

器官型口腔黏膜感染模型 在宿主-微生物关系研究的应用与展望



扫码阅读电子版

马皓祯 李晓岚

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院,广东省口腔医学重点实验室,广州 510055

通信作者:李晓岚,Email:lixiaolan@mail.sysu.edu.cn



李晓岚

【摘要】 构建体外口腔黏膜感染模型有助于研究口腔黏膜感染性疾病的发病机制与防治策略。器官型口腔黏膜感染模型以组织工程化口腔黏膜为基础,通过引入病原体提取物、接种浮游微生物或与细菌生物膜、唾液共培养,在体外模拟口腔微生物与宿主的相互作用。近年来,学者们通过该技术研究微生物对口腔黏膜疾病和牙周疾病的发生、发展作用及致病机理。本文将对器官型口腔黏膜感染模型的建立、研究进展与应用前景等进行阐述。

周疾病的发生、发展作用及致病机理。本文将对器官型口腔黏膜感染模型的建立、研究进展与应用前景等进行阐述。

【关键词】 组织工程; 生物膜; 口腔黏膜; 感染; 三维培养物

基金项目:国家自然科学基金(11772361、青年科学基金81400505)

引用著录格式:马皓祯,李晓岚.器官型口腔黏膜感染模型在宿主-微生物关系研究的应用与展望[J/CD].中华口腔医学研究杂志(电子版),2019,13(6):321-327.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2019.06.001

The applications and perspectives of organotypic oral mucosal infection model in host-pathogen interactions study

Ma Haozhen, Li Xiaolan

Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: Li Xiaolan, Email: lixiaolan@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 The construction of oral mucosa infection model *in vitro* is conducive to exploring the pathogenesis and prevention strategies of oral infectious diseases of oral mucosa. The organotypic oral mucosal infection model is based on the tissue-engineered oral mucosa, which is cocultured with the extraction of pathogens, planktonic microorganisms, biofilm or saliva, to mimic the interactions between the oral microbiome and the oral mucosa of the host. In recent years, researchers

have used this technology to study the role of microbes in the development and pathogenesis of oral mucosal diseases and periodontal diseases. This article reviews the construction, recent advances and perspectives of the organotypic oral mucosa infection model.

【Key words】 Tissue engineering; Biofilms; Mouth mucosa; Infection; Three-dimensional cultures

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (11772361, 81400505)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2019.06.001

口腔微生物组(oral microbiome)^[1]是定植于人体口腔内的所有微生物的集合,包括细菌、病毒、真菌、衣原体、支原体等,大部分以生物膜的形式存在。正常情况下,口腔微生物群落细菌间相对平衡,与宿主口腔黏膜组织屏障势均力敌,处于共生(commensal)状态^[2]。当口腔微生物组菌群失衡时,易引起口腔黏膜感染性疾病,如牙周病、口腔念珠菌病等。

组织工程口腔黏膜(tissue-engineered oral mucosa, TEOM)^[3]是一种通过组织工程技术在体外构建的三维(three-dimension, 3D)口腔黏膜模型,常分为上、下两层:上层为上皮细胞,以模拟口腔黏膜上皮;下层为镶嵌有成纤维细胞的3D支架,以模拟口腔黏膜固有层。TEOM为良好的口腔黏膜替代物。近年来,学者们尝试将TEOM与口腔微生物组在体外共同培养,构建体外3D口腔黏膜感染模型,即器官型口腔黏膜感染模型,在体外还原口腔微生物组与宿主口腔黏膜的共生状态,或模拟口腔病原微生物攻击下的宿主口腔黏膜、牙龈的损伤状态。本文就器官型口腔黏膜感染模型的构建、种类与培养方式进行阐述。

一、器官型口腔黏膜感染模型的发展

随着口腔黏膜感染性疾病的研究技术不断发

展,学者们先后开发了三类口腔黏膜感染模型,按模型的维度和位置,可分为体外二维(two-dimension, 2D)口腔黏膜感染模型、体外3D口腔黏膜感染模型,即器官型口腔黏膜感染模型,以及体内口腔黏膜感染模型。

1. 体外2D口腔黏膜感染模型:是病原体产物、浮游态微生物或生物膜与单层口腔细胞共培养的模式,用于探究口腔微生物对单一类型细胞的影响。Belibasakis等^[4]构建体外2D口腔黏膜感染模型,将龈上和龈下生物膜模型与单层人牙龈成纤维细胞共培养24 h,以探究两种生物膜对骨吸收的影响。骨吸收由核因子 κ -B配体受体激活剂(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)激活,并可被骨保护素(osteoprotegerin, OPG)阻断,RANKL/OPG比值大小与骨吸收程度成正比。结果表明,两种生物膜均诱导RANKL表达且引起RANKL/OPG比值升高,但龈下菌斑所对应的RANKL/OPG的升高幅度比龈上菌斑的更大,表明龈下生物膜诱导骨吸收的效力更强。这类模型制备简单,可大规模复制和标准化培养,但由于其缺乏多样化的细胞类型,无法反映不同功能的细胞在组织微环境下的反应和相互作用,具有一定的局限性。

2. 体内口腔黏膜感染模型:一般指在实验动物体内进行构建的模型,构建方法多种多样,如接种致病菌、局部结扎或饲以高糖黏性饲料^[5]等。此外,可同时构建牙周病骨缺损^[6-7],甚至引入糖尿病等系统性因素^[8]。然而,体内口腔黏膜感染模型受体内多种因素制约和干扰,难以研究单一过程及中间环节,此外,高昂的成本也限制了体内口腔黏膜感染模型的大规模应用。

3. 器官型口腔黏膜感染模型:即体外3D口腔黏膜感染模型。作为体外2D口腔黏膜感染模型与体内口腔黏膜感染模型之间的过渡,综合了二者的优势,既能还原体内口腔黏膜组织与口腔微生物的相互作用,又具有体外培养的直观性、可控性与易检测性,通过检测微生物的组成与活力,观察TEOM的组织形态变化,定量测定抗微生物肽或细胞因子分泌量等,研究口腔微生物组与宿主间的相互作用。

二、器官型口腔黏膜感染模型的建立

(一)组织工程化口腔黏膜

构建TEOM是建立器官型口腔黏膜感染模型的基础。组织工程口腔黏膜,又称口腔黏膜等效物、

3D全层口腔黏膜等效物,或基于牙龈上皮细胞构建的牙龈等效物(gingiva equivalents, GE),是由种子细胞与3D支架构建的体外口腔黏膜模型。由于不同文献对这类模型命名各不相同,本文将各文献中由种子细胞与3D支架构成的体外3D口腔黏膜模型统称为TEOM,其中种子细胞为牙龈上皮细胞的TEOM称为GE。

TEOM使用的种子细胞主要是上皮细胞和成纤维细胞,也有文献报道使用干细胞^[9-10]和永生细胞系^[11]。例如,Buskermolen等^[11]通过逆转录酶表达或人乳头瘤病毒16型的感染构建永生化角质形成细胞和成纤维细胞,用以开发TEOM,永生细胞系的引入有利于TEOM的大规模制备及标准化构建。

在TEOM的构建中,3D支架材料意义重大,不仅维持着模型结构的稳定,同时为细胞黏附和生长提供空间。常用的3D支架材料分为三类:天然支架、合成聚合物支架和重组聚合物支架。天然支架由动物或人类衍生的去上皮化的无细胞基质(如猪皮肤^[12]、人脱细胞真皮^[13])及天然聚合物(如胶原蛋白^[14]、弹性蛋白、黏多糖等^[15])构建,优点在于天然无毒,但受取材来源的制约。合成聚合物如聚乙醇酸(polyglycolic acid, PGA)、聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)构建的3D支架,可根据需要调整其机械性能或设计其形状^[16],在皮肤组织工程研究领域应用广泛,但尚未有用于口腔黏膜组织工程的报道。重组聚合物是使用重组DNA技术设计的多肽。例如,弹性蛋白样重组聚合物(elastin-like recombinant polymers)由重复的五肽(Val-Pro-Gly-X-Gly)组成。在弹性蛋白样重组聚合物的重复序列间插入具有生物学活性的短肽序列(如细胞黏附序列RGD肽)可改善其性质。Kinikoglu等^[17]首次利用RGD官能化的弹性蛋白样重组聚合物作为支架构建TEOM。结果显示,RGD官能化的弹性蛋白样重组聚合物促进了TEOM中上皮细胞、成纤维细胞和上皮干细胞的增殖,该研究体现了弹性蛋白样重组聚合物作为组织工程应用支架材料的潜力。

学者们以TEOM为基础,引入牙槽骨或种植体,构建更为复杂的口腔黏膜模型。Almela等^[18]首次开发了3D组织工程骨-口腔黏膜复合模型。组织工程化骨由大鼠骨肉瘤细胞和羟基磷灰石/磷酸三钙支架构建。TEOM由成纤维细胞包埋的胶原凝胶与上方被覆的永生化口腔角质形成细胞构成。使用纤维蛋白基粘合剂将TEOM掺入组织工程化骨

中,可构建组织工程骨-口腔黏膜复合模型,有效还原牙槽骨和覆盖于其上的口腔黏膜。另一篇文献中,研究者将钛植入物插入工程化的口腔黏膜中,进一步培养建立上皮附着,以模拟植入物-软组织界面,这是首个研究种植体周围软组织的体外3D模型^[19]。

(二)以TEOM为基础构建器官型口腔黏膜感染模型

完成TEOM后,在TEOM中加入病原体提取物、接种浮游微生物或接种生物膜,共培养一段时间,构建器官型口腔黏膜感染模型。由于各文献对此类模型的命名不尽相同,本文对所有在TEOM基础上加入病原体提取物、接种浮游微生物或接种生物膜的模型统称为器官型口腔黏膜感染模型。此类模型可用于研究口腔黏膜感染性疾病发病机制,或可作为口腔感染性疾病治疗的临床前研究模型。

1. 加入病原体提取物:病原菌细胞壁成分脂多糖可诱导TEOM产生类似炎症的病理改变,形成最简单的一类器官型口腔黏膜感染模型。这类模型建立方法简单,可大规模复制,但病原体提取物仅能模拟特定病原体的毒性影响,无法展现口腔生物膜内多菌种相互作用。

Liu等^[20]用10 μg/mL牙龈卟啉单胞菌脂多糖处理TEOM,初步研究牙周炎患者Wnt/β-catenin信号通路与EMMPRIN/MMP信号通路之间的相互作用。Wnt/β-catenin信号通路刺激成骨,可对抗牙周病引起的牙槽骨吸收。EMMPRIN/MMP信号通路与炎症严重程度呈正相关。该研究发现,Wnt/β-catenin信号通路的激活可下调EMMPRIN/MMP-2、EMMPRIN/MMP-9途径,而下调EMMPRIN可抑制Wnt/β-catenin信号通路的传导。

日本齿科大学的学者们在GE中引入人单核细胞,并加入牙龈卟啉单胞菌脂多糖和佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA),以模拟牙周组织感染时的炎症反应^[21]。细胞固定和免疫染色后发现,该模型反映牙周感染的主要病理变化,包括免疫细胞活化及上皮细胞、成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞之间的相互作用等。

放线共生放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)被认为是侵袭性牙周炎的关键病原体^[22],脂多糖是其主要的毒力因子。Bedran等^[23]在GE中加入放线菌的脂多糖,模拟侵袭性牙周炎的病理改变,再加入抗炎剂hBD-3和LL-37以探究其抗

炎特性。结果显示,hBD-3和LL-37发挥协同作用,导致多种细胞因子(如GRO-α、G-CSF、IP-10、IL-6和MCP-1)分泌减少。hBD-3和LL-37的组合有望成为治疗侵袭性牙周炎的辅助疗法。

2. 接种浮游微生物:TEOM构建完成后,在培养基中加入浮游态微生物,共培养一段时间,可一定程度上模拟口腔内微生物与宿主之间的相互作用。

de Carvalho Dias等^[24]将一定数量的角质形成细胞掺入含有人牙龈成纤维细胞的胶原凝胶支架中,共培养14 d以构建TEOM(该文献称“重组口腔黏膜组织 reconstituted oral mucosa tissue”)。在TEOM培养基中加入白色念珠菌或金黄色葡萄球菌的悬浮液8或16 h后,对TEOM进行固定和染色,并测定上清液中乳酸脱氢酶的量,以定性定量评估组织损伤。在白色念珠菌刺激下,可见菌丝侵入TEOM上皮细胞,且细胞释放的乳酸脱氢酶量较多,证明白色念珠菌能感染和破坏TEOM;而金黄色葡萄球菌组未出现明显的组织破坏,上清液中乳酸脱氢酶较少,可能提示单一细菌无法感染TEOM。该研究提示,口腔黏膜组织感染可能需要多种病原体共同作用,不同病原体对口腔黏膜的损伤程度不同。

3. 接种生物膜:在TEOM表面接种生物膜,可构建器官型口腔黏膜感染模型。生物膜模型分为两种,一种是将致病菌群置于普通的生物膜培养基中培养,获得单/多菌种致病菌生物膜模型;另一种是将提取自健康人的唾液生物膜(包括致病与非致病菌)置于模拟口腔疾病微环境的培养基中,诱导其成为致病性生物膜。

Gursoy等^[25]将具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)接种至普通培养基(血平板,37℃下厌氧条件)培养,获得单菌种生物膜模型。具核梭杆菌是革兰氏阴性严格厌氧菌,在牙周病中起主要作用。将生物膜模型接种至在GE(该文献中称“器官型细胞培养物 organotypic cell culture”)顶部,在5% CO₂下孵育24 h。使用苏木精和曙红,Ki-67和高碘酸-希夫染色评估GE的形态变化和细菌的侵袭能力。结果表明,与浮游态细菌相比,细菌在生物膜状态下对GE的细胞毒性作用和侵袭性更强。Guggenheim等^[26]把在牙周病发病部位积累较多,并可被计数和检测的多个菌种筛选出来,相应菌株置于薄膜涂覆的羟基磷灰石圆盘上培养,建立多菌种Zürich龈上/龈下菌斑生物膜模型,将其置于TEOM表面,模拟牙周炎的发病过程。

牙周病患者的口腔微生物种类和比例是存在个体差异的,而以往的做法是在TEOM上接种统一的致病菌生物膜,这种可复制的口腔黏膜感染模型只能代表牙周病患者口腔微生物组的平均水平,无法体现个体差异,这可能影响模型的应用潜力。针对这个问题,Janus等^[7]提取10位健康志愿者的唾液生物膜接种至诱导培养基(含蛋白质)培养72 h,诱导健康唾液生物膜变为“致牙周病型”生物膜。牙周病期间,血管通透性增加,血液中的蛋白质漏出至龈沟液,为龈沟液中含蛋白水解酶的细菌提供理想的底物,使这类细菌大量繁殖,导致口腔菌群失调。因此,将来自健康人的唾液生物膜接种至富含蛋白质的培养基,可诱导致牙周病微生物大量繁殖。结果表明,向培养基中添加蛋白质可导致所有时间点所有志愿者唾液微生物的一般蛋白酶活性及牙周炎特异性蛋白酶活性明显增加。由于细菌蛋白酶可以用作牙周疾病的标志物,因此可认为研究者成功构建“致牙周病型”生物膜。通过将“致牙周病型”生物膜与“共生型”生物膜(培养基中不加蛋白质)分别接种至GE共培养24 h后,发现“致牙周病型”生物膜与“共生型”生物膜均使GE炎症细胞因子分泌增加(包括IL-6、CXCL8、CCL2和CCL20),且“共生型”生物膜引起的炎症反应远远大于“致牙周病型”生物膜^[27]。该结果提示,与“共生型”生物膜相比,“致牙周病型”生物膜可能具有早期

免疫逃逸特性。相较于对生物膜模型进行菌种组成分析,对生物膜进行致病型分析所需时间短,并能进行高通量分析,因此这类通过培养基诱导获得的致病型生物膜的应用前景更为广阔。

(三)器官型口腔黏膜感染模型的进展

近年来,在口腔生物膜(或病原体提取物、浮游态微生物)与TEOM共培养系统的基础上,引入牙体硬组织、免疫细胞等,并不断延长共培养时间,以构建更符合口腔内微环境的器官型口腔黏膜感染模型。

1. 引入免疫细胞:对于口腔黏膜感染性疾病,宿主的免疫反应是一把双刃剑,既能防御微生物的入侵,又可能因免疫过度应答而对机体造成损伤。为模拟宿主免疫反应,学者们开始尝试在口腔微生物-口腔黏膜组织共培养系统中引入免疫细胞。

Bao等^[28]在动态灌注系统中构建器官型口腔黏膜感染模型,首次将人骨髓单核细胞Mono-Mac-6引入生物膜-TEOM共培养模型中(图1)。该模型模拟牙周炎期间,结合上皮附着下移,龈沟液携带招募的免疫细胞流经深牙周袋的过程,在更接近现实条件下研究生物膜相关的口腔黏膜疾病。生物膜攻击TEOM 24 h后,研究者检测到培养基上清液促炎细胞因子IL-1 β 、IL-2、IL-6和TNF- α 的上调,这与之前对牙周炎患者的体内研究结果一致^[29]。此外,研究者还对上清液进行蛋白质组学分析,结果发现,对比无生物膜的TEOM,与生物膜共培养24 h后

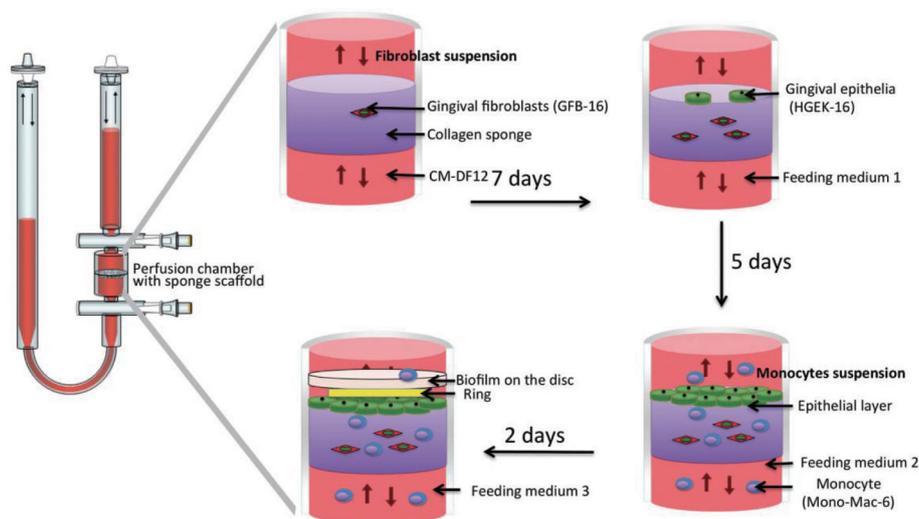


图1 动态灌注生物反应器中构建器官型口腔黏膜感染模型的流程图^[28] Perfusion chamber with sponge scaffold:有胶原海绵支架的灌注室;Fibroblast suspension:成纤维细胞悬液;Gingival fibroblasts(GFB-16):永生化人牙龈成纤维细胞GFB-16;Collagen sponge:胶原海绵;CM-DF12:成纤维细胞培养基(Dulbecco改良的Eagle培养基);Gingival epithelia(HGEK-16):永生化人牙龈上皮角质形成细胞HGEK-16;Feeding medium 1:培养基1;Monocytes suspension:单核细胞悬液;Epithelial layer:上皮层;Feeding medium 2:培养基2;Monocyte(Mono-Mac-6):人单核细胞系Mono-Mac-6;Biofilm on the disc:圆盘上的生物膜;Ring:圆环;Feeding medium 3:培养基3

TEOM分泌的大多数蛋白质下调,这些蛋白与细胞骨架重排、应激反应、细胞凋亡和抗原呈递过程有关^[30]。提示,生物膜的存在可能抑制宿主反应。

日本齿科大学的学者们也尝试在GE中引入单核细胞,并加入牙龈卟啉单胞菌脂多糖和佛波酯,以构建器官型口腔黏膜感染模型^[21]。研究发现,加入2 μg/mL脂多糖48 h后或加入10 ng/mL佛波酯72 h后,单核细胞分化为巨噬细胞,形成炎症病灶。

2. 引入牙体硬组织:龈沟处结合上皮附着于牙体硬组织上,形成了对抗口腔微生物的初级牙周防御结构。因此,在GE中引入牙体硬组织以建立结合上皮附着,对于研究牙周病是极其重要的。Gursoy等^[31]将上皮细胞接种于含成纤维细胞的胶原凝胶上,再将牙切片置于上皮细胞表面生长1~2周,以构建出一种类似龈沟的器官型牙体-上皮连接(organotypic dento-epithelial, OD-E)模型。将3日龄的具核梭杆菌生物膜置于OD-E模型的顶部,与OD-E模型共培养5或24 h。通过免疫组化测定上皮抗微生物肽的分泌量。实验测得hBD-2、hBD-3和LL-37的分泌量和定位特征与牙周病体内研究结果类似,证实该模型的应用潜力。后续研究中,学者们又发现具核梭杆菌生物膜可诱导OD-E模型中的上皮细胞迁移,并改变上皮细胞的增殖模式,这与牙周病发病早期口腔黏膜组织学变化相似^[32]。

3. 引入种植体:种植体周围感染的发生率很高,然而生物膜与种植体周围组织之间的相互作用仍未阐明。Ingendoh-Tsakmakidis等^[33]首次在体外构建种植体周围黏膜-生物膜模型(结构如图2所示)。用口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)生物膜或放线共生放线杆菌生物膜攻击种植体周围黏膜24 h,以研究这两种生物膜与种植体周围黏膜的相互作用。口腔链球菌生物膜是共生生物膜,对维持宿主-微生物的稳态有重要意义,而放线共生放线杆菌则是侵袭性牙周炎的主要病原体。研究者发现,口腔链球菌一方面减少IL-6、CXCL8和CCL2等细胞因子的分泌,另一方面又刺激TNF-α分泌,以保持宿主免疫反应的平衡。而放线共生放线杆菌通过下调宿主细胞存活和免疫反应相关基因,破坏微生物与宿主之间的平衡。

4. 共培养时间延长:健康成人的口腔微生物组长期处于共生状态,口腔黏膜感染性疾病通常也表现为慢性病程,但在现有的器官型口腔黏膜感染模型中,微生物-组织的共生周期较短(5 h^[31]~72 h^[21]),

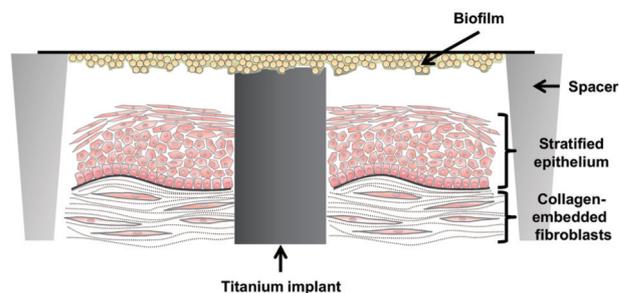


图2 种植体周围黏膜-生物膜模型的示意图^[33] Biofilm:生物膜; Spacer:间隔物; Stratified epithelium:复层上皮; Collagen embedded fibroblasts:嵌入成纤维细胞的胶原蛋白; Titanium implant:钛种植体

使得相关研究仅能模拟炎症初期,无法显示慢性病理过程如细胞增生、淋巴细胞浸润等。

Shang等^[34]突破了现有技术的局限,首次将GE(文献中称“重建的人牙龈组织 reconstructed human gingiva”)和取自健康志愿者的唾液生物膜(共生型生物膜)共培养长达7 d。结果表明,共生生物膜可促进GE上皮细胞高度增殖和分层,以防御微生物组的侵袭。此外,共生生物膜促进抗微生物蛋白Elafin、hBD-2和hBD-3和细胞因子IL-6、CXCL8、CXCL1、CCL20的分泌。这与体内研究结果一致,展现了微生物对宿主口腔黏膜组织的长期影响。

三、器官型口腔黏膜感染模型常用共培养方式

器官型口腔黏膜感染模型中,微生物与TEOM的共培养方式也各有不同。按TEOM 3D支架与培养基之间的关系分为常规培养基培养法、气-液交界培养法及生物反应器培养法。

常规培养基培养法^[35]是将基质支架和细胞浸没于培养基内,培养基上清液中含有细菌生物膜。该方法简单有效,但与口腔黏膜真实的营养状态相距甚远。

气-液交界培养法是指细胞外基质的底部与培养基接触,而模型中其他部分裸露于空气中^[31]。基质借助虹吸作用吸收培养基中的营养,并运输至其他细胞。这种培养法一定程度上模拟了口腔黏膜在体内真实的营养过程。

生物反应器培养法是指在持续流动速度恒定的液体培养基(图1)中构建器官型口腔黏膜感染模型^[28]。细胞处在温和的液体轨道中,使得在生物反应器中生长的细胞能够彼此附着,形成复杂的3D结构,并获得更“组织样”的表型^[36]。

四、展望

以TEOM为基础的器官型口腔黏膜感染模型作

为体外2D口腔黏膜感染模型与体内口腔黏膜感染模型之间的桥梁,既具有2D模型直观、条件可控、便于标准化生产等优势,又能充分模拟体内口腔微生物与口腔黏膜的生物学特性。近年来,器官型口腔黏膜感染模型迅速发展,帮助研究者们深入探索口腔黏膜感染性疾病的病理生理机制。然而,目前的研究模型仍有部分局限性。现有的器官型口腔黏膜感染模型引入免疫细胞类型较少,无法还原口腔黏膜感染时宿主复杂的免疫反应。此外,未见引入神经、血管、牙槽骨等的报道,而这些结构在微生物-宿主相互作用中起到重要作用。尽管Shang等^[34]将生物膜-TEOM共培养时间延长至7d,但与慢性口腔黏膜感染性疾病数月甚至数年的病程相比,现有技术所达到的共培养时间仍不足够。不断完善器官型口腔黏膜感染模型,以构建更接近人体口腔组织与菌群的微环境是发展趋势;与再生医学、药物学和材料学等领域相结合,以研究多细胞、多系统的,具有自主调节能力和增殖分化潜能的体外口腔黏膜组织,并研究其抵御病原菌的防御与感染机制、临床防治策略等,将具有广阔的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Gao L, Xu T, Huang G, et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(5):488-500. DOI: 10.1007/s13238-018-0548-1.
- [2] Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease [J]. *Oral Dis*, 2017, 23(3):276-286. DOI: 10.1111/odi.12509.
- [3] 孟凡皓,邵晓琳,宋宇,等.组织工程口腔黏膜发展近况[J].中国医学科学院学报, 2017, 39(6): 851-856. DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2017.06.020.
- [4] Belibasakis GN, Meier A, Guggenheim B, et al. The rankl-opg system is differentially regulated by supragingival and subgingival biofilm supernatants [J]. *Cytokine*, 2011, 55(1): 98-103. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.03.009.
- [5] Donos N, Park JC, Vajgel A, et al. Description of the periodontal pocket in preclinical models: Limitations and considerations [J]. *Periodontol 2000*, 2018, 76(1): 16-34. DOI: 10.1111/prd.12155.
- [6] Fawzy El-Sayed KM, Dorfer CE. Animal models for periodontal tissue engineering: A knowledge-generating process [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2017, 23(12): 900-925. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0130.
- [7] Janus MM, Keijser BJ, Bikker FJ, et al. In vitro phenotypic differentiation towards commensal and pathogenic oral biofilms [J]. *Biofouling*, 2015, 31(6): 503-510. DOI: 10.1080/08927014.2015.1067887.
- [8] Hajishengallis G, Lamont RJ, Graves DT. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease [J]. *Virulence*, 2015, 6(3): 229-235. DOI: 10.4161/21505594.2014.990806.
- [9] Alfonso-Rodríguez CA, González-Andrades E, Jaimes-Parra BD, et al. Ex vivo and in vivo modulatory effects of umbilical cord wharton's jelly stem cells on human oral mucosa stroma substitutes [J]. *Histol Histopathol*, 2015, 30(11): 1321-1332. DOI: 10.14670/hh-11-628.
- [10] Dave JR, Tomar GB. Dental tissue-derived mesenchymal stem cells and their applications in tissue engineering [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2018, 46(5): 429-468. DOI: 10.1615/CritRevBiomedEng.2018.027342.
- [11] Buskermolen JK, Reijnders CM, Spiekstra SW, et al. Development of a full-thickness human gingiva equivalent constructed from immortalized keratinocytes and fibroblasts [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016, 22(8): 781-791. DOI: 10.1089/ten.tec.2016.0066.
- [12] Basso FG, Hebling J, Marcelo CL, et al. Development of an oral mucosa equivalent using a porcine dermal matrix [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2017, 55(3): 308-311. DOI: 10.1016/j.bjoms.2016.09.019.
- [13] Kuo S, Kim HM, Wang Z, et al. Comparison of two decellularized dermal equivalents [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(4): 983-990. DOI: 10.1002/term.2530.
- [14] Conway JRW, Vennin C, Cazet AS, et al. Three-dimensional organotypic matrices from alternative collagen sources as pre-clinical models for cell biology [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16887. DOI: 10.1038/s41598-017-17177-5.
- [15] Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58(4): 487-499. DOI: 10.1016/j.addr.2006.03.001.
- [16] Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering [J]. *Eur Cell Mater*, 2003, 5: 1-16; discussion 16. DOI: 10.0000/PMID14562275.
- [17] Kinikoglu B, Rodriguez-Cabello JC, Damour O, et al. A smart bilayer scaffold of elastin-like recombinamer and collagen for soft tissue engineering [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2011, 22(6): 1541-1554. DOI: 10.1007/s10856-011-4315-6.
- [18] Almela T, Brook IM, Moharamzadeh K. Development of three-dimensional tissue engineered bone - oral mucosal composite models [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2016, 27(4): 65. DOI: 10.1007/s10856-016-5676-7.
- [19] Chai WL, Moharamzadeh K, Brook IM, et al. Development of a novel model for the investigation of implant-soft tissue interface [J]. *J Periodontol*, 2010, 81(8): 1187-1195. DOI: 10.1902/jop.2010.090648.
- [20] Liu X, Zhang Z, Pan S, et al. Interaction between the wnt/ β -catenin signaling pathway and the emmprin/mmp-2, 9 route in periodontitis [J]. *J Periodontol Res*, 2018, 53(5): 842-852. DOI: 10.1111/jre.12574.

- [21] Xiao L, Okamura H, Kumazawa Y. Three - dimensional inflammatory human tissue equivalents of gingiva [J]. *J Vis Exp*, 2018(134):e57157. DOI:10.3791/57157.
- [22] Oscarsson J, Claesson R, Lindholm M, et al. Tools of aggregatibacter actinomycetemcomitans to evade the host response [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(7):E1079. DOI:10.3390/jcm8071079.
- [23] Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, et al. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin - 3 (hbd - 3) and cathelicidin (ll - 37) in a three - dimensional co - culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts [J]. *PloS one*, 2014, 9(9):e106766. DOI:10.1371/journal.pone.0106766.
- [24] de Carvalho Dias K, de Sousa DL, Barbugli PA, et al. Development and characterization of a 3d oral mucosa model as a tool for host - pathogen interactions [J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 152:52-60. DOI:10.1016/j.mimet.2018.07.004.
- [25] Gursoy UK, Pöllänen M, Könönen E, et al. Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of *Fusobacterium nucleatum* in an oral mucosa culture model [J]. *J Periodontol*, 2010, 81(7):1084-1091. DOI:10.1902/jop.2010.090664.
- [26] Guggenheim B, Giertsen E, Schupbach P, et al. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque [J]. *J Dent Res*, 2001, 80(1):363-370. DOI:10.1177/00220345010800011201.
- [27] Buskermolen JK, Janus MM, Roffel S, et al. Saliva - derived commensal and pathogenic biofilms in a human gingiva model [J]. *J Dent Res*, 2018, 97(2):201-208. DOI:10.1177/0022034517729998.
- [28] Bao K, Papadimitropoulos A, Akgul B, et al. Establishment of an oral infection model resembling the periodontal pocket in a perfusion bioreactor system [J]. *Virulence*, 2015, 6(3):265-273. DOI:10.4161/21505594.2014.978721.
- [29] Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, et al. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis [J]. *J Dent Res*, 2011, 90(9):1140-1144. DOI:10.1177/0022034511413928.
- [30] Bao K, Belibasakis GN, Selevsek N, et al. Proteomic profiling of host-biofilm interactions in an oral infection model resembling the periodontal pocket [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15999. DOI:10.1038/srep15999.
- [31] Gursoy UK, Pöllänen M, Könönen E, et al. A novel organotypic dento - epithelial culture model; effect of *Fusobacterium nucleatum* biofilm on B-defensin-2, -3, and LL-37 expression [J]. *J Periodontol*, 2012, 83(2):242-247. DOI:10.1902/jop.2011.110177.
- [32] Pöllänen MT, Gursoy UK, Könönen E, et al. *Fusobacterium nucleatum* biofilm induces epithelial migration in an organotypic model of dento - gingival junction [J]. *J Periodontol*, 2012, 83(10):1329-1335. DOI:10.1902/jop.2012.110535.
- [33] Ingendoh - Tsakmakidis A, Mikolai C, Winkel A, et al. Commensal and pathogenic biofilms differently modulate peri - implant oral mucosa in an organotypic model [J]. *Cell Microbiol*, 2019, 21(10):e13078. DOI:10.1111/cmi.13078.
- [34] Shang L, Deng D, Buskermolen JK, et al. Multi - species oral biofilm promotes reconstructed human gingiva epithelial barrier function [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):16061. DOI:10.1038/s41598-018-34390-y.
- [35] Morin MP, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts [J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 75:89-99. DOI:10.1016/j.archoralbio.2016.10.035.
- [36] Meier F, Freyer N, Brzeszczynska J, et al. Hepatic differentiation of human ipscs in different 3d models: A comparative study [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6):1759-1771. DOI:10.3892/ijmm.2017.3190.

(收稿日期:2019-10-18)

(本文编辑:王嫚)