液困难,适用于短期培养^[16]。液体覆盖法通过阻断细胞贴壁促使微球形成,便于调控大小与提取。低黏附培养板可控制微球尺寸、获得形态均匀的微球,但难以大规模生产,也无法有效去除死细胞与碎片;需注意,部分文献将低黏附培养板归入液体覆盖法范畴^[27]。沉淀法通过离心浓缩细胞,常用于成软骨分化研究。搅拌瓶法依靠搅拌促进聚集,但转速对微球质量影响显著。旋转壁式生物反应器可模拟微重力环境,调控干细胞基因表达。磁悬浮技术利用磁场维持细胞悬浮、利于共培养,但磁性粒子可能影响细胞存活率与功能^[22]。微球形成后,需进一步选择合适的培养方式。静态悬浮培养设备简单,但换液烦琐、效率较低;动态悬浮培养可支持微球长期生长并显著提升其生物学功能,但当前仍面临微球大小不均、制备参数缺乏统一标准、动态环境的作用机制尚不明确等问题^[7]。

近年来,多种新技术平台相继涌现为微球的制备与培养提供了优化方案。微阵列技术可实现高通量、高重复性和低样本消耗的微球培养,但设备成本高、喷嘴易堵塞、对材料参数敏感^[28]。微流控技术可实现高精度、高通量的微球生产,模拟体内微环境并实时监测培养参数^[29];3D生物打印可利用含干细胞微球的生物墨水,在牙科等组织工程领域应用广泛^[30]。此外,根据是否使用外源性支架材料,微球培养体系可分为以下两类:(1)支架体系常结合水凝胶、电纺丝和纳米纤维等材料,通过调控孔隙率、刚度及表面成分适配组织微环境,可促进营养运输、提高微球核心细胞存活率,并实现均一微球

的规模化制备;但支架材料存在引发免疫反应及感染的潜在风险^[16,31]。(2)无支架体系不依赖外源性生物材料,能够强化细胞间及细胞与基质间的相互作用,降低免疫风险,但机械强度较低,微球形态稳定性较差^[7,32]。

四、干细胞微球在牙髓再生领域的研究进展

在牙髓再生领域,干细胞微球构建技术既可作为研究干细胞行为及生物材料相互作用的体外模型,又可作为微型牙髓构造体用于根管植入。研究表明,牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)等经微球培养后,其多谱系分化能力、成骨及成牙本质标志物表达均显著提升,矿化与成骨潜能增强^[4,14]。针对牙髓再生中的血管化难题,共培养策略展现出良好前景。Dissanayaka等^[33]将DPSC与人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)共培养形成微球,将植入免疫缺陷小鼠皮下的人牙根取出并切片后,成功构建出具有血管化特征的牙髓样组织,免疫组化证实该组织来源于人类,且沿牙本质侧可见排列整齐的类成牙本质细胞。在此基础上,多种仿生策略进一步推动了血管化进程:可注射水凝胶微球^[34]、基于GelMA超细纤维的仿生体系^[35]、DNMTi@ZIF-8纳米平台^[36]及Yuan等^[37]通过优化微球尺寸诱导的适度生理性缺氧,均能有效促进血管生成。在神经化方面,Jian等^[38]将DPSC及其诱导分化的内皮样、神经样细胞按不同比例在低黏附培养板中构建多细胞微组织微球,证实其在裸鼠皮下异位移植模型中能促进血管化和神经标志物表达,为牙髓再生提供了无支架多细胞微球新策略。其他类型干细胞微球同样展现前景。脱落乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)微球表现出增强的成骨、成脂分化及迁移能力,能维持良好干细胞特性,并在裸鼠皮下有效促进牙髓-牙本质样组织再生^[39],赫氏上皮根鞘细胞、胚胎牙细胞和牙周膜MSC等制成的微球,在体外培养和体内移植中分别展现出矿化增强、牙齿发育和牙周形成等潜能;此外,皮质骨来源MSC微球与去端肽胶原海绵结合,可用于牙槽嵴新骨形成,为牙齿脱落修复提供了新思路^[40-41]。综上,不同细胞来源、不同构建方式的干细胞微球在牙髓再生、血管神经化及牙体牙周组织修复中展现出差异化的生物学优势与应用潜力。本文对现阶段各类干细胞微球的制备策略、动物模型及再生应用进展进行汇总,详见表1。

表1 干细胞微球在牙髓再生中的临床前研究总结

文献	干细胞来源	微球制备方法	动物模型	主要结果	局限性
Dissanayaka等 ^[33]	DPSC+HUVEC	微孔阵列法	免疫缺陷小鼠皮下移植	形成血管化牙髓样组织,可见类成牙本质细胞	缺乏功能性牙根发育的长期观察
Zhang等 ^[34]	DPSC	静电微滴法	裸鼠皮下移植	促牙髓样组织再生及新微血管形成	长期血管稳定性待验证,生物安全性未评估
Liang等 ^[35]	DPSC+HUVEC	GelMA纤维载体	裸鼠皮下移植	生成牙髓样组织、血管及成牙本质样细胞	是否适用于临床根管注射未验证
Li等 ^[36]	DPSC、SHED	微孔阵列法	裸鼠皮下移植	通过Zn ²⁺ 激活PI3K-AKT通路促血管生成	纳米材料长期生物安全性需评估
Yuan等 ^[37]	SHED	低黏附培养板	裸鼠皮下移植	适度生理性缺氧平衡活力与促血管能力	最佳尺寸可能因细胞类型而异
Jian等 ^[38]	DPSC	低黏附培养板	裸鼠皮下移植	促进血管化和神经标志物表达	未证实功能性神经支配
Ding等 ^[39]	SHED	低黏附培养板	裸鼠皮下移植	有效促进牙髓牙本质样组织的再生	RNA-seq结果并未阐明具体信号通路
Duan等 ^[40]	HERS	基质胶辅助法	大鼠肾囊下/皮下移植	矿化增强	移植后新生组织来源未明确
Griffin等 ^[41]	胚胎牙细胞	悬滴法	免疫正常小鼠皮下移植	形成完整牙齿结构	细胞来源伦理及未形成完整的、功能性牙周膜附着
	PDLSC+HUVEC	微孔芯片法	大鼠上颌第一磨牙牙周缺损模型	促进牙骨质形成	未评估牙周膜质量、功能附着及长期稳定
	皮质骨来源MSC	低黏附培养板	免疫缺陷小鼠皮下移植	促进牙槽嵴新骨形成	机械强度及长期骨重塑效果有待验证

注:DPSC为牙髓干细胞;HUVEC为人脐静脉内皮细胞;SHED为乳牙牙髓干细胞;HERS为赫氏上皮根鞘细胞;PDLSC为牙周膜干细胞;MSC为间充质干细胞;GelMA为甲基丙烯酸明胶;PI3K-AKT为磷脂酰肌醇3激酶-蛋白激酶B;RNA-seq为转录组测序技术。

五、当前挑战与未来展望

值得注意的是,上述多数研究仍处于体外或异位移植阶段,临床转化面临三大核心瓶颈:规模化生产的一致性、核心坏死的控制及体内血管化的实现。在规模化方面,尽管3D生物打印及微孔阵列技术可实现均一微球的批量制备,但面对某些对微球数量要求极高的高通量筛选应用时,产量仍有进一步提升的空间^[28,42],微流控液滴技术与生物反应器的结合是突破该瓶颈的最有前景方向,但需优先解决剪切力对细胞活性的影响;针对核心坏死,现有策略如气体渗透芯片或水凝胶供氧虽可改善氧梯度,但其长期生物安全性尚待评估^[43-44]。相比之下,通过优化微球尺寸以避免坏死产生更为简洁可靠,且无须引入外源性材料;在血管化方面,自组装多肽驱动的微球形成技术可在体外构建含类毛细血管结构的组织微球,体内移植后具有良好的血管化能力,为血管化策略提供了新思路^[45]。对于牙髓再生而言,更具挑战性的是根管这一特殊的三维受限环境。微球不仅需要在狭长根管内保持结构和活性,还需适应复杂的力学环境,并在感染控制后实现快速血管化及与牙本质壁的有效整合。目前尚

缺乏真实感染根管模型对上述过程的系统验证。此外,除关注微球的形成与存活外,还应重视其形态发生过程,尤其是力学信号对微球命运的影响^[46]。因此,未来研究应进一步从微球能否形成转向微球能否适应根管并实现功能性再生。基于此,未来可重点关注3个方向:(1)阐明根管内力学约束对微球结构及细胞命运的影响;(2)通过动态培养构建具有更强稳定性和抗应激能力的预形成微球;(3)利用微球自分泌ECM促进其与根管内壁的快速整合。最终推动干细胞微球由单纯的细胞递送载体,向具有稳定结构、持续存活和组织重建能力的“再生单元”转变。总体而言,干细胞微球为牙髓再生提供的价值,可能并不仅在于提高移植细胞的存活率,而在于改变传统细胞移植的组织工程方式。从单细胞悬液到具有细胞间通讯、ECM微环境及一定组织结构的三维微球,本质上是向输送具有组织形成潜能的再生单元转变。然而,牙髓再生的最终目标并非在根管内形成单纯的细胞团块,而是重建具有血管化、免疫调控、感觉及牙本质形成能力的功能性牙髓组织。因此,未来研究需要进一步突破微球形成-移植存活-组织形成的传统

评价框架,将感染微环境、根管空间约束、力学信号、血管化及牙本质界面整合纳入统一的研究体系。只有当干细胞微球能够在真实根管环境中实现长期存活、有序组织化并逐步恢复牙髓生物学功能,其临床转化价值才能得到真正验证。由此,干细胞微球有望成为连接细胞治疗、组织工程与牙髓再生医学的重要技术桥梁,并推动牙髓治疗从感染控制进一步迈向功能重建。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王晓怡:文献整理、论文撰写;孙喆轶:论文修改;霍丽珊:论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Lee H N, Liang C, Liao L, et al. Advances in research on stem cell-based pulp regeneration [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2021, 18(6):931-940. DOI: 10.1007/s13770-021-00389-2.
- [2] Peng C, Zhao Y, Wang W, et al. Histologic findings of a human immature revascularized/regenerated tooth with symptomatic irreversible pulpitis [J]. *J Endod*, 2017, 43(6):905-909. DOI: 10.1016/j.joen.2017.01.031.
- [3] 欧乾民,李政诗,牛露茜,等.口腔干细胞的生物学特性与转化研究[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2025, 57(5):827-835. DOI: 10.19723/j.issn.1671-167X.2025.05.003.
- [4] Shi X, Hu X, Jiang N, et al. Regenerative endodontic therapy: From laboratory bench to clinical practice [J]. *J Adv Res*, 2025 (72):229-263. DOI: 10.1016/j.jare.2024.07.001.
- [5] Xuan K, Li B, Guo H, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(455):eaaf3227. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3227.
- [6] Huang X, Li Z, Liu A, et al. Microenvironment influences odontogenic mesenchymal stem cells mediated dental pulp regeneration [J]. *Front Physiol*, 2021 (12): 656588. DOI: 10.3389/fphys.2021.656588.
- [7] Otori-Morita Y, Ashry A, Niibe K, et al. Current perspectives on the dynamic culture of mesenchymal stromal/stem cell spheroids [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2025, 14(3):scae093. DOI: 10.1093/stcltm/scae093.
- [8] Xu Q, Zhang C, Liu X, et al. Modulation of stem cell survival and engraftment: Implications for stem cell-based therapy [J]. *Theranostics*, 2025, 15(17):8840-8856. DOI: 10.7150/thno.120805.
- [9] Jeong T, Lee M S, Jeon J, et al. Advanced stem cell therapy using both cell spheroids transplant and paracrine factor release hydrogel patches for myocardial infarction [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2025 (253): 114772. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2025.114772.
- [10] Liu Y, Zhang Y, Mei T, et al. hESCs-derived early vascular cell spheroids for cardiac tissue vascular engineering and myocardial infarction treatment [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(9):e2104299. DOI: 10.1002/advs.202104299.
- [11] Liu X, Astudillo Potes M D, Dashtdar B, et al. 3D stem cell spheroids with 2D hetero-nanostructures for *in vivo* osteogenic and immunologic modulated bone repair [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(12):e2303772. DOI: 10.1002/adhm.202303772.
- [12] Otori - Morita Y, Niibe K, Limraksasin P, et al. Novel mesenchymal stem cell spheroids with enhanced stem cell characteristics and bone regeneration ability [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(4):434-449. DOI: 10.1093/stcltm/szab030.
- [13] Bi W, Cai S, Xing C, et al. Engineering mesenchymal stem cell spheroids and brain organoids: Advanced 3D culture platforms for neurodegenerative disease cell therapy [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2026, 22(4):1739-1763. DOI: 10.1007/s12015-026-11101-z.
- [14] Gouveia Z, Özkan A, Giannobile W V, et al. Oral tissue spheroid, organoid, and organ-on-chip microphysiological modeling strategies towards enhanced emulation of health and disease [J]. *Bioeng Transl Med*, 2025, 10(5):e70020. DOI: 10.1002/btm2.70020.
- [15] Kang S M, Kim D, Lee J H, et al. Engineered microsystems for spheroid and organoid studies [J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(2):e2001284. DOI: 10.1002/adhm.202001284.
- [16] Kim W, Gwon Y, Park S, et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2023 (19): 50-74. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.03.039.
- [17] Moro L G, Guarnier L P, Azevedo M F, et al. A brief history of cell culture: From harrison to organs-on-a-chip [J]. *Cells*, 2024, 13(24):2068. DOI: 10.3390/cells13242068.
- [18] Garreta E, Kamm R D, Chuva de Sousa Lopes S M, et al. Rethinking organoid technology through bioengineering [J]. *Nat Mater*, 2021, 20(2):145-155. DOI: 10.1038/s41563-020-00804-4.
- [19] Li Z, Hui J, Yang P, et al. Microfluidic organ-on-a-chip system for disease modeling and drug development [J]. *Biosensors (Basel)*, 2022, 12(6):370. DOI: 10.3390/bios12060370.
- [20] Fang Y, Eglen R M. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development [J]. *SLAS Discov*, 2017, 22(5):456-472. DOI: 10.1177/2472555218787198.
- [21] Haraszti R A, Miller R, Stoppato M, et al. Exosomes produced from 3D cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(12):2838-2847. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.09.015.
- [22] Ryu N E, Lee S H, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells [J]. *Cells*, 2019, 8(12):1620. DOI: 10.3390/cells8121620.
- [23] Wadman M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs [J]. *Science*, 2023, 379(6628):127-128. DOI: 10.1126/science.adg6276.
- [24] Sart S, Tsai A C, Li Y, et al. Three-dimensional aggregates of

- mesenchymal stem cells: Cellular mechanisms, biological properties, and applications [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20(5):365-380. DOI:10.1089/ten.TEB.2013.0537.
- [25] Fuentes P, Torres M J, Arancibia R, et al. Dynamic culture of mesenchymal stromal/stem cell spheroids and secretion of paracrine factors [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022 (10) : 916229. DOI:10.3389/fbioe.2022.916229.
- [26] Schmitz C, Potekhina E, Irianto T, et al. Hypoxia onset in mesenchymal stem cell spheroids: Monitoring with hypoxia reporter cells [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021 (9) : 611837. DOI:10.3389/fbioe.2021.611837
- [27] Shi W, Kwon J, Huang Y, et al. Facile tumor spheroids formation in large quantity with controllable size and high uniformity [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):6837. DOI:10.1038/s41598-018-25203-3.
- [28] Shrestha S, Lekkala V K R, Acharya P, et al. Recent advances in microarray 3D bioprinting for high-throughput spheroid and tissue culture and analysis [J]. *Essays Biochem*, 2021, 65(3) : 481-489. DOI:10.1042/EBC20200150.
- [29] Tevlek A, Kecili S, Ozcelik O S, et al. Spheroid engineering in microfluidic devices [J]. *ACS Omega*, 2023, 8(4) : 3630-3649. DOI:10.1021/acsomega.2c06052.
- [30] Mohd N, Razali M, Ghazali M J, et al. Current advances of three-dimensional bioprinting application in dentistry: A scoping review [J]. *Materials (Basel)*, 2022, 15 (18) : 6398. DOI: 10.3390/ma15186398.
- [31] Chae S, Hong J, Hwangbo H, et al. The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications [J]. *Theranostics*, 2021, 11(14):6818-6832. DOI: 10.7150/thno.58421.
- [32] Caprio N D, Burdick J A. Engineered biomaterials to guide spheroid formation, function, and fabrication into 3D tissue constructs [J]. *Acta Biomater*, 2023(165):4-18. DOI:10.1016/j.actbio.2022.09.052.
- [33] Dissanayaka W L, Zhu L, Hargreaves K M, et al. Scaffold-free prevascularized microtissue spheroids for pulp regeneration [J]. *J Dent Res*, 2014, 93 (12) : 1296-3103. DOI: 10.1177/0022034514550040.
- [34] Zhang R, Xie L, Wu H, et al. Alginate/laponite hydrogel microspheres co-encapsulating dental pulp stem cells and VEGF for endodontic regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2020(113):305-316. DOI:10.1016/j.actbio.2020.07.012.
- [35] Liang Q, Liang C, Liu X, et al. Vascularized dental pulp regeneration using cell-laden microfiber aggregates [J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(48):10097-10111. DOI:10.1039/d2tb01825j.
- [36] Li Z, Wan M, Cui D, et al. DNMTi@ZIF-8 enhances biomimetic pulp regeneration via epigenetic regulation [J]. *J Dent Res*, 2025, 104(7):743-752. DOI:10.1177/00220345251315468.
- [37] Yuan X, Wang S, Yuan Z, et al. Boosting the angiogenesis potential of self-assembled mesenchymal stem cell spheroids by size mediated physiological hypoxia for vascularized pulp regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2025 (198) : 102-114. DOI: 10.1016/j.actbio.2025.04.019.
- [38] Jian W, Ma F, Xian Y, et al. Dental pulp stem cell-derived multicellular microtissue spheres: A synergistic strategy for dental pulp regeneration [J]. *Int Dent J*, 2025, 75 (6) : 103970. DOI: 10.1016/j.identj.2025.103970.
- [39] Ding J, Sun Z, Ma L, et al. Microspheres of stem cells from human exfoliated deciduous teeth exhibit superior pulp regeneration capacity [J]. *Dent Mater*, 2025, 41 (1) : 70-80. DOI:10.1016/j.dental.2024.10.015.
- [40] Duan Y, Li X, Zhang S, et al. Therapeutic potential of HERS spheroids in tooth regeneration [J]. *Theranostics*, 2020, 10(16): 7409-7421. DOI:10.7150/thno.44782.
- [41] Griffin K H, Fok S W, Kent Leach J. Strategies to capitalize on cell spheroid therapeutic potential for tissue repair and disease modeling [J]. *NPJ Regen Med*, 2022, 7 (1) : 70. DOI: 10.1038/s41536-022-00266-z.
- [42] Decarli M C, de Castro M V, Nogueira J A, et al. Development of a device useful to reproducibly produce large quantities of viable and uniform stem cell spheroids with controlled diameters [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2022 (135) : 112685. DOI:10.1016/j.msec.2022.112685.
- [43] Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation [J]. *J R Soc Interface*, 2017, 14 (127) : 20160877. DOI:10.1098/rsif.2016.0877.
- [44] Lee N H, Bayaraa O, Zechu Z, et al. Biomaterials - assisted spheroid engineering for regenerative therapy [J]. *BMB Rep*, 2021, 54(7):356-367. DOI:10.5483/BMBRep.2021.54.7.059.
- [45] Lu H, Li Y, Yang X, et al. Mechanical forces from intercellular peptide self-assembly drive spheroid formation [J]. *Nat Commun*, 2026, 17 (1) : 1801. DOI: 10.1038/s41467-026-68513-1.
- [46] Alsehl H S, Roy E, Williams T, et al. Morphogen-driven differentiation is precluded by physical confinement in human iPSCs spheroids [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024 (12) : 1467412. DOI:10.3389/fbioe.2024.

(收稿日期:2026-04-10)

(本文编辑:王嫚)