

犬牙囊干细胞膜片的构建及生物学特性的研究*

黄 闯 宋镜明 宋 扬 刘 佳 王丽颖 金作林[△]

(第四军医大学附属口腔医院正颌科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 利用犬牙囊干细胞(Dental Follicle Stem Cells, DFSCs)构建细胞膜片并研究其生物学特性。方法 取4至6月龄犬尖牙牙胚,分离培养DFSCs,鉴定。用含抗坏血酸的培养基诱导2周构建细胞膜片,并通过倒置显微镜、HE染色、茜素红染色、油红染色、扫描电镜(SEM)对膜片进行形态学检测,检测成骨、成脂能力。结果 DFSCs于体外被成功分离、纯化、培养,细胞克隆形成率约为5.1%。流式鉴定为CD29+CD44+CD34-,增殖能力及克隆形成能力较强,并能成功构建成细胞膜片。光镜和电镜显示膜片细胞排列紧密,细胞基质分泌多,油红O染色后可见细胞内有大量脂滴形成。(B)茜素红染色后可见大量清晰的钙结节形成。结论 成功构建犬DFSCs膜片,并证明其具有较强的成骨能力,为进一步利用犬DFSCs膜片修复牙槽骨缺损的研究提供条件。

关键词 牙囊干细胞(DFSCs) 细胞膜片 分化

中图分类号 Q95-3, Q75, R813 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)02-226-05

Construction of Dental Follicle Stem Cell Sheet and its Biological Characteristics in Beagle Dogs*

HUANG Chuang, SONG Jing-ming, SONG Yang, LIU Jia, WANG Li-ying, JIN Zuo-lin[△]

(Dept. of Orthodontics, Stomatological College, Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To study the construction of dental follicle stem cell sheet and its biological characteristics in Beagle dogs.

Methods: After identification, DFSCs were sub-cultured to construct DFSCs sheet. Cell sheet was investigated by inverted microscope, HE staining and scanning electron microscope (SEM). DFSCs sheets were induced by adipogenesis inducing medium and osteogenic medium for 14 days separately. Oil red staining and Alizarin red staining was applied to examine adipogenic induction and osteogenic induction.

Results: DFSCs showed typical spindle shape. Colony-forming assay results showed about 5.1% DFSCs colony formation. DFSCs were positive for CD29 and CD44, but negative for CD34. MTT manifested the growth and proliferation was good. Cell cycle testing showed: G1=87.1%, G2=5.54%. DFSCs sheets were constructed successfully and its growth in multilayer. It found that DFSCs expanded adequately and extracellular matrix(ECM) was clear and numerous in scanning electron microscopy. Oil red staining and alizarin red staining both demonstrated positive reactions in DFSCs sheet after induction. **Conclusion:** It suggested that DFSCs cell sheet may be constructed and has a strong bone-forming ability.

Key words: Dental Follicle Stem Cells(DFSCs); Cell sheet; Differentiation

Chinese Library Classification: Q95-3, Q75, R813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-226-05

前言

细胞膜片技术已成为一种新的组织重建技术,"细胞膜片工程"已开创了再生医学的一个全新领域^[1,2]。细胞膜片不含任何可降解支架材料,且通过膜片的复合可形成三维立体结构^[3-5]。细胞膜片技术在组织工程方面的应用十分广泛^[6-8]。日本学者 Akizuki 应用细胞膜片技术于2005年成功构建牙周膜细胞膜片,再生比格犬牙周组织^[9]。2009年日本学者 Takanori I 利用牙周膜细胞构建复层细胞膜片,修复牙槽骨缺损^[10]。2011年 Bai YD 等学者利用 Hertwig 上皮根鞘细胞与牙囊干细胞共培养构建出单层的细胞膜片^[11]。

牙囊(Dental Follicle, DF)是由外胚间充质衍生的结缔组

织,包含可形成牙体支持结构的前体细胞^[12-15]。大量研究表明牙囊中含有多个亚群细胞,已被证明其中存在部分增殖及分化能力较强的干细胞^[16,17]。在特定的培养条件下,这些牙囊干细胞(Dental Follicle Stem Cells, DFSCs)可以分化成为成牙骨质细胞或者成骨细胞样细胞^[18]。这说明 DFSCs 含有不同种群的干细胞,具有多向分化潜力。但目前国内外对于 DFSCs 在组织工程方面应用研究大多停留在将 DFSCs 作为种子细胞与支架材料相结合,植入体内形成组织,观察修复能力。而应用 DFSCs 构建细胞膜片并对膜片性能进行测定鲜有报道。本实验通过体外分离纯化犬牙囊中的 DFSCs,构建 DFSCs 细胞膜片,观察 DFSCs 细胞膜片的生物学特性,为进一步研究牙周组织缺损提供有力条件。

* 基金项目 国家自然科学基金(30973353)

作者简介 黄闯(1984),男,口腔正畸学硕士研究生,住院医师,主要研究方向:牙周缺损的修复与美容治疗。

电话:13991906454, E-mail: hshuai616@yahoo.com.cn

[△]通讯作者 金作林,电话:13571490918, E-mail: zuolinj@163.com

(收稿日期 2011-10-06 接受日期 2011-10-30)

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验动物选用健康纯系雄性比格犬 (Beagle) 4 只, 3 月龄, 体重约 2.0 kg~2.5 kg, 由第四军医大学动物实验中心提供。且经过口内检查排除牙齿、牙龈及牙槽骨病变。

1.1.2 试剂和仪器 DMEM 培养基 (Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青公司), I 型胶原酶 (Sigma 公司, 美国), β -甘油磷酸钠 (Sigma 公司, 美国), L- 抗坏血酸 (Sigma 公司, 美国), 胰蛋白酶 (Sigma 公司, 美国), 苏木精 (上海蓝季科技公司), 吡哆美辛 (Sigma 公司, 美国), 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (Sigma 公司, 美国), 地塞米松 (Sigma 公司, 美国), L- 谷氨酰胺 (Sigma 公司, 美国), 茜素红 (Sigma 公司, 美国), 青霉素 - 链霉素 (Gibco 公司, 美国), 二甲基亚砷 (Sigma 公司, 美国), CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 公司, 美国), 离心机 (Heraeus Cryofuge 8000, 德国), 倒置相差显微镜 (Nikon, 日本)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 DFSCs 体外分离培养 按照 Yalvac^[9] 等分离 DFSCs 及纯化细胞的方法进行, 简述如下 3 月龄健康 Beagle 犬 4 只, 无菌条件下切开粘骨膜层, 完整挖出上、下尖牙牙胚, 剥离牙囊组织, 收集组织块, 625 U / ml 的 I 型胶原酶于 37 °C 消化 60 min, 加入 1 ml 含 10% 胎牛血清 (FBS) 及双抗的 DMEM 培养液, 接种到 6 孔板上, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内 3 h, 之后补加 5 ml 培养液, 继续培养 2 天后换液。原代细胞生长达 70%~80% 融合时, 利用差速消化法传代。加入适量浓度为 2.5 mg / ml 胰蛋白酶至梭形细胞收缩变圆, 而多角形细胞形态无明显变化时终止消化。收集细胞悬液, 按 1 : 2 比例进行传代培养。

1.2.2 DFSCs 克隆形成率 将第 3 代 DFSCs 以胰酶消化制成细胞悬液, 按 1×10^3 个细胞种入直径为 70 mm 的培养皿中, 加入 5 ml 培养液, 每 3 天更换培养液, 培养 14 天后, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min, 甲苯胺蓝染色液染色 10~20 min。体视显微镜下计大于 50 个细胞的克隆数, 并计算克隆形成率 (Colony forming efficiency, CFE)。克隆形成率 (%) = 克隆形成数目 ÷ 接种细胞总数 × 100%。

1.2.3 DFSCs 活力及增殖实验 MTT 法检测细胞活力及增殖。取处于对数生长期的第 3 代 DFSCs, 每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 每孔加培养液 200 μ l。次日始, 吸净原培养基, 加入新液 (180 μ l 培养液 + 20 μ l MTT 5 mg/ml 于 PBS 中溶解) 重新置入孵箱内, 4 h 后吸净原液后加入 150 μ l DMSO (二甲基亚砷), 震荡 10 min; 多样本光密度仪 (BIO-TEK, USA) 检测波长为 490 nm 时每孔光密度值 (OD)。持续八天。绘制生长曲线图。

1.2.4 流式细胞术检测 DFSCs 表面标记物 取生长融合达 80%~90% 的第三代 DFSCs, 常规消化离心, 按 1×10^6 个细胞加入含血清的 PBS 200 μ l, 再加入抗犬 CD29-FITC、CD34-FITC、CD44-FITC 单克隆抗体 (R&D Systems, USA) 1 μ l 混匀, 4 °C 孵育 1 h 后 PBS 清洗 1 遍, 再加入 400 μ l 含血清的 PBS 重悬细胞, 进行流式细胞术检测 (Becton Dickinson, USA)。

1.2.5 细胞周期检测 取第三代 DFSCs, 消化离心后, 加入 1 ml 的 PBS 混匀, 再加入 2 ml 的无水乙醇立即震荡混匀, 置 4 °C 孵

育 1 h 后离心 1000 r/m, 5 min 弃无水乙醇, 用 PBS 洗涤 2 次, 加 100 μ l PBS 将细胞吹散, 细胞数量为每份 5×10^5 ~ 1×10^6 个, 进行细胞周期检测 (Becton Dickinson, USA)。

1.2.6 DFSCs 膜的构建 将第三代 DFSCs 消化离心后, 以 1×10^5 个接种至直径为 50 mm 的培养皿中, 加入 5 ml 成膜诱导液 (含 100 μ g / mL 抗坏血酸, 200 ml / L 热灭活胎牛血清, 0.292 μ g / mL L- 谷氨酰胺, 100 U / ml 青霉素, 100 μ g / ml 链霉素)。每 2 天换一次液, 连续培养 2 周, 2 周后从培养皿边缘缓慢揭起膜片, 于体式解剖显微镜下拍照。

1.2.7 DFSCs 膜片扫描电镜检测 于细胞膜片培养第 5 天、第 10 天、第 15 天分别置于 0 °C 条件下 25 ml / L 戊二醛中固定 4 小时, 然后经脱水和临界点干燥处理, 样品表面喷镀薄层金膜, 在扫描电子显微镜 (HITACHI S-3000N) 下观察细胞膜片表面情况。

1.2.8 DFSCs 膜片的组织学染色 于细胞膜片培养第 10 天、第 15 天分别将标本置于 10% 中性甲醛固定液中过夜, 甲酸 - 甲酸钠复合脱钙液脱钙 2~3 d, 脱水, 石蜡包埋, 切取 10 μ m 的石蜡切片, 按常规方法行 HE 染色。

1.2.9 DFSCs 膜片的成脂诱导 于细胞膜片培养第 10 天后, 加入成脂诱导培养液^[30] (含体积分数 10% 胎牛血清, 浓度为 0.292 μ g / mL L- 谷氨酰胺, 100 U / ml 青霉素, 100 μ g / ml 链霉素, 200 μ mol / L 吡哆美辛, 0.5 mmol / L 异丁基甲基黄嘌呤 (IB-MX), 10 μ mol / L 胰岛素, 1 μ mol / L 地塞米松的 DMEM-HG 培养基)。每 2 天换一次液体, 经过 14 天的培养后, 常温下 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min, 经 0.3 % 油红 O 溶液染色 30 min, 倒置显微镜下照相观察。

1.2.10 DFSCs 膜片的成骨诱导 于细胞膜片培养第 10 天后, 加入成骨诱导培养液^[30] (含体积分数 10% 胎牛血清, 浓度为 0.292 μ g / mL L- 谷氨酰胺, 100 U / ml 青霉素, 100 μ g / ml 链霉素, 10 mmol / L β - 甘油磷酸钠, 50 mg / L 左旋抗坏血酸 10^{-7} mol / L 地塞米松的 DMEM-HG 培养基)。每 2 天换一次液体, 经过 14 天的培养后, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 经 0.1 % 茜素红 Tris-HCl (pH 8.3) 溶液孵箱中孵育 30 min, 倒置显微镜下照相观察。

1.2.11 DFSCs 膜片经成骨诱导后的电镜检测 细胞膜片经成骨诱导液培养 14 天后, 样本 0 °C 下置于 25 ml / L 戊二醛中固定 4 h, 脱水、临界点干燥处理、样品表面喷镀薄层金膜, 扫描电镜 (HITACHI S-3000N) 下观察细胞膜片表面钙结节形成情况。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用软件 SPSS16.0 对数据进行处理。MTT 法检测结果采用单因素方差分析, 流式细胞术结果采用卡方检验, 两组间均数比较用 t 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利用差速传代法得到纯化的 DFSCs

原代 DFSCs 2~4 h 即开始贴壁生长, 24 h 后完全贴壁并铺展 (图 1A)。经 2 次差速传代至第 3 代时即可获得纯化的 DFSCs (图 1B)。DFSCs 在 DMEM 培养液中增殖较迅速, 传代后 2~3 d 即可重新长满。

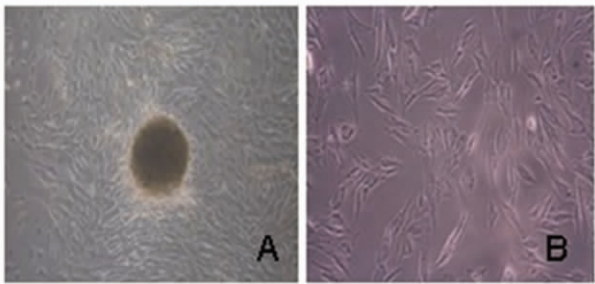


图 1 DFSCs 体外分离培养: (A)原代 DFSCs 24 h 完全贴壁并伸展。(B)第 3 代得到纯化的 DFSCs

Fig. 1 DFSCs preparation: (A)Primary passage DFSCs adhered and spread after 24h. (B) DFSCs have been purified at the 3rd passage

2.2 DFSCs 具有较强的活性及增殖能力

DFSCs 生长曲线呈 S 形, 接种后 1~2 天细胞处于潜伏期, 从第 3 天始进入稳定增长期, 至第 7 天达到增长最高峰。随后增殖开始减缓 (图 2)。

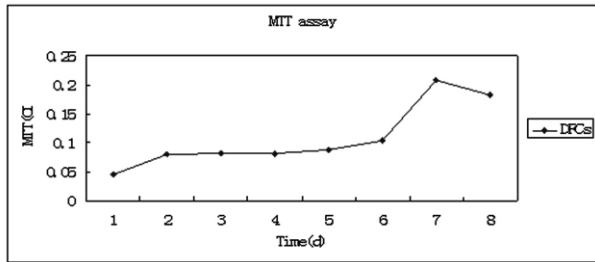


图 2 MTT 实验结果 生长曲线呈 S 形。横坐标为天数(d),纵坐标为光密度值(OD)

Fig.2 MTT assay: Growth curve was significant. X-axis is time(d), Y-axis is OD

细胞周期检测发现,DFSCs 处于 DNA 合成前期 (G1 期) 的细胞比例为 87.1%,处于 DNA 合成期 (S 期) 的细胞比例为 7.32%,处于 DNA 合成后期 (G2 期) 的细胞比例为 5.54% (图 3)。

2.3 DFSCs 中含有部分具有干细胞特性的细胞亚群

克隆形成实验发现 培养 14 天后细胞个数超过 50 个的细

胞集落 (图 4A) 平均约有 51 个,经计算细胞克隆形成率约为 5.1% (图 4B)。

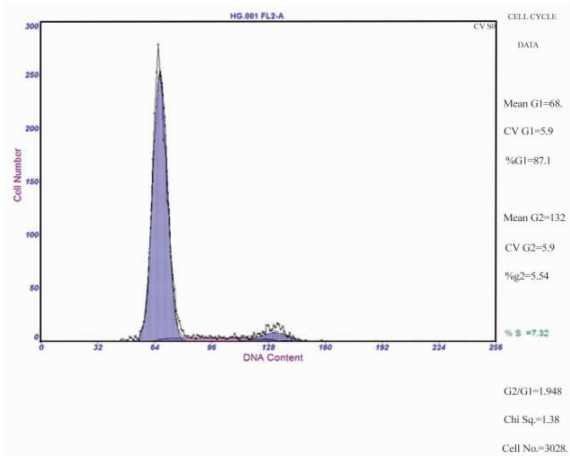


图 3 DFSCs 细胞周期检测结果 G1=87.1%, G2=5.54%, S=7.32%
Fig.3 Representative DFSCs cell-cycle distribution G1=87.1%, G2=5.54%, S=7.32%

流式细胞术检测发现 DFSCs 表面标记抗原 CD29 阳性表达结果为 78.0%,CD44 阳性表达结果为 94.5%,CD34 阳性表达结果为 1.7%,阴性对照蛋白阳性表达结果为 1.1%。最终结果显示 CD29、CD44 为强阳性 (图 5)。

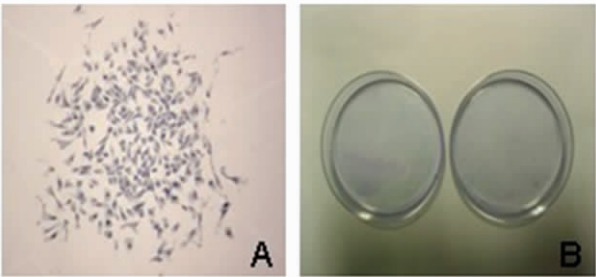


图 4 克隆形成 (A) 培养 14 天后细胞个数超过 50 个的细胞集落。(B) 每个培养皿上形成的细胞集落数

Fig. 4 Colony-forming (A) forming colonies after 14 days. (B) shows the colony-forming unit

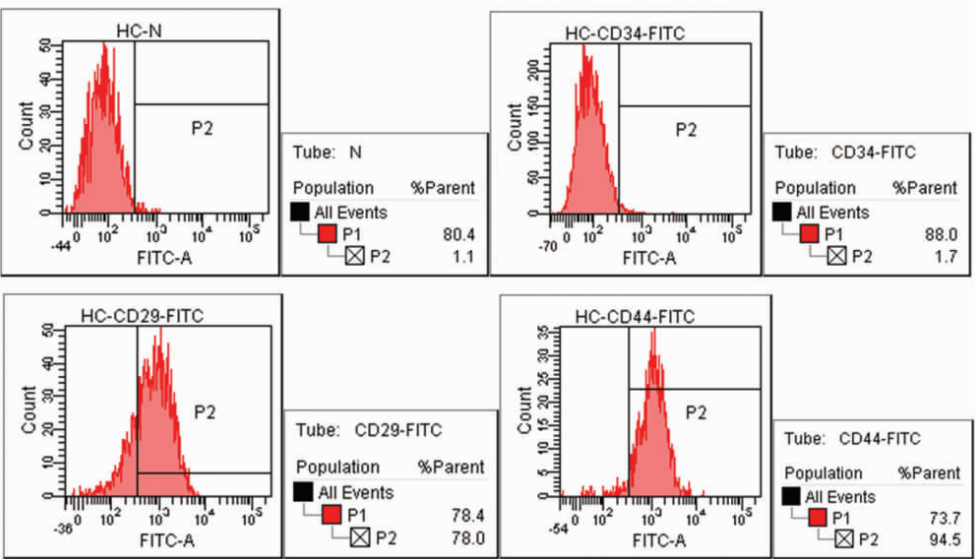


图 5 DFSCs 表面标记物表达 :CD29+CD44+CD34+, HC-N 为阴性对照

Fig. 5 Surface marker expression characteristics in DFSCs CD29+CD44+CD34+, HC-N served as a control.

2.4 利用 DFSCs 可以构建具有良好增殖及分化能力的细胞膜片

高密度接种后,成膜诱导液的培养 2 周,培养皿底部可见半透明乳白色薄膜样物质。用灭菌的眼科镊将细胞膜片沿培养皿边缘轻轻剥离,完全剥离后的细胞膜片呈现乳白色皱缩状(图 6A),并具有一定的厚度与强度。

HE 染色结果示 DFSCs 胞核为蓝色,胞质为粉色,细胞呈典型的复层生长,最多可达 5~6 层(图 6B),细胞外基质非常丰富且连接致密,类似于生物支架结构。

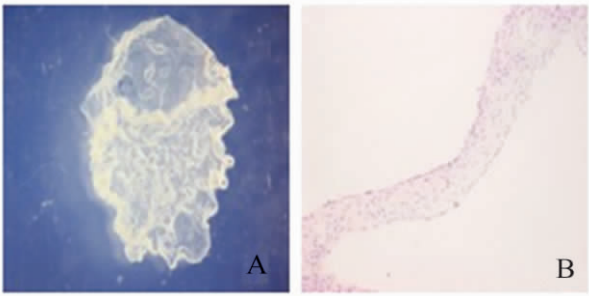


图 6 DFSCs 细胞膜片的形态学特征 (A)细胞膜片具有一定的韧性并且易于完整剥离。(B)HE 染色镜下见膜片最厚可达 6 层细胞
Fig. 6 Morphological characteristics of the DFSCs sheets: (A) The DFSCs sheets were tenacious, flexible and easily separated as intact sheets from the tissue culture plate. (B) H&E pictures showed that the cell sheets consisted of 6 layers of cells most

细胞膜片培养第 5 天扫描电镜下可见细胞排列紧密,呈纺锤形,伸展良好,通过伪足与其他细胞连接紧密且局部发生重叠(图 7A),细胞表面分泌颗粒开始聚集且分泌旺盛(图 7B)。细胞膜片培养第 10 天细胞已呈复层生长(图 7C),细胞外分泌大量絮状基质(图 7D)。膜片培养第 15 天细胞已呈明显的复层生长,伪足伸展良好(图 7E),细胞外有大量絮状基质将细胞包裹(图 7F)。

细胞膜片成脂诱导 14 天经油红 O 染色后可见细胞内有大量脂滴形成(图 8A),而经成骨诱导液培养 14 天的细胞膜片茜素红染色后可见清晰的钙结节形成(图 8B)。

3 讨论

牙周组织工程方法是目前治疗牙周缺损的热点,羟基磷灰石(HA)、聚乙醇酸(PGA)、磷酸三钙(TCP)、胶原蛋白等作为生物支架材料被广泛应用于牙本质及牙槽骨再生的研究中^[20]。传统的生物支架材料存在许多缺点,例如潜在的免疫原性、炎症反应、较低的生物活性、不匹配的降解速率、不可控的细胞与材料之间的相互作用等。并且种子细胞与支架材料结合的过程中,有 30%~40% 的细胞不能粘附于支架而流失,接种密度和分布也不均匀。其次,细胞与支架材料结合后需重新分泌细胞外基质,分泌产生的某些蛋白是无法黏附于材料表面的,最终导致细胞黏附失败,细胞活性丧失^[21]。细胞膜片技术的出现最终弥补了传统支架材料存在的缺陷。

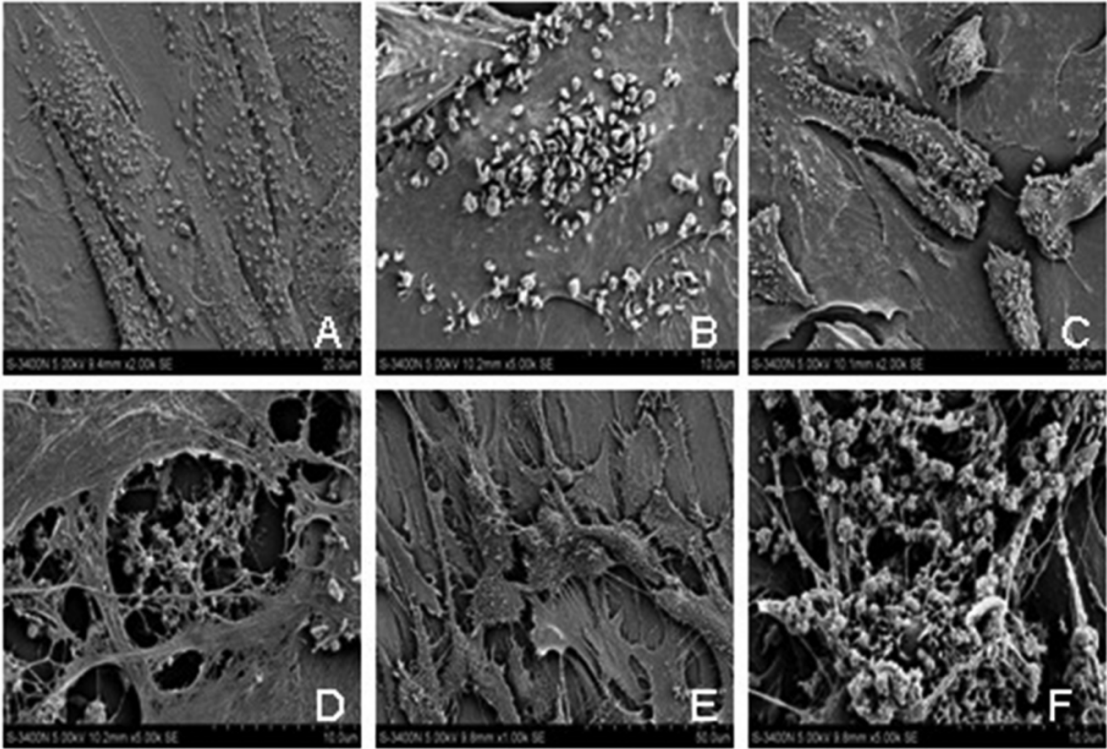


图 7 DFSCs 细胞膜片电镜检测 (A,B)构建 5 天时的细胞膜片,细胞表面可见大量分泌颗粒。(C,D)构建 10 天时的细胞膜片。(D)可见细胞外絮状基质。(E,F)构建 15 天时的细胞膜片。(F)可见大量细胞外基质将细胞包裹

Fig. 7 SEM of DFSCs sheet: (A,B) a large amount of secretory particles on the surface of DFSCs after cell sheets cultured 5 days. (C,D) showed the morphology of the cell sheet cultured for 10 days. (D) showed the flocculent extracellular matrix. (EF) the cell sheet cultured for 15 days; (F) DFSCs are embedded by a large quantity of flocculent extracellular matrix

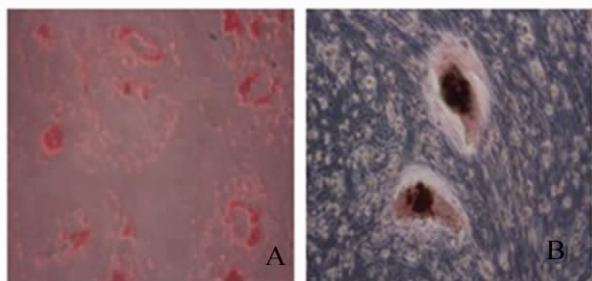


图 8 细胞膜片的成脂、成骨能力 (A) 成脂诱导 14 天后油红 O 染色可见细胞内有大量脂滴形成。(B) 成骨诱导 14 天后茜素红染色可见大量清晰的钙结节形成

Fig. 8 Adipogenic and osteogenic differentiation: (A) DFSCs sheet formed lipid clusters that stained positive for Oil Red O following 14 days of adipogenic induction. (B) shows a high number of red-staining nodules after 14 days' induction

DFSCs 存在于牙囊中,被普遍认为是成牙骨质细胞、牙周膜细胞、牙槽骨细胞的前体细胞,其中部分细胞亚群具有干细胞的作用,可修复牙周组织缺损^[12-19]。而青少年智齿不能正常萌出的发病率日益增高,在某些地区发病率甚至高达 76%^[22],有大量带着牙囊组织的智齿需要拔除,为我们提供了丰富的 DFSCs 来源。

在本研究中我们利用犬的牙囊在体外分离纯化培养获得 DFSCs (如图 1B),纯化后的 DFSCs 具有很好的克隆形成能力 (如图 4A)。同时,DFSCs 具有很强的分裂增殖能力,并可维持相对稳定的细胞性状。细胞表面抗原标记物检测显示 CD29+CD44+CD34-,与 Bettina^[23],Takahiro^[24]等人的实验结果一致,以上结果证实 DFSCs 含有部分具有干细胞特性的细胞亚群。DFSCs 所构建的膜片致密且具有一定厚度 (如图 6A),使膜片具有一定的弹性和稳定的机械性能,这种结构类似于人工支架,增加了膜片的可操作性。同时,DFSCs 细胞膜片还具有多向分化潜能,不仅能够分化为纤维组织,更可以向骨组织及牙骨质分化,从而可能成为牙周缺损原位修复的候选材料,用以原位再生包括牙骨质、牙周膜、牙槽骨在内的牙周复合结构。与 Bai YD 等用牙囊干细胞构建的细胞膜片相比,Bai 构建的膜片最厚处只有 2 层细胞,机械性能及韧性较差^[11]。且需与 Hertwig 上皮根鞘细胞共培养,操作繁琐,且膜片构建较不稳定。而本实验构建的膜片最厚处约有 6 层细胞,机械性能更佳,具有更好的临床运用前景。

Akizuki^[9]、Takanori Iwata^[10]、Flores^[25]等一些学者已经开始利用牙周膜干细胞构建细胞膜片对牙槽骨、牙周膜、牙骨质进行修复,动物实验已取得部分成功,但仍存在很多不足。首先,人牙囊干细胞来源较牙周膜干细胞更为广泛,自体牙囊细胞构建膜片减少了免疫原性,临床应用前景更加可观^[22]。其次,其构建方法均是利用温敏材料构建单层膜片,或将单层膜片复合形成复层膜片,此种方法价格昂贵,构建膜片的大小受温敏材料的限制,不利于膜片的大量应用。而本实验采取成膜诱导液的方法不受此类限制。更重要的是,牙囊细胞是牙周膜细胞的前体细胞,理论上具备更强的增殖和分化能力,能够更为有效的再生出牙周组织。以上学者 (包括 Bai) 构建膜片后,并未对膜片

的多向分化能力进行验证,而本实验成脂、成骨诱导的成功弥补了上述的不足。

本研究结果表明,利用 DFSCs 构建的膜片具有稳定的机械强度和物理特性,并弥补了传统支架的诸多不足。经成骨诱导液培养的细胞膜片胞外基质含大量矿化结晶体,为骨的矿化奠定了良好的生物支架基础。但本实验缺乏动物体内实验的支持,还需进一步完善体内成骨的实验。相信随着研究的深入,DFSCs 细胞膜片将成为修复牙周缺损的有效工具之一。

参考文献 (References)

- [1] Yang J, Yamato M, Kohno C, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (33):6415-6422
- [2] Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering [J]. *Mater Today*, 2004, 7 (10):427
- [3] Nahoko A, Tatsuya S, Yukiko T, et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering [J]. *Biomaterials*, 2010, 1016 (10):1-7
- [4] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction [J]. *Biomaterials*, 2003, 24 (13): 2309-2316
- [5] Michel M, Heureux N, Pouliot R, et al. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(6): 318-326
- [6] Kanzaki M, Yamato M, Yang J, et al. Dynamic sealing of lung air leaks by the transplantation of tissue engineered cell sheets [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(29):4294-4302
- [7] Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets[J]. *Nat Med*, 2007, 13(7):880-885
- [8] Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, et al. Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps[J]. *BJU Int*, 2004,93(3):1069-1075
- [9] Akizuki T, Oda S, Komaki M, et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs [J]. *J Periodont Res*, 2005, 40(10): 245-251
- [10] Takanori I, Masayuki Y. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model [J]. *Biomaterials*, 2009, 10(7):1010-1016
- [11] Bai YD, Bai YX, Kenichi M, et al. Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells [J]. *Bone*, 2011, 48 (2): 1417-1426
- [12] Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth [J]. *Matrix Biol*, 2005, 24(9): 155-165
- [13] Saito M, et al. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT[J]. *Bone Miner Res*, 2005, 20(3): 50-57
- [14] Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells[J]. *Bone*, 2002, 31(12): 606-611
- [15] Handa K, Saito M, Tsunoda A, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo [J]. *Connect Tissue Res*, 2002, 43(7): 406-408

(下转第 220 页)

学学报,2009,26(8):620-622

Sun Min-ge, Li Shu-bin, Zhou Li, et al. Chemical constituents of active pharmaceutical ingredients of elemene [J]. J Shenyang Pharm Univ,2009,26(8):620-622

- [2] 陈晓,魏福祥,瞿延辉. 莪术中有效成分 --- 榄香烯的研究进展 [J].河北化工,2003,6: 9-13

Chen Xiao, Wei Fu-xiang, Qu Yan-hui. Development in the Study of Elemene---the active principle of Rhizoma Curcumae [J]. Hebei Chem Eng Ind,2003,6:9-13

- [3] 姚淑娟,刘伯阳,吕丽艳. 榄香烯提高肿瘤化疗药物疗效及抗免疫抑制作用的研究 [J]. 中医医学刊,2006,24(3): 456-457

Yao Shu-juan, Liu Bai-yang, Lv Li-yan. Studies of reducing poison and increasing effect of Elemene emulsions on immune function of tumor-bearing mice after chemotherapy [J]. Chin Arch Trad Chin Med,2006,24(3): 456-457

- [4] 杨华,易红. 我国微乳技术在药学领域中的研究进展 [J]. 中国新药杂志,2006,15 (10):764-769.

Yang Hua, Yi Hong. Advances on pharmaceutical microemulsion in China [J]. Chin J New Drugs,2006,15 (10):764-769

- [5] Yin YM, Cui FD, Mu CF, et al. Docetaxel microemulsion for en-

hanced oral bioavailability: preparation and in vitro and in vivo evaluation [J]. J Control Release, 2009, 140(2): 86-94

- [6] 曾昭武,李铨璐,周广林. 超快速液相色谱法测定榄香烯脂质体的含量及包封率的研究[J]. 中医药导报,2010,16(7):100-101

Zeng Zhao-wu, Li Cheng-lu, Zhou Guang-lin. Determination of the content and entrapment efficiency of Elemene liposomes with UFLC [J]. Guiding J Trad Chin Med and Pharm,2010,16(7):100-101

- [7] 周颖,刘玮. 微乳及自微乳给药系统的药学应用进展 [J]. 西北药学杂志,2008,23(1):56-58

Zhou Yin, Liu Wei. Advances on pharmaceutical application of microemulsion and self-microemulsion drug delivery system [J]. Northwest Pharm J,2008,23(1):56-58

- [8] Cheng MB, Wang JC, Li YH, et al. Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme [J]. J Control Release, 2008, 129(1): 41-48

- [9] Vikas Bali, Mushir Ali, Javed Ali. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2010,76 (2):410-420

(上接第 230 页)

- [16] Zhao M, Xiao G, Berry J E, et al. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype[J]. Bone Miner Res, 2002, 17(7): 1441-1451

- [17] Luan X, Ito Y, Dangaria S, et al. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium [J]. Stem Cells Dev, 2006, 15(5): 595-608

- [18] Morszeck C, Moehl C, Gotz W, et al. In vitro differentiation of human Dental Follicle Stem Cells with dexamethasone and insulin [J]. Cell Biol Int, 2005, 29(3): 567-575

- [19] Yalvac ME, Ramazanoglu M, Gumru OZ, et al. Comparison and optimisation of transfection of human Dental Follicle Stem Cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electroporation [J]. Neurochem Res, 2009, 34(7):1272-1277

- [20] Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, et al. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regenera-

tion [J]. Biomaterials, 2007, 28(4):680-689

- [21] Lu H, Wu ZF, Tian Y, et al. A study on the effects of cells and scaffolds tissue engineering on the periodontal regeneration [J]. Chinese stomatology, 2004, 39(3): 189-192

- [22] Wang Zheng-Qian, Wang Guang-Yao, et al. Oral epidemiological investigation and analysis of 16-19 year olds in Wenzhou City [J]. Chinese Clinical Medicine, 2003, 69(6):11552-11553

- [23] Bettina Lindroos, et al. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 368(6): 329-335

- [24] Takahiro Yagyu, Etsuko Ikeda, Hajime Ohgushi, et al. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla[J]. Archives of oral biology, 2010, 55(6): 68-67

- [25] Flores MG, Yashiro R, Washio K, et al. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats [J]. Clin Periodontol, 2008, 35(6): 1066-1072