

全新视角透视口腔黏膜组织工程

陈洁综述 陈莉莉 刘加荣审校

(华中科技大学同济医学院附属协和医院口腔科 武汉 430022)

[摘要] 口腔黏膜组织工程主要应用于修复因肿瘤切除、牙周病、外伤等导致的软组织缺损。以前的组织工程研究主要围绕上皮细胞培养方法的发展以及结缔组织支架材料的研发开展, 本文将对口腔黏膜组织工程替代物的培养模式、支架结构、基质功能及临床应用进行综述, 展示组织工程的新视角及口腔黏膜组织工程的新应用。

[关键词] 口腔黏膜; 组织工程; 新视角

[中图分类号] Q 813.1 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.01.016

New perspectives of oral mucosa engineering Chen Jie, Chen Lili, Liu Jiarong. (Dept. of Stomatology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

[Abstract] Tissue-engineered oral mucosal equivalents have been developed for clinical applications, such as restore the soft tissue defects due to excision of tumor, parodontopathy, trauma and so on. In the last several decades, researches have mainly concentrated on the development of epithelial cell culture methods and introducing new dermal scaffolds. In this review we will focus on the oral mucosa equivalent reconstructed models, the scaffold, the important role of the extracellular matrix, and display the new concept of tissue engineering and the new application of oral mucosa tissue engineering.

[Key words] oral mucosa; tissue engineering; new perspective

口腔黏膜缺损在临床治疗中常面临难以修复的问题, 传统的修复方法存在供体量不足或移植排斥反应, 因而迫切需要成熟的口腔黏膜人工替代物来取代自体或异体组织移植方法。

1 组织工程替代物的构建

1.1 培养模式的发展

与皮肤组织工程同步, 口腔黏膜组织工程最初的应用也是表皮皮片, 但由于没有支撑组织, 皮片极脆弱且易收缩。由此, 组织工程又逐渐发展到将角质形成细胞与成纤维细胞共培养的三维结构黏膜复合物, 大大提高了临床应用效果。近年来, 由于计算机辅助技术在生物医学领域的应用, 人们又提出四维培养模式的概念, 即加入了时间因素。应用计算机辅助技术, 从时间角度控制各种信号分子或因子的释放, 为组织工程的发展提供了巨大的潜力^[1]。微尺度技术便是从这个

思路出发, 并使其具体化的表现, 这是一项在 1 μm ~1 mm 尺度范围内进行组织工程设计、制备和分析的新技术。从微米到纳米尺度处理、传输、控制、分析和构建各种结构, 控制细胞在特定部位沉淀, 实现可调控的多维结构^[2]。

1.2 从支架结构到无支架结构的转变

1.2.1 支架结构 随着材料学及工程学的发展, 目前已有多种类型的支架应用于组织工程领域, 人们对支架的认识也从宏观细微到微观。最初的支架设计思路, 主要是融合一些相对分子量大的物质, 如利于营养运输和组织修复的连接孔道, 以及直接在支架中加入所需细胞。有研究^[3]用多孔 GC 膜为人牙龈成纤维细胞提供附着与生长的三维支架, 保证受体植床血运的建立和细胞营养, 该支架因降解而发生孔径的变化, 有助于培养的人牙龈成纤维细胞植入体内后的扩增, 并最终与体内的牙龈组织整合。然而又有学者提出, 在多孔支架中简单加入细胞并不能获得足够的功能, 而需要进一步模拟体内组织的微结构以及细胞微环境, 为细胞提供生物化学及物理刺激, 调节其生理功能, 同时也调节其分化、增殖、凋亡及迁移^[4]。因此, 模拟功能性三维组织不仅需要加入

[收稿日期] 2010-09-14; [修回日期] 2011-07-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30970740); 湖北省卫生厅科研基金资助项目(JX4B10)

[作者简介] 陈洁(1986—), 女, 湖北人, 硕士

[通讯作者] 陈莉莉, Tel: 027-85726409

宏观的机械及运输通道^[5]，同时也需要融入一些微观结构元素以便于细胞功能的发挥，这便要求从多角度控制其化学及机械构成，使细胞的周围环境及功能活动更接近生理状态，从而提高复合物的功能性及仿生性。

1.2.2 无支架结构 各类新型支架材料的出现使组织工程的发展及应用得到了很大的发展，但是异源性支架材料和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)材料的使用也有较多不足之处。异源物质会诱发不良的免疫反应，并干扰细胞间的相互作用，另外在降解速率、降解产物毒性、与邻近组织的机械匹配性等方面，目前还不能实现完全理想的控制，使其临床应用受到了一定的限制。由此，学者们提出了无支架工程组织的想法。Norotte等^[6]应用计算机辅助技术成功构建出小血管组织，他们将不同类型的血管细胞聚为一个独立的球体或圆柱体单位，然后以琼脂糖棒作为模板，利用计算机辅助技术，将这些小单位成层的沉淀吸附于该模板表面，从而构建出小血管组织。这种方法可以构成不同形状和包含各种不同直径小分支的血管，目前已有用这种方法成功构建出的皮肤、骨及软骨的报道^[7]。但此项技术也存在一定缺陷，对于一些较大较长的管状结构来说，需耗费大量的时间，并且也不能在最终得到的组织结构定型上获得确定的效果。另外有研究用复合培养的方法构建无支架复合物，即先培养单层成纤维细胞，在其培养液中加入维生素C，以促进胶原等内源性ECM成分的合成与分泌，经过培养后，成纤维细胞即被接种于自身分泌的ECM中，形成一个可调整的弹性组织皮片，复合2~4张皮片便可达到所需要的真皮组织厚度，约1周后，再将角质形成细胞加入到构建的真皮表面，然后于气-液面环境下培养，以促进表皮细胞的分化^[8]。综上可见，目前已有多种技术应用于无支架复合物的构建，这一方法的不断成熟将会推动组织工程迈入一个新的阶段。

1.3 成纤维细胞及细胞外基质构建的重要性

已有许多研究从新的角度重新发现了成纤维细胞及ECM在功能性组织构建中的重要性。

1.3.1 成纤维细胞在功能重建中的主导作用 成纤维细胞可合成分泌ECM，以及一些细胞因子和生长因子，经自分泌或旁分泌途径来调节微环境，参与组织的发育、生长及改建。另外，它可通过分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease,

MMP)及组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)，在生理或病理状态下的血管形成中扮演重要角色^[9]。MMP具有促进和抑制血管形成的双向作用，即可降解ECM，促进内皮细胞的迁移及增殖，从而促进血管生成。同时也可释放血管生成抑制因子来抑制这些细胞活动。当然，成纤维细胞与内皮细胞间直接的相互作用也参与了血管生成过程。在构建上皮组织替代物中，成纤维细胞也可与角质形成细胞相互作用，对基底膜的形成有很大影响。Sorrell等^[10]研究表明，将成纤维细胞和角质形成细胞共培养后，两者的功能活动均可得到充分发挥，前者可调节后者的层粘连蛋白及I型胶原的分泌，而后者则可诱导前者的转化生长因子β2的表达。在今后的研究中，应从分子角度进一步明确成纤维细胞各亚类的特征及功能，将其更好地应用于组织工程中。

1.3.2 功能性细胞外基质思路的提出及其新挑战 ECM是蛋白聚糖、糖蛋白、蛋白酶、胶原、生长因子以及各种细胞因子的有机组合体。ECM所提供的信号在组织内部稳定性和病理修复中起着重要作用。ECM不仅为细胞提供三维的支架作用，而且还在各种细胞学行为中起着重要作用。ECM与细胞表面特殊受体相互作用，既能够调节其与细胞骨架的物理连接，又能够调节细胞内外信息双向流通。同时，ECM是各类生长因子的储存库，能够与细胞信号相互作用并调节细胞的形态，在器官发育中，ECM对组织形态的发生起着重要的双向作用。通过调节细胞贴附、迁移及其极性来影响组织的形态发生和细胞分化。ECM提供的物理和机械信号通过整联蛋白相互之间的传导可能直接影响着细胞的分化^[11]。由此可见，ECM及其对细胞分化作用的动力传导将会成为一个全新的研究领域。

ECM中的各种生长因子等对细胞的功能及组织的再建是极其重要的，而如何在体外使这些物质有机地表达也成为了人们面临的新的问题。体外试验中的生长因子都是以溶解的形式出现的，而在体内，各种生长因子都是与ECM蛋白结合并在基质改建的时候才释放出来的^[12]。为了模拟体内的这个过程，很多研究提出了通过共价结合的方式植入生长因子^[13]。另外，考虑到体内的生长因子不仅与基质蛋白结合，同时也会结合于糖胺多糖^[14]，所以人们又提出了非共价结合途径，

为这些分子的定位提供了更多的选择。生长因子与基质蛋白的结合可避免被蛋白酶水解,从而增强其稳定性与活性。

随着组织工程的发展,人们从多个方面研究如何使组织替代物更接近生理状态,建立功能性 ECM。因此,从微观角度去认识 ECM 的特性也逐渐受到越来越多的关注。功能性组织工程替代物必须包含细胞及其周围的 ECM 结构成分,并且包含各种物质之间相互联系的空间定位。目前面临的主要挑战是,如何建立一个既包含生理组织生物化学特征也包含其机械特征的 ECM。体外模拟 ECM 的一个重要原则即全面实现其功能、重视细胞与材料间的相互作用,正是这种相互作用最终决定了细胞的状态及 ECM 的降解或改建。目前,主要有 3 种类型的 ECM:人工合成 ECM、天然 ECM、半合成 ECM。人工合成 ECM 可以根据不同的功能需要添加各种特殊成分,通过物理吸附或化学连接的方式来结合特定的生物分子,以调节组织中的细胞功能;天然 ECM 是通过化学或机械的方法从组织中提取的胶原、弹性蛋白、葡糖胺多糖或它们的复合物。这两者各有优缺点。首先,人工合成 ECM 的成分较稳定,天然 ECM 却会随标本状态或提取条件的不同而不同;其次,人工合成 ECM 的生产可程序化,可以大批量生产,而天然 ECM 的获取却受到标本的限制;第三,人工合成 ECM 可以根据需要添加各种化学物质,如生长因子、酶类、营养物质、抗体,可以更好地模拟体内环境并使组织功能更接近理想状态,而天然 ECM 由于受其来源组织类型的限制,其成分远不如前者丰富;最后,由于组织及其状态的多样性,人工合成 ECM 常需要模拟各种不同的组织,有些情况甚至需要模拟病理或者老化状态,这是现阶段的制备技术还不能完全实现的,相反,天然 ECM 的制取则是根据特定情况所选取的组织,因此能更好地反映体内组织的状态,制取也相对容易^[15]。可见,二者的特性是相互补充的,人们在这 2 类 ECM 基础上进行了多种改进。Langer 等^[16]利用它们的互补特性研究出的半合成材料,能够更好地适应组织再建的需要。Narayanan 等^[17]从鼠前成骨细胞系中提取了 ECM,再将其融入从组织中提取的 ECM 以增强其成形性,成功诱导出了骨组织,他们认为,这种细胞系来源的 ECM 具有更多的优势,不仅容易获取,价格低廉,同时也可以从多

种不同种类及不同状态的细胞系提取多种 ECM 并将其有机组合,从而得到更符合需求的 ECM。

可见,构建功能性组织工程替代物必须首先制备出符合要求的功能性 ECM,在特定时间和特定空间能够表达特定的信号分子以适应各种组织状态,模拟体内组织复杂的微环境,从而发挥细胞及组织的最大功能。

2 临床应用

在多年的发展中,组织工程替代物已被用于修复大面积组织缺损,也被用于各种基础研究及药物研究。对于口腔黏膜组织工程替代物,也有着广泛的应用,除了用于修复口腔内黏膜的缺损和基础研究外,近年也有很多研究将其作为种子细胞应用于身体其他部位的组织缺损修复中。

2.1 口腔内的应用

组织缺损修复最理想的方法是使用自体组织移植,但往往由于组织来源有限及存在供区并发症等,限制了其应用。近年来,口腔黏膜组织工程在临床及基础研究中也得到了全新的发展。Peña 等^[18]从患者自身血液中提取纤维蛋白胶作为支架,用其自体的成纤维细胞及浆细胞来复合角质形成细胞,培养构建口腔黏膜,这种自体来源的替代物为口腔黏膜重建工程开辟了新的视角,避免了异源性成分给机体带来的潜在危害,具有更高的临床应用价值。另外,由于牙龈成纤维细胞的潜在成骨能力,以及其易于培养成活、增殖力强的特点,将其作为牙周组织工程的种子细胞也不失为一个新的思路。除了临床应用外,在基础研究中,它可为各种口腔疾病提供科研模型,用以研究各种可控因素与疾病之间的联系、疾病的发生发展过程。Takahashi 等^[19]应用人造真皮作为模型来研究鳞状细胞癌的病理侵入过程。除此,也有研究者使用组织工程黏膜作为体外模型,对口腔保健产品进行生物学评价^[20]。

2.2 口腔外的应用

目前,应用较成熟的是利用组织工程制备的口腔黏膜修复尿道黏膜缺损。另外,Inatomi 等^[21]也尝试用培养的口腔黏膜上皮组织修复各种严重的眼表皮缺损,结果发现可以迅速为角膜提供上皮覆盖,降低了术后并发症的发生率,这为治疗严重的双侧眼表皮疾病提供了新的思路。近来的研究还表明,口腔黏膜上皮细胞可释放多种细胞因子,其中有促进细胞增殖和创伤愈合的作用。

同时口腔黏膜取材相对隐蔽，且预后不留瘢痕，有望成为组织工程种子细胞的一个理想来源^[22]。

3 小结与展望

组织工程发展至今，很多方面已得到了较大的飞跃与发展。人们从微观和宏观角度认识组织，试图使制备的替代物更接近生理状态，在仿生性及功能性方面取得了较大的进步。但是相对于生物体的复杂，其仍有很多有待改进的地方。对于口腔黏膜组织工程替代物，在临床应用中仍存在替代物感染等问题。由于口腔是一个开放的、由多种细菌寄生的环境，因此替代物的抗感染能力则显得非常重要，这也在很大程度上限制了临床应用。抗菌肽在口腔黏膜的抗菌过程中起着重要的作用^[23]，因此，如何促进各种抗菌蛋白在组织工程制备的复合物中的表达，也将成为一个新的研究课题。

4 参考文献

[1] Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix :At the center of it all[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(3) :474-482.

[2] Hacking SA, Khademhosseini A. Applications of micro-scale technologies for regenerative dentistry[J]. *J Dent Res*, 2009, 88(5) :409-421.

[3] 姚晖. 培养人牙龈成纤维细胞在可降解膜支架上的附着生长及穿透性研究[J]. *医学研究通讯*, 2002, 31(7) :39-42.

[4] Uebersax L, Merkle HP, Meinel L. Biopolymer-based growth factor delivery for tissue repair :From natural concepts to engineered systems[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009, 15(3) :263-289.

[5] Martínez E, Engel E, Planell JA, et al. Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour[J]. *Ann Anat*, 2009, 191(1) :126-135.

[6] Norotte C, Marga FS, Niklason LE, et al. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(30) :5910-5917.

[7] Matsusaki M, Kadowaki K, Tateishi K, et al. Scaffold-free tissue-engineered construct-hydroxyapatite composites generated by an alternate soaking process :Potential for repair of bone defects[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(1) :55-63.

[8] Auxenfans C, Fradette J, Lequeux C, et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed *in vitro* by tissue engineering[J]. *Eur J Dermatol*, 2009, 19(2) :107-113.

[9] Liu H, Chen B, Lilly B. Fibroblasts potentiate blood ve-

ssel formation partially through secreted factor TIMP-1[J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(3) :223-234.

[10] Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity :More than skin deep[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 5) :667-675.

[11] Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance :Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(1) :75-82.

[12] Jones CN, Tuleuova N, Lee JY, et al. Cultivating liver cells on printed arrays of hepatocyte growth factor[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(22) :3733-3741.

[13] Alberti K, Davey RE, Onishi K, et al. Functional immobilization of signaling proteins enables control of stem cell fate[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(7) :645-650.

[14] Wissink MJ, Beernink R, Pieper JS, et al. Binding and release of basic fibroblast growth factor from heparinized collagen matrices[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(16) :2291-2299.

[15] Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures :Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions[J]. *Prog Polym Sci*, 2010, 35(7) :868-892.

[16] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine[J]. *Nature*, 2004, 428(6982) :487-492.

[17] Narayanan K, Leck KJ, Gao S, et al. Three-dimensional reconstituted extracellular matrix scaffolds for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(26) :4309-4317.

[18] Peña I, Junquera LM, Meana A, et al. *In vitro* engineering of complete autologous oral mucosa equivalents :Characterization of a novel scaffold[J]. *J Periodontol Res*, 2010, 45(3) :375-380.

[19] Takahashi T, Imai M, Suzuki I, et al. Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree[J]. *Biochem Eng J*, 2008, 40(3) :485-491.

[20] Moharamzadeh K, Franklin KL, Brook IM, et al. Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model[J]. *J Periodontol*, 2009, 80(5) :769-775.

[21] Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, et al. Current progress and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated epithelial sheet transplantation[J]. *Med J Malaysia*, 2008, 63(Suppl A) :42.

[22] Iida T, Takami Y, Yamaguchi R, et al. Development of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent based on an acellular allogeneic dermal matrix :A preliminary report of clinical application to burn wounds[J]. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 2005, 39(3) :138-146.

[23] Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment :Expression and function in health and disease[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2005, 7(2) :119-133.

(本文编辑 李彩)