译文

自体牙髓干细胞在牙周再生中的应用：病例报告

Autologous Dental Pulp Stem Cells in Periodontal Regeneration: A Case Report

Mario Aimetti, Francesco Ferrarotti, Luca Cricenti, Giulia Maria Mariani, Federica Romano

原载 Int J Periodontics Restorative Dent , 2014, 34(suppl): s27-s33.（英文）

成 宵 译 滕 伟 审

摘 要

目的：动物模型的组织学研究表明牙髓干细胞（dental pulp stem cells，DPSCs）可能促进骨下袋的牙周再生。**材料与方法**：这篇病例报告通过临床和影像学的结果描述了自体 DPSCs 在治疗人类未经治疗的骨内袋中的再生潜能。手术拔除一名慢性牙周炎患者一颗有牙髓活力的第三磨牙，拔除的第三磨牙作为自体 DPSCs 的来源以再生右侧下颌第二前磨牙的骨下袋。**结果**：1 年后检查发现缺损处充满骨样组织，再次手术翻开观察也证实了这一点。

1 引言

牙周治疗的最终目的是牙齿支持组织的再生。目前许多的治疗方式，如应用植骨材料、引导性组织再生术、釉基质衍生物递送或生长因子诱导等的再生效果差异较大。患者、骨缺损类型、手术类型和术者技巧等相关因素似乎影响牙周再生效果的预测。

译者单位 中山大学光华口腔医学院 · 附属口腔医院
广州市越秀区中山二路 74 号中山大学北校区 510080

牙周再生需要考虑许多生物学特征，包括适宜的祖细胞、信号分子和基质支架材料并遵循一定的时空顺序。一个主要局限是缺乏足够数量的定植祖细胞 / 干细胞来促进已丧失牙周组织的再生。在此情况下，组织工程学的应用促进了人们越来越多的兴趣去检验自体间充质干细胞这一新兴再生技术。这些细胞易于获取，无免疫性，高度增殖能力，能够分化为包括牙周组织在内的各种类型的组织细胞。

牙髓是容纳神经嵴来源干细胞的生态位置。常规临床操作易于进入该生态位置，可能为临床牙周再生手术提供易获取的干细胞来源。人类牙髓干细

胞（dental pulp stem cells，DPSCs）已能被分离，在体外可分化为以牙髓样结构、成骨细胞和内皮细胞为特征的多能干细胞群。动物实验证明 DPSCs 与生物相容性支架材料共同植入牙周缺损时，具有再生牙周组织的特性。

DPSCs 另一个特点是处理简单。它们的寿命长，可以安全冻存，具有与生物材料相互作用的能力。另外，它们应用于骨组织工程时无须培养扩增过程。总之，所有上述发现似乎都为这一治疗策略应用于临床提供了生物学依据。

本篇病例报告从临床、影像学和再次手术翻开检查三方面评估了 DPSCs 应用于牙周再生的疗效。

2 病例描述

2010 年 3 月，一名 56 岁非吸烟男性因牙龈出血和疼痛被转诊到意大利图里大学牙科学院外科学系牙周病科。该患者无特殊病史，未曾用药。根据美国牙周病学会 1999 年分类，其牙周记录和全口根尖 X 线片表明其为广泛型慢性牙周炎病例。全口菌斑记数（full-mouth plaque score，FMPS）为 65%，全口牙龈出血指数（bleeding on probing score，FMBS）为 56%。患者接受了严格的牙周非手术治疗计划，包括正确的口腔卫生措施以及四分法龈上下洁刮治和根面平整。局麻下由经验丰富的治疗师使用手用器械（Gracey 刮治器，Hu-Friedy 探针）或超声器械（Cavitron Select，Dentsply）行机械清创术。龈下刮治无时间限制，直到探针探及根面光滑和洁净。须小心轻柔地处理软组织，调殆以消除创伤性殆。

牙周基础治疗阶段完成后 12 周再次检查，发现患者的自我菌斑控制是可接受的，FMPS 降至 9%，FMBS 降至 7%。

这一次，右侧下颌第二前磨牙远中面持续存在深骨下袋，测得邻间最深位点的探诊牙周袋深度（probing pocket depth，PPD）为 9mm 和龈退缩（recession，REC）为 3mm（图 1）。未探及深龋、牙齿松动及牙根累及。影像学检查发现未经治疗的骨内袋，骨壁与牙根面成 42° 角。骨嵴顶到骨缺损底部的距离（bone defect BD-bone crest BC）共 6.6mm（图 2）。

患者左侧上颌第三磨牙有牙髓活力，健康无龋，要求拔除。该牙错位，影响患者准确地刷到相邻第二磨牙的远中面。拔除第三磨牙，并获取自体 DPSCs 用以再生右侧下颌第二前磨牙远中骨下袋处的牙周组织。

患者被口头告知病情、治疗方案及费用并签署知情同意书。手术方案遵循赫尔辛基宣言的原则并得到机构伦理委员会的批准（方案编号 0087999）。

术前用 2% 葡萄糖酸氯己定（Chlorhexidine，CHX）含漱 1 分钟进行口内消毒，用 4%CHX 溶液进行口周皮肤消毒。

手术步骤均在外科显微镜（Zeiss S7）的辅助下进行。骨缺损处的手术方法采用改良龈乳头保留技术。最小程度地翻瓣以暴露骨缺损区。避免作垂直减张切口。去净所有的肉芽组织，联合使用微型

图 1 右侧下颌第二前磨牙，术前 PPD 为 9mm，临床附着水平为 12mm。

图 2 术前 X 线片显示深而宽的骨下袋；注意相邻磨牙的近中存在浅而窄的骨下袋。

刮治器（Gracey，Hu-Friedy）和工作尖精细的超声装置（Cavitron，Dentsply）仔细地刮净和平整根面。术中测量冠方骨嵴的最大延伸到垂直骨缺损的最深位点之间的距离（INTRA）以及一壁、二壁和三壁骨袋的数量和范围以表征骨缺损的形态特点（图 3）。骨缺损的百分之五十是一壁骨袋（冠方部分），剩余百分之五十（根方部分）是一壁袋和二壁袋的混合壁袋。术中测得 INTRA 为 5mm。

拔除的左侧上颌第三磨牙用 0.2%CHX 冲洗 60 秒。无菌生理盐水冲洗下，用牙科钻沿釉牙骨质界分离牙冠和牙根，暴露髓腔。无菌条件下用 Gracey 刮治器轻柔地收集牙髓，根据前文所提到的技术用 Medimax 系统的 Medicons 无菌过滤器（Consul TS）在 2mL 无菌生理盐水中分离牙髓（图 4）。该系统用孔径为 50μm 的细胞筛网同时机械分离牙髓和过滤溶液。轻轻吹打 60 秒后，收集单细胞悬液，并转移至胶原海绵支架上（Condress，Istituto Gentili），轻柔放入骨下袋至完全填满缺损（图 5）。间断水平褥式内翻缝合龈瓣以实现伤口的一期愈合（Vicryl 6-0，Ethicon；图 6）。

图 3 最小程度地翻瓣暴露出剩余骨，然后于骨缺损处行清创术。术中确定骨缺损的形态学特征。明显存在 1 个一壁至二壁骨袋以及 1 个广泛的三壁骨袋。二者在同一手术期间均用 DPSCs 治疗。

图 4 收集牙髓，用 Medimax 系统进行分离。

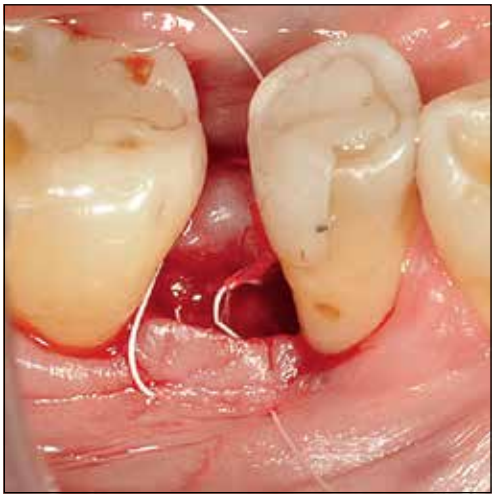

图 5 两个骨下袋均充填满胶原海绵负载的自体 DPSCs 悬液。

图 6 改良内褥式缝合以实现一期闭合。

患者服用阿莫西林 875mg 和克拉维酸 125mg，每天 2 次，连服 6 天，以及布洛芬 600mg，每天 2 次，连服 2–3 天。在菌斑控制方面，教育患者使用 0.12% CHX 漱口，每天 2 次，术后 2 周内避免机械清洁口腔。14 天后拆线。术后 3 周和 4 周，停止 CHX 漱口，开始用软毛牙刷在龈上轻轻刷牙。4 周后，患者恢复正常的口腔卫生措施，在术区使用牙刷和牙间隙清洁工具。

患者在术后第 1 个月内每周复诊，之后 1 年内每 2 个月进行一次牙周支持和维护治疗。12 个月内术区避免龈下刮治。

一名校正检查者测量基线水平、术后 6 个月和 12 个月所有的临床和影像学参数。用标准的牙周探针（PCP–UNC 15,Hu–Friedy）评估临床参数并四舍五入取最接近的 1 毫米。采用都灵理工大学专门编写的图像分析软件（Image–Lab）来记录影像学测量结果。解剖标志的确认依据 Bjorn 等和 Tsitoura 等的研究。

在伤口的早期愈合阶段观察到术区周围软组织肿胀极小。在 1 年的实验期间，FMPS 和 FMBS 均保持＜ 10%。在任何一次随访检查中，实验的骨缺损处均未出现菌斑堆积或探诊后出血。

3 结果

与基线水平相比，手术治疗后 6 个月和 12 个月临床表现改善（表 1）。术后第 6 个月，PPD 共减少 5mm，CAL 共增加 5mm。12 个月后，PPD 和 CAL 总变化量分别为 6mm 和 6mm（图 7）。12 个月内 REC 保持稳定。影像学分析也支持临床结果。影像学检查基线水平的平均骨内袋深度（BC–BD）为 6.6mm。在第 6 个月和 12 个月减至 2.1mm 和 1.4mm（图 8）。1 年后影像学检查发现骨内袋充满了骨样组织，再次手术翻开观察也证实了这一点（图 9）。

表 1 实验的骨缺损区的临床和影像学参数

	基线水平	6 个月	12 个月
PPD(mm)	9.0	4.0	3.0
REC(mm)	3.0	3.0	3.0
CAL(mm)	12.0	7.0	6.0
BC–BD(mm)	6.6	2.1	1.4
RA(deg)	24.0	–	–

PPD= 探诊牙周袋深度；REC= 龈退缩；CAL= 临床附着水平；BC–BD = X 线片中的骨缺损深度；RA = 射线投照角度。

图 7 1 年后临床检查显示无炎症，剩余 PPD 为 3mm，CAL 为 6mm。无牙龈退缩。

图 8 1 年后影像学完全分辨率下的骨下袋。注意第二磨牙近中骨缺损完全闭合。

图 9 再次手术翻开观察发现骨缺损区充满了骨样组织。

4 讨论

最近，体外和动物研究的组织学发现表明DPSCs的应用可能促进骨下袋的骨和牙周再生，包括新的牙骨质、牙周膜和牙槽骨形成[1]。据作者所知，尚未获得人类的临床资料。

因此，本篇病例报告检测自体DPSCs植入未经治疗的骨内袋中是否能促进牙周修复或再生。将含DPSCs的单细胞悬液负载至不显影的生物材料中并快速吸附于其中，填入骨壁和牙根面成角的一壁或二壁骨袋直至完全充满。选择有不利结构的骨下袋，因为低潜能、未经治疗的骨下袋可以更好地检验再生效能，而且与大多数临床情况更为相近。

1年后检查发现CAL共增加6mm，剩余PPD为3mm。未发现龈缘的根向移位。影像学测量骨充填为5.2mm。再次手术翻开观察证实骨缺损处充满了新生的骨样组织。由于未做组织学评估，所以关于再生骨－牙根面界面的组织特点未作明确的说明。临床附着水平增加可能是因为通过新附着或者修复愈合来实现有效的牙周再生，修复愈合表现为长结合上皮。然而，以前的调查报告影像学分析和再次手术翻开观察所提供评估骨变化的有效参数足以证明牙周再生手术的临床效果。

从牙髓中提取干细胞是非常高效的。从单颗牙齿中分离大量DPSCs的潜力很大，可以用来再生多个骨下袋。目前已提出不同的机械分离法和酶消化法用来筛选干细胞组分。最近在一个人类阻生第三磨牙拔除术和上颌窦提升术后再生剩余缺损骨组织的临床方案中，展示了一种基于尺寸的机械分离法收集DPSCs的效能。机械分离后，用孔径为70μm的细胞筛网过滤牙髓细胞。在这一尺寸上，表达干细胞抗原的细胞比例明显上升，避免了磁性或流式细胞分选。所获得的单细胞悬液中CD34+干细胞的比例达77%。这一技术的优点是无需进行任何细胞操作。

本次调查采用相同方案来获取富含牙髓干细胞的单细胞悬液并负载至生物惰性支架材料上。另一个需要解决的问题是使用能显著影响移植干细胞的存活率和分化率的适宜支架材料。根据生物学和机械性能选择Ⅲ型胶原。胶原是未分化间充质组织的主要蛋白，有研究报告胶原海绵能够在分化的第1周促进干细胞分化，并刺激钙化组织的形成。此外，它不显影，且在牙周再生过程中呈惰性。

需要指出的是DPSCs来源于一名56岁的牙周炎患者。不同于其他来源的干细胞，供者的年龄似乎无关紧要。当比较从年轻受试者和老年受试者获取的DPSCs时，在增殖率、功能行使和组织再生潜能方面未发现生物学差异。这些发现使DPSCs成为一个有前景的治疗工具。

骨下袋的手术处理采用改良龈乳头保留技术。最小程度地翻瓣并确保骨缺损处仔细清创。避免作垂直减张切口。龈瓣有限的张力和光反射减少了手术创伤，并提高了龈瓣稳定性。共轴透照外科显微镜的使用提高了精确轻柔的龈瓣处理、彻底的骨缺损／牙根清创和缝合所需要的精确性。

选择胶原支架而不是骨替代材料作为DPSCs的载体工具。胶原的应用进一步提高了龈瓣稳定性；然而，胶原对干细胞行为包括分化和增殖方面的影响仍不清楚。此外，胶原的阻射性可能妨碍对DPSCs/胶原海绵的内在骨再生潜能的观察。

未采用微创手术处理骨下袋。微创的优点是减少龈瓣张力和移动性，增加血凝块和伤口的稳定性，为再生修复提供一个稳定空间。视野是微创手术需要解决的问题之一。龈瓣的光反射极少，缩小视角尤其缩窄了穿透术区的光线。在外侧段更难抵达骨袋的最深处以确保根面／骨缺损区充分消毒。另一个需要考虑的方面是牙根形态，可能会阻碍龈下牙石的彻底去除。已经证实残余牙石作为生物屏障阻碍了新附着或功能性附着器的再生。

显著影响牙周再生手术结果的重要因素是术后口腔卫生和剩余牙周感染水平。采用严格的菌斑控制方案（FMPS ＜ 10%）和每2个月进行1次足以控制牙周感染的牙周维护治疗（FMBS ＜ 10%）。12个月内实验的骨缺损处未出现菌斑堆积或探诊后出血。

考虑到缺乏评估牙髓干细胞临床应用的试验，很难与其它研究建立比较。本篇报告中CAL的增加量始终比一篇系统性评价（2.48mm，置信区间[CI]:1.44到3.52）或以前单独采用龈乳头保留翻瓣术或联合釉基质衍生物的临床试验（范围：3.1到3.6mm）所报告的同种资料数据更有优势。作者考虑仅使用釉基质蛋白，因为其诱导牙周再生的生物学机制可能与DPSCs更有可比性。

该技术的适应证是解释结果时需要解决的另一个问题。它要求患者有一颗无法治疗的牙齿作为DPSCs的供区。需要指出的是该牙齿必须为活髓牙，无龋损且未累及牙周，从而避免细菌感染牙髓。骨

下袋的数量不是限制因素，因为同一手术期间可以治疗多个骨缺损。

5 结论

临床和影像学结果以及再次手术翻开观察表明自体 DPSCs 的应用可能成为深而未经治疗的骨下袋的临床治疗相关程序。由于缺乏组织学分析，牙周组织再生须谨慎解释。

6 鸣谢

作者们报告无与本研究有关的利益冲突。本研究由作者们各自的机构支持。

参考文献 略