DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20210301

·述　评·

小型猪模式动物在口腔颌面生物医学研究中的应用

周建[1,2,3]，杨子[1]，王松灵[1,3,4,5]*

（1. 首都医科大学口腔健康北京实验室，北京 100069；
2. 首都医科大学附属北京口腔医院特诊特需科，北京 100050；
3. 首都医科大学附属北京天坛医院口腔和全身健康融合与转化研究实验室，北京 100070；
4. 首都医科大学基础医学院生物化学和分子生物学系，北京 100069；
5. 中国医学科学院，牙发育与再生创新单元，北京 100069）

【摘要】小型猪牙颅颌系统解剖形态、生理功能及病理改变等与人类相近，其作为口腔颌面生物医学研究的模式动物具有明显优势。本文依托笔者课题组利用小型猪模式动物，在牙齿发育、唾液腺损伤防护、牙及其周围组织再生修复等领域进行的广泛探索研究，结合国内外利用小型猪进行的口腔颌面生物医学研究现状，阐述小型猪模式动物的特点及在口腔颌面生物医学研究中的应用前景。

【关键词】小型猪；模式动物；发育；再生

中图分类号：R78，R-332　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2021）03-0001-05

The miniature pig: as an experimental model for dental and orofacial research

Zhou Jian[1,2,3], Yang Zi[1], Wang Songlin[1,3,4,5]*

(1. Beijing Laboratory of Oral Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China;
2. Department of VIP Dental Service, Capital Medical University School of Stomatology, Beijing 100050, China;
3. Laboratory for Oral and General Health Integration and Translation, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100070, China;
4. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Capital Medical University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100069, China;
5. Research Units of Tooth Development and Regeneration, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

【**Abstract**】Because its anatomical morphology, physiological structure and pathological mechanism of the oral and maxillofacial systems are more similar to human, miniature pig has significant advantages as a model animal for oral and maxillofacial biomedical research. Based on the extensive research by our team in the areas of tooth development, salivary gland injury protection, tooth and supporting tissue regeneration and restoration, as well as the progress of oral and maxillofacial biomedical research using miniature pigs by other groups, we review the applications of miniature pig model in fundamental and translational research.

基金项目：中国医学科学院医学与健康科技创新工程创新单元（2019-I2M-5-031）；北京市医院管理局使命人才计划（SML20151401）；北京学者计划（PXM2020_014226_000005；PXM2019_014226_000039；PXM2019_014226_000011；PXM2018_014226_000021；PXM2017_014226_000023；PXM2018_193312_000006_0028S643_FCG；PXM2016_014226_000034）；国家自然科学基金重大研究计划（91649124）；国家自然科学基金面上项目（81570939）；国家自然科学基金应急管理项目（81741106）

通讯作者：王松灵（1962-），男，湖南湘乡人，中国科学院院士，主要从事口腔颌面部组织及功能再生、牙齿替换发育和硝酸盐生理功能研究。E-mail：slwang@ccmu.edu.cn

【Keywords】Miniature pig; Experimental animal model; Development; Regeneration

模式动物是探索组织发育、再生和功能重建等口腔颌面生物医学研究的重要模型。目前，口腔颌面生物医学研究应用较多的模式动物包括啮齿动物（小鼠、大鼠等）、犬和小型猪等。与其他模式动物相比，小型猪的牙列形态、数目、替换模式和口腔颌面部解剖结构、生理功能及病理改变等与人类更为相似[1]，已作为模式动物广泛应用于口腔颌面生物医学研究中。

1 小型猪是牙列发育及乳恒牙替换研究的独特模式动物

人类具有乳牙和恒牙两副牙列，牙齿发育时相性明显且独特。目前牙齿发育研究大多基于小鼠等啮齿类动物。然而，啮齿类动物为单牙列动物，无法满足研究人类乳恒牙替换发育的特殊要求。爬行动物为多牙列动物，其牙齿可持续替换，但发育时相、形态结构及功能与人类具有较大差别[2]。小型猪与人类一样，同样具有乳牙和恒牙两副牙列，其乳牙共32颗，出生时第三乳切牙及乳尖牙已经萌出，出生后6–8个月全部乳牙萌出；其恒牙共44颗，包括切牙（3颗），尖牙（1颗），前磨牙（3/4颗）及磨牙（3颗），恒牙均比人对应恒牙稍大[1]。自20世纪60年代开始，小型猪因其牙列形态以及替换模式与人类具有更好的相似性，已成为研究乳恒牙发育的良好模式动物[3]。笔者课题组经过20余年探索，建立了小型猪牙齿发育研究平台，首先明确了小型猪乳恒牙胚发育时相，继而进一步探索了恒牙胚发育周期与其替换时间相关性等牙齿发育的关键事件[4]，证明了小型猪是较为理想的研究牙齿发育和替换的模式动物，并为后续牙齿发育研究提供了理论基础。

在小型猪牙齿发育时相研究的基础上，本课题组进一步探索了乳恒牙替换的分子机制。首次发现乳牙发育速率快于颌骨，可产生约10 Pa的组织内生物应力，该应力可上调恒牙牙囊组织中Integrinβ–1–Erk1–Runx2信号通路，抑制替换恒牙牙板的发育，使替换恒牙牙板较长时间处于相对静止状态；当乳牙萌出后，组织内应力释放，激活了Integrinβ–1–Erk1–Runx2–Wnt/β–catenin通路，从而导致恒牙发育的启动，证实了生物力学在乳恒牙替换过程中发挥重要作用，提出“组织内应力调控牙齿替换”学说[5]。乳恒牙替换模式及调控机制的发现为通过调控生物力及Wnt等关键分子信号通路实现器官发育性再生奠定了科学基础。

2 小型猪为研究口腔颌面组织及器官再生与功能重建提供模式动物平台

近年来，口腔颌面组织修复与功能重建的临床需求不断增加，已成为口腔颌面生物医学研究的热点。目前，利用小型猪模式动物，研究者们在牙、牙周组织、颌骨、颞下颌关节及唾液腺等组织再生与功能重建方面取得了一系列基础与临床转化研究成果（见图1）。

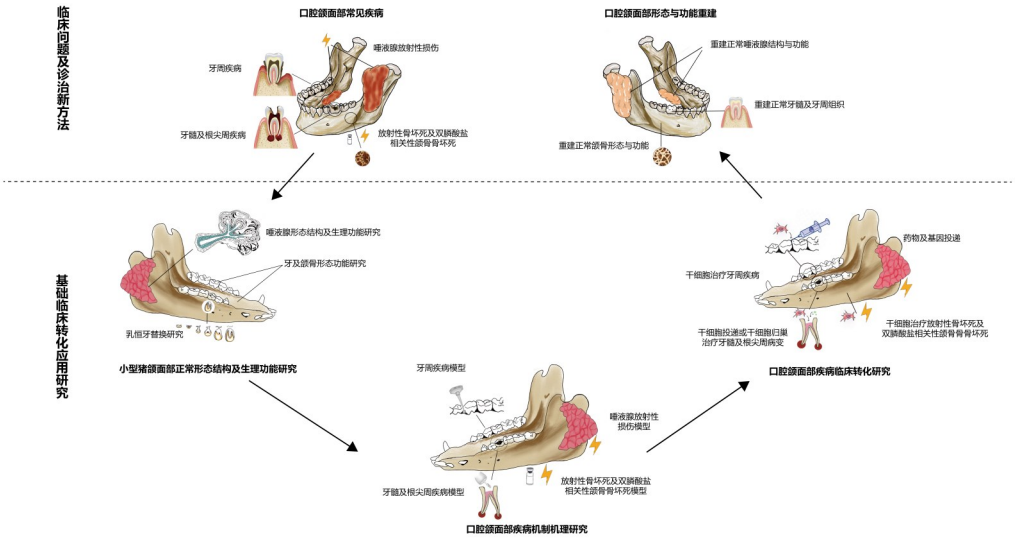


图1 小型猪在口腔颌面生物医学研究中的应用概图

2.1 生物牙根

基于牙发育原理的生物牙根和全牙再生，是目前口腔颌面生物医学研究的重点之一。2005年笔者课题组与美国南加州大学课题组合作，首次提出“生物牙根”理念，将体外分离培养的小型猪自体根尖牙乳头干细胞（Stem Cells from the Apical Papilla，SCAPs）和牙周膜干细胞（Periodontal Stem Cells，PDLSCs）与生物支架复合并回植于小型猪颌骨内，实现了生物牙根再生[6]。在此基础上，进而利用异体牙髓干细胞（Dental Pulp Stem Cells，DPSCs）在小型猪颌骨内实现生物牙根再生，并成功实现冠修复。组织学检查发现，再生的牙根在加载咬合力后，其周围可形成形态及排列良好的牙周膜纤维，发挥传导殆力作用[7]。进一步研究发现，生物牙根与钛种植体一样，均能实现冠修复，但在元素组成、抗压强度、弹性模量和扭转力等方面，生物牙根和天然牙根更为相似[8]。小型猪为探寻合适的生物牙根材料并促进其再生成功率提供了大型模式动物研究平台，为实现生物牙根的临床转化提供实验室基础。

2.2 全牙再生

已有研究报道利用组织工程技术将牙胚上皮与牙胚间充质体外重组后，可在小鼠颌骨内再生全功能牙，牙可萌出并具有咬合功能[9]。然而，人类牙齿发生发育的分子机制更为复杂，人全牙再生的细胞来源、尺寸控制、生长时间和免疫排斥等关键科学问题利用啮齿类模式动物难以探讨并解决。因此，为实现人全牙再生的临床转化，全牙再生研究的模式动物从啮齿类动物转变为大型动物至关重要。

笔者课题组利用小型猪，首先建立了小型猪牙胚发育不同阶段的cDNA文库、基因表达谱、非编码RNA表达谱、DNA甲基化谱及蛋白质调控网络，在分子水平为研究小型猪牙齿发育、替换机制及再生奠定了基础[10-13]；利用解离重组技术实现了小型猪全牙再生，为全牙再生提供了可靠的技术方法[14]；通过体外器官培养追踪了大型动物牙胚单细胞交互和早期牙发育的形态发生过程。在此基础上，进一步优化实验方案，解决了小型猪大尺寸牙齿再生需要体内长期发育和生长的难题，并首次在小型猪颌骨原位实现了基于细胞重组构建牙胚的全牙再生[15]。此外，课题组还发现Wnt/β-catenin信号通路可调控小型猪乳磨牙的发生[16]、下颌骨外泌体ssc-mir-133b可调控牙齿发育[17]等在全牙再生过程中发挥关键作用的信号通路，以上发现为进一步进行大型动物及人类牙发育调控机制和全牙再生研究及临床转化奠定了基础。

2.3 牙周组织再生

小型猪牙周组织解剖结构与人类相似，龈沟深度2～3 mm。6月龄以上小型猪广泛存在自发性龈炎，16月龄以上小型猪可观察到牙周炎的发生，表现为探诊出血、炎症改变和牙周组织丧失，组织病理学表现与人类牙周炎基本相同[18]。

1995年，Mertens团队首次报道将小型猪牙周组织的细胞体外培养后原位植入牙周缺损，发现植入的细胞具有再生牙周组织的能力[19]。笔者课题组利用牙周部分牙槽骨去除联合丝线结扎方法，可在相对短的时间内建立典型的牙周炎模型[20]，牙周组织出现明显的骨丧失及炎症反应。进而利用该模型，将PDLSCs复合HA/TCP[21]、同种异体PDLSCs细胞膜片[22]、人DPSCs[23]等移植到牙周缺损，12周后均可不同程度实现牙周组织再生。以上研究为利用异体干细胞再生牙周组织提供了免疫学研究依据，为异体牙源性干细胞的临床转化应用奠定了理论基础，极大地扩展了牙周组织再生干细胞的来源。东京医科齿科大学Komaki教授在《Tissue Engineering》撰写的综述指出：“牙源性干细胞免疫调节功能的发现，提示可以采用同种异体牙周膜干细胞移植，尤其是来自健康年轻捐助者的牙周膜干细胞治疗老年牙周病患者，解决牙周组织再生干细胞来源不足的难题”[20]。利用小型猪平台建立牙周炎模型及探索新的治疗方法，将为临床中干细胞功能转化提供理论及实验依据。

2.4 牙髓牙本质再生

牙髓牙本质再生治疗基础与临床研究主要包括外源性干细胞移植策略和包括牙髓血运重建在内的内源性干细胞归巢策略。小型猪恒牙形态与人类相似，其中下颌第四前磨牙与人类磨牙最为相似[1]。美国George Huang课题组和第四军医大学金岩课题组利用干细胞移植策略，在小型猪根管系统内移植自体DPSCs后，均观察到根管内牙髓牙本质样组织的再生[24, 25]。

利用内源性干细胞归巢策略，笔者课题组与美国哥伦比亚大学合作，于2019年报道利用Wnt/β-catenin信号通路的重要配体Wnt3a靶向诱导内源性干细胞归巢，成功在小型猪下颌切牙根管内原位再生功能化牙髓牙本质复合体。与以往大多数研究不

同，本研究诱导干细胞归巢到根管后，除分化为成牙本质细胞并形成牙本质以外，还分化再生出含血管、神经纤维等间质组织的血管神经化牙髓，证明内源性干细胞归巢组织再生策略可再生具有实质组织和间质组织、结构和功能完整的牙髓牙本质复合体，并发现Wnt/β-catenin信号通路在促进内源性干细胞归巢、维持干细胞活性、靶向诱导分化为成牙本质细胞等过程中发挥核心调控作用[26]。同期杂志上，美国Black Family干细胞研究所（Black Family Stem Cell Institute）的Sarah E. Millar教授以“组织再生-牙髓（Tissue Regeneration-A Pulpy Story）”为题撰写专题述评[26]，指出“该研究的重要发现为进一步利用生物活性因子激活内源性干细胞的组织再生能力进行牙髓牙本质复合体再生研究，并最终替代现有的根管治疗方法铺平道路”。

2.5 唾液腺功能重建

啮齿类动物唾液腺解剖形态和生理功能等与人类相差较远，唾液腺观察及操作受限，且不易进行唾液的反复收集。而小型猪因其唾液腺在解剖形态、主导管长度以及唾液流率和成分上更接近于人类，已逐渐被广泛应用于唾液腺研究[27]。

因头颈部肿瘤的放射治疗导致的唾液腺放射损伤，机制不清，治疗棘手。美国法布罗大学Sirois课题组曾报道，给予小型猪70 Gy的放射剂量后，放射侧下颌下腺和腮腺萎缩至对照侧腺体的1/3～1/2，并出现广泛腺泡萎缩和间质纤维化，剩余腺泡细胞核增大，导管增殖扩张，刺激性唾液流率减少81%[28]。笔者课题组多年致力于唾液腺放射损伤防治研究，发现20 Gy单一剂量放射小型猪腮腺即可建立典型腮腺放射损伤模型[29]，为唾液腺放射损伤研究提供了有效的平台。在此基础上，明确早期微血管损伤为唾液腺放射损伤的重要致病机制，并建立了小型猪腮腺导管基因转导技术。运用该技术，经腮腺导管投递外源性基因AQP5[31]、AQP1[32]、Shh[33]，药物雷帕霉素[34]，均可对小型猪腮腺放射损伤取得良好的治疗效果，为唾液腺放射损伤防治提供了新方法，为针对唾液腺功能损伤基因转导疗法的临床转化奠定临床前研究。

3 小型猪为颌骨疾病发病机制及防治方法研究提供良好的模型

目前放射性骨坏死（Osteoradionecrosis of the Jaw，ORN）及双膦酸盐相关性颌骨骨坏死（Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw，BRONJ）发病机制不明确，尚无理想的预防及治疗方法，并且缺乏理想的研究模式动物。小型猪下颌骨主体、升支和颞下颌关节与人类相似[1]。笔者课题组通过应用三维适形放疗技术建立小型猪ORN模型，发现放疗4小时后颌骨内皮细胞开始凋亡这一新现象，并发现放射后15天内颌骨有明显骨修复，明确了15天后微血管闭锁是颌骨放射损伤的重要机制[35, 36]。应用自体骨髓间充质干细胞复合羟基磷灰石/磷酸三钙移植治疗ORN，发现骨髓间充质干细胞能恢复颌骨损伤区域中内皮细胞及微血管密度，揭示干细胞可恢复颌骨内血流治疗放射性颌骨坏死，为ORN的治疗提供新思路[37]；采用与临床相似的双膦酸盐静脉滴注加拔牙的方法建立小型BRONJ模型，发现双膦酸盐除影响破骨细胞外，还影响具有强大成骨分化潜能的骨髓干细胞，从而抑制骨破坏后的骨改建，造成的免疫失衡加重了局部炎症反应，增加了治疗难度，而通过小型猪异体骨髓间充质干细胞静脉注射可使骨改建重新活跃，调节免疫状态[38]，有望成为治疗BRONJ的新策略。目前小型猪已成为探讨ORN及BRONJ等颌骨疾病发病机制和诊治方法的重要模式动物。

4 总结与展望

小型猪因具有与人类相似的牙齿发育与替换模式和口腔颌面解剖结构和生理病理功能，是研究牙齿发育和替换的理想模式动物；正在成为唾液腺损伤修复、牙周炎治疗、颌骨骨坏死及牙髓牙本质再生等研究的主要模式动物；是口腔颌面生物医学研究临床转化应用不可或缺的模式动物。

参 考 文 献

[1] 刘怡, 房殿吉, 王松灵. 小型猪在口腔医学研究中的应用[J]. 中华口腔医学杂志, 2007, 42(7) : 444-446.

[2] STEMBIREK J, BUCHTOVA M, KRAL T, et al. Early morphogenesis of heterodont dentition in minipigs[J]. Eur J Oral Sci, 2010, 118(6): 547-58.

[3] BIVIN W S, MCCLURE R C. Deciduous tooth chronology in the mandible of the domestic pig[J]. J Dent Res, 1976, 55(4): 591-597.

[4] WANG F, XIAO J, CONG W, et al. Morphology and chronology of diphyodont dentition in miniature pigs, Sus Scrofa[J]. Oral Dis, 2014, 20(4): 367-379.

[5] WU X S, HU J R, LI G Q, et al. Biomechanical stress regulates mammalian tooth replacement via the integrin beta 1-RUNX2-Wnt pathway[J]. Embo J, 2020, 39(3): e102374.

[6] SONOYAMA W, LIU Y, FANG D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine [J]. Plos One, 2006, 1(1): e79.

[7] WEI F L, SONG T L, DING G, et al. Functional tooth restoration by allogeneic mesenchymal stem cell-based bio-root regeneration in swine[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(12): 1752-1762.

[8] GAO Z H, HU L, LIU G L, et al. Bio-root and implant-based restoration as a tooth replacement alternative[J]. J Dent Res, 2016, 95(6): 642-649.

[9] IKEDA E, MORITA R, NAKAO K, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy[J]. PNAS, 2009, 106(32): 13475-13480.

[10] LI A, LI Y, SONG T L, et al. Identification of differential microRNA expression during tooth morphogenesis in the heterodont dentition of miniature pigs, SusScrofa[J]. BMC Dev Biol, 2015, 15.

[11] LI Y, LI G Q, WANG F, et al. Integrated analysis of LncRNA-mRNA coexpression in the extracellular matrix of developing deciduous teeth in miniature pigs[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 6159490.

[12] SU Y Y, FAN Z P, WU X S, et al. Genome-wide DNA methylation profile of developing deciduous tooth germ in miniature pigs[J]. Bmc Genomics, 2016, 17: 134.

[13] WANG F, LI Y, WU X S, et al. Transcriptome analysis of coding and long non-coding RNAs highlights the regulatory network of cascade initiation of permanent molars in miniature pigs[J]. BMC Genomics, 2017, 18 (1): 148.

[14] WANG F, WU Z F, FAN Z P, et al. The cell re-association-based whole-tooth regeneration strategies in large animal, Sus scrofa[J]. Cell Pro, 2018, 51(4): e12479.

[15] WU Z F, WANG F, FAN Z P, et al. Whole-tooth regeneration by allogeneic cell reassociation in pig jawbone[J]. Tissue Eng Part A, 2019, 25(17-18): 1202-1212.

[16] WU X S, HU L, LI Y, et al. SCAPs regulate differentiation of DFSCs during tooth root development in swine[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(4): 291-299.

[17] LI Y, WANG X X, REN J L, et al. Mandible exosomal ssc-mir-133b regulates tooth development in miniature swine via endogenous apoptosis[J]. Bone Res, 2018, 6(Suppl 1): 961-968.

[18] 李玉晶, 赵宝荣, 葛丽华, 等 . 小型猪自发性牙周炎症的病理观察[J]. 现代口腔医学杂志, 1994, 8(2): 87-88.

[19] LANG H, SCHULER N, ARNHOLD S, et al. Formation of differentiated tissues in-vivo by periodontal cell-populations cultured in-vitro[J]. J Dent Res, 1995, 74(5): 1219-1225.

[20] IWASAKI K, KOMAKI M, YOKOYAMA N, et al. Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(3-4): 693-704.

[21] LIU Y, ZHENG Y, DING G, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine[J]. Stem Cells, 2008, 26(4): 1065-1073.

[22] DING G, LIU Y, WANG W, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine[J]. Stem Cells, 2010, 28(10): 1829-1838.

[23] HU J C, CAO Y, XIE Y L, et al. Periodontal regeneration in swine after cell injection and cell sheet transplantation of human dental pulp stem cells following good manufacturing practice[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7: 130.

[24] ZHU X F, LIU J, YU Z D, et al. A miniature swine model for stem cell-based de novo regeneration of dental pulp and dentin-like tissue[J]. Tissue Eng Part C-Me, 2018, 24 (2): 108-120.

[25] 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.

[26] HE L, ZHOU J, CHEN M, et al. Parenchymal and stromal tissue regeneration of tooth organ by pivotal signals reinstated in decellularized matrix[J]. Nat Mater, 2019, 18 (6): 627-637.

[27] ZHANG X, LI J, LIU X Y, et al. Morphological characteristics of submandibular glands of miniature pig[J]. Chin Med J. 2005, 118(16):1368-1373.

[28] RADFAR L, SIROIS D A. Structural and functional injury in minipig salivary glands following fractionated exposure to 70 Gy of ionizing radiation: an animal model for human radiation-induced salivary gland injury[J]. OOOOE, 2003, 96(3): 267-274.

[29] LI J, SHAN Z C, OU G F, et al. Structural and functional characteristics of irradiation damage to parotid glands in the miniature pig[J]. Int J Radiat Oncol, 2005, 62(5): 1510-1516.

[30] XU J J, YAN X, GAO R T, et al. Effect of irradiation on microvascular endothelial cells of parotid glands in the

（下转第36页）