

低温冷冻保存人离体牙的研究进展

蒋佩茹^{1,2,3}, 窦磊^{1,2,3*}

¹重庆医科大学附属口腔医院, 重庆

²口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆

³重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室, 重庆

收稿日期: 2024年3月19日; 录用日期: 2024年4月13日; 发布日期: 2024年4月18日

摘要

低温冷冻保存因各种原因拔除的人的健康牙齿可以为自体牙移植提供供体牙, 为自体牙移植技术提供更多可能。本文从低温冷冻保存的难点, 冷冻保护剂, 低温冷冻保存的冷冻及复温方法, 低温冷冻保存对牙齿的影响四个方面对人牙齿的体外低温冷冻保存作综述, 对低温冷冻保存人离体牙的现状进行评估。

关键词

自体牙移植, 冷冻保存, 冷冻保护剂

Research Progress on Low-Temperature Cryopreservation of Human Detached Teeth

Peiru Jiang^{1,2,3}, Lei Dou^{1,2,3*}

¹The Affiliated Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

²Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing

³Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education, Chongqing

Received: Mar. 19th, 2024; accepted: Apr. 13th, 2024; published: Apr. 18th, 2024

Abstract

Low temperature cryopreservation of healthy teeth extracted for various reasons can provide donor teeth for autologous tooth transplantation and offer more possibilities for autologous tooth transplantation technology. This article reviews the low-temperature cryopreservation of human teeth *in vitro* from four aspects: the difficulties of low-temperature cryopreservation, cryoprotectants, freezing and rewarming methods of low-temperature cryopreservation, and the impact of

*通讯作者。

文章引用: 蒋佩茹, 窦磊. 低温冷冻保存人离体牙的研究进展[J]. 临床医学进展, 2024, 14(4): 1276-1281.

DOI: 10.12677/acm.2024.1441156

low-temperature cryopreservation on teeth. The current status of low-temperature cryopreservation of human detached teeth is evaluated.

Keywords

Autologous Tooth Transplantation, Cryopreservation, Cryoprotectants

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

自体牙移植是指将同一个体内的牙齿从一个部位移植到另一个缺牙部位来恢复咬合功能的方法[1]。它基于自体的牙齿,是一种天然的生物相容性材料,在临床上是一种极有价值的治疗方法。有研究回顾了自体牙移植术后回访6年及更长时间的病例,发现存活率在75.3%到91%之间[2]。高存活率让此项技术在临床上受到重视。由于自体牙移植需要患者同时存在供体牙和受体部位,故该技术在临床运用过程中存在局限。而临床中每天都有大量的健康的牙齿因为正畸需求或者作为阻生牙被拔除,这些牙齿是自体牙移植技术良好的供体牙来源,但他们往往被直接丢弃。有学者提出可以将拔除的健康牙齿冷冻保存,待有需求时再使用[3],这为自体牙移植技术提供了潜能。本文从低温冷冻保存的难点、冷冻保护剂、低温冷冻保存的冷冻及复温方法,低温冷冻保存对牙齿的影响几个方面对人牙齿的体外低温保存作综述,期望为自体牙移植技术的应用提供更多可能。

2. 低温冷冻保存的难点

低温保存的做法由来已久,自古以来,人们就知道生物材料可以在低温下保存更长时间。17世纪早期,关于冷冻保存的讨论是科学家们感兴趣的话题,随着20世纪低温技术的发展,能够产生长期冷冻保存的极低温,促进了低温冷冻保存技术的发展。现代低温冷冻保存技术是指将细胞或整个组织冷却到零度以下的低温保存过程,通常是 -196°C (液氮的沸点)。在这种低温下,任何生物活动,包括可能导致细胞死亡的生化反应都将停止,在合适的情况下复温即可恢复生物活动。

低温对于生物的伤害主要是由于在恒温和低温状态的转变过程中不受控制导致的[4]。因此细胞和组织冷冻保存的关键在于以可控的方式在低温和恒温状态之间转换。细胞大部分的伤害都是由于冰的形成直接或间接导致的。在冷却过程中,冰首先在细胞外形成,细胞外结冰导致胞外溶质浓度增加,通过细胞膜的渗透作用,细胞内的水会排出,细胞这一举动可以使细胞脱水并增加细胞内溶质浓度,从而降低了细胞内冰点,防止了细胞内冰的形成。但是也会对细胞造成伤害:1) 溶质浓度过度增加导致过大的渗透压伤害细胞[5]。2) 细胞外冰晶的形成直接压迫细胞膜或者细胞外结构,导致组织损伤[6]。如果冷却速率过快,细胞内的水来不及排出,将会形成细胞内冰晶,而细胞内冰晶的通常比细胞外冰晶破坏性更大,因为它可以直接损伤细胞结构,称之为冰损伤[7]。然而如果冷却速率过慢,细胞内的细胞器和细胞质在高浓度溶液中暴露时间过长会遭受损伤[8]。冷却速率需要一个平衡点来减少冰晶形成带来的损伤。复温过程对于冷冻保存也是一个大挑战。在变暖过程中,冰晶可以在初始核周围继续生长。冰的成核和生长都取决于温度,但方式不同。冷却之后的样品会先进入冰生长阶段,当结晶温度不是最佳时,冰的形成会进入成核期。所以复温过程存在再结晶的风险,当升温过程进入最适合冷冻的温度时,它已经完全成

核[9]。

3. 冷冻保护剂

为了提高冷冻保存效率,可以添加冷冻保护剂来减少温度变化对细胞造成的损伤[10]。冷冻保护剂根据作用机制不同主要分为两种:非渗透性和渗透性保护剂。渗透性保护剂以多元醇类为主,例如 DMSO、丙二醇、丙三醇、乙二醇(EG)、甲酰胺和乙酰胺等[11]。它们通过渗透作用进入细胞,增加溶液的黏性,减弱水的结晶过程,从而保护细胞。当细胞被置于含有低温冷冻保护剂的高渗溶液中时,细胞会因为细胞外的高渗透压迅速收缩,而细胞内的水向细胞外扩散的速度比低温冷冻保护剂向细胞内渗透的速度快。细胞收缩后,随着低温保护剂以固定的渗透性渗透到细胞中,细胞开始慢慢恢复其体积[12]。此类保护剂能够避免了细胞内过冷状态,平衡细胞内外的渗透压,使细胞脱水速度变慢和减少因细胞脱水引起的收缩程度[13];非渗透性保护剂主要包括低分子量的单糖(如葡萄糖、果糖、乳糖和麦芽糖)、双糖(如海藻糖、蔗糖)、多糖类(如棉子糖等),还包括如聚乙烯吡咯烷酮(pvp)、聚乙二醇(PEG)、聚乙烯醇(PVA)和羟乙基淀粉(HES)等相对分子质量大于 1000×10^3 的高分子化合物,他们不能渗透进细胞内[14]。非渗透性冷冻保护剂一般与渗透性保护剂联合使用,促使细胞完成脱水,同时还可以中和渗透性保护剂的毒性。恢复温度时,提供一个细胞外的高渗环境,减低水分子渗入细胞的速度,防止细胞膨胀过快死亡。冷冻保护剂可以通过各种方式防止冷冻损伤,但总而言之,一种好的冷冻保护剂需要有以下特性:在低温和高浓度下具有水溶性,具有良好的细胞膜渗透性和低毒性。

DMSO 是目前最常见的干细胞冷冻保护剂,Lovelock 和 Bishop 首次描述了 DMSO 作为冷冻保护剂的使用,它可以增强细胞的渗透性。海藻糖被证明可以改变冰和细胞的相互作用,从而提高复温后细胞的存活率[15]。也有研究表明这些非渗透性大分子冷冻保护剂如海藻糖,蔗糖,葡聚糖等,他们与 DMSO 联合使用时,能够提升冷冻保存的效果[16] [17]。虽然冷冻保护剂的使用提升了冷冻保存的效果,但它的毒性作用仍然是冷冻保存的挑战。有研究发现运用 DMSO 冷冻保存的干细胞与呕吐、心功能障碍、心律失常等毒性反应有关[18] [19]。EG 在肝脏中代谢为乙醇酸,引起代谢性酸中毒[20]。还有一些冷冻保护剂共有的性质导致的毒性,比如他们与氢键的结合强度比水更强,在高浓度下可能会导致蛋白质变性[21]。随着温度和冷冻保护剂浓度的增加,毒性也会增加。然而,已经发现,可以联合使用不同浓度的冷冻保护剂以减少毒性。通过使用不同的冷冻保护剂,可以避免任何一种冷冻保护剂因为过高的浓度引起特定的毒性。此外,某些冷冻保护剂可以直接中和其他冷冻保护剂的毒性,例如,DMSO 可以中和甲酰胺的毒性,从而允许使用更高总浓度的冷冻保护剂,同时降低毒性[22]。

4. 低温冷冻保存的冷冻及复温方法

目前低温冷冻保存的降温方法主要包括快速降温法和慢速降温法。慢速降温法是指样本先以某一恒定的速率降温至某一中间温度,接着降至 -196°C [23]。这种方法比较耗时,需要更昂贵的设备,但是可控的冷却过程可以方便记录和多次重复。快速降温法又被称作玻璃化冷冻,需要高浓度冷冻保护剂超速冻存生物体的方法,需要快速降温和复温才有可能实现成功的玻璃化冷冻。玻璃化是一个独立于冷冻的物理过程,发生在所谓的“玻璃化转变温度”,约为 -80°C 至 -130°C 。在玻璃化过程中,样品凝固时不会形成冰晶,所以近些年受到越来越多的关注。而且有研究发现,小型的生物如人类的精子可以在没有冷冻保护剂的情况下实现玻璃化[24]。但是较大的物品例如人的牙齿无法实现极高的冷却速率,故需要玻璃化的冷冻保护剂代替物品中大部分的水[25]。

对于冷冻生物的复温,也是一个较大的挑战,需要快速升温才能减少冷冻保护剂的毒性。最近,一种新的变暖方法已经得到了很好的测试结。Manuchehrabadi 等人证明磁性纳米颗粒的感应加热可以改善

组织低温保存。在交变磁场下, 纳米加热可以实现玻璃化组织和器官均匀解冻的高温上升率[26]。

5. 低温冷冻保存对牙齿的影响

牙周膜的活力决定了自体牙移植的成功率。已经有研究用冷冻保存后的牙齿自体牙移植并且获得了较好的结果[27] [28]。从冷冻保存的牙周膜中可以分离出牙周膜干细胞[29] [30]。牙周膜组织冷冻保存的高成功率可能是因为牙周膜组织的结构是一层柔软致密的结缔组织, 并且厚度只有大约 0.2 mm。这便于冷冻保护剂在组织中的分布以及热量容易传导至内部。

牙齿硬组织决定了牙齿的使用年限。有学者研究了离体牙冷冻保存后牙本质的生物力学特性。研究发现, 冷冻保存后, 牙齿抗压强度与未冻存组无显著差异。但是随着冷冻时间的增加, 牙本质的弹性模量呈下降趋势, 牙本质小管变窄, 部分闭塞, 更容易附着杂质[31]。但是冷冻保存对于牙釉质牙本质, 牙骨质牙本质之间的连接的影响目前没有详细的研究, 需要进一步探索。

牙髓活力对于自体牙移植手术的成功不是必须的, 因为可以通过根管治疗拔除坏死的牙齿, 并且用根管材料进行充填。牙髓具有特殊的解剖结构, 是被牙体硬组织包裹的结缔组织, 血运来源于狭窄的根尖孔。故冷冻保护剂难以渗透, 导致牙髓活力保存难度很大。有研究从冷冻保存之后的牙髓组织中成功分离出牙髓细胞[32], 但是该研究使用的是去除了牙冠的牙根, 冷冻保护剂更容易渗透至牙髓组织中。另外有报道道了一例根尖孔未完全闭合的牙齿的移植手术, 移植后牙齿并未坏死[33]。牙髓组织的保存效果可能和根尖孔的大小有关[34]。目前自体牙移植的主流观点是术后 2~3 周进行根管治疗拔除牙髓, 避免坏死的牙髓影响手术效果[35]。

6. 结论

低温冷冻保存这一学科现在已经被确立为一种储存活细胞和组织的实用手段。关于低温冷冻保存技术在离体牙的保存方面已经有一些研究, 但是没有具体评价低温冷冻保存对人牙齿的影响。我们期待更完善、更优质的冷冻保存方法, 促进冷冻保存技术在口腔领域的应用。

参考文献

- [1] Abdou, A., Matoug-Elwerfelli, M., Nagendrababu, V., *et al.* (2023) Tooth Auto-Transplantation: A Bibliometric Analysis of the Top 100 Most-Cited Articles. *Dental Traumatology*, **39**, 64-81. <https://doi.org/10.1111/edt.12779>
- [2] Machado, L.A., Do Nascimento, R.R., Ferreira, D.M., *et al.* (2016) Long-Term Prognosis of Tooth Autotransplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **45**, 610-617. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.11.010>
- [3] Politis, C., Vrielinck, L., Schepers, S., *et al.* (1995) Cryopreservation of Teeth. Organizational Aspects of a Tissue Bank for Tooth Tissues. *Acta stomatologica Belgica*, **92**, 149-154.
- [4] Bojic, S., Murray, A., Bentley, B.L., *et al.* (2021) Winter Is Coming: The Future of Cryopreservation. *BMC Biology*, **19**, Article No. 56. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00976-8>
- [5] Lovelock, J.E. (1953) The Mechanism of the Protective Action of Glycerol against Haemolysis by Freezing and Thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*, **11**, 28-36. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90005-5)
- [6] Mazur, P. (1963) Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *Journal of General Physiology*, **47**, 347-369. <https://doi.org/10.1085/jgp.47.2.347>
- [7] Bravo, D., Rigley, T.H., Gibran, N., *et al.* (2000) Effect of Storage and Preservation Methods on Viability in Transplantable Human Skin Allografts. *Burns*, **26**, 367-378. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00169-2)
- [8] Oh, Y.H., Che, Z.M., Hong, J.C., *et al.* (2005) Cryopreservation of Human Teeth for Future Organization of a Tooth Bank—A Preliminary Study. *Cryobiology*, **51**, 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.08.008>
- [9] Fahy, G.M. and Wowk, B. (2021) Principles of Ice-Free Cryopreservation by Vitrification. In: Wolkers, W.F. and Oldenhof, H., Eds., *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Humana, New York, 27-97. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_2
- [10] Lovelock, J.E. and Bishop, M.W. (1959) Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide.

- Nature*, **183**, 1394-1395. <https://doi.org/10.1038/1831394a0>
- [11] Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., *et al.* (2017) Cryobanking of Aquatic Species. *Aquaculture*, **472**, 156-177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>
- [12] Schwartz, O., Andreasen, F.M. and Andreasen, J.O. (2002) Effects of Temperature, Storage Time and Media on Periodontal and Pulpal Healing after Replantation of Incisors in Monkeys. *Dental Traumatology*, **18**, 190-195. <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2002.00086.x>
- [13] Shu, Z., Hughes, S.M., Fang, C., *et al.* (2016) A Study of the Osmotic Characteristics, Water Permeability, and Cryoprotectant Permeability of Human Vaginal Immune Cells. *Cryobiology*, **72**, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.003>
- [14] Pflugrath, J.W. (2015) Practical Macromolecular Cryocrystallography. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, **71**, 622-642. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15008304>
- [15] Hubel, A., Darr, T.B., Chang, A., *et al.* (2007) Cell Partitioning during the Directional Solidification of Trehalose Solutions. *Cryobiology*, **55**, 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.07.002>
- [16] Arakawa, T. and Timasheff, S.N. (1983) Preferential Interactions of Proteins with Solvent Components in Aqueous Amino Acid Solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **224**, 169-177. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90201-1)
- [17] Mantri, S., Kanungo, S. and Mohapatra, P.C. (2015) Cryoprotective Effect of Disaccharides on Cord Blood Stem Cells with Minimal Use of DMSO. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, **31**, 206-212. <https://doi.org/10.1007/s12288-014-0352-x>
- [18] Ock, S.A. and Rho, G.J. (2011) Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Cryopreservation of Porcine Mesenchymal Stem Cells (pMSCs). *Cell Transplantation*, **20**, 1231-1239. <https://doi.org/10.3727/096368910X552835>
- [19] Bakken, A.M. (2006) Cryopreserving Human Peripheral Blood Progenitor Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, **1**, 47-54. <https://doi.org/10.2174/157488806775269179>
- [20] Hess, R., Bartels, M.J. and Pottenger, L.H. (2004) Ethylene Glycol: An Estimate of Tolerable Levels of Exposure Based on a Review of Animal and Human Data. *Archives of Toxicology*, **78**, 671-680. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0594-8>
- [21] Arakawa, T., Kita, Y. and Timasheff, S.N. (2007) Protein Precipitation and Denaturation by Dimethyl Sulfoxide. *Biophysical Chemistry*, **131**, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.09.004>
- [22] Fahy, G.M. (2010) Cryoprotectant Toxicity Neutralization. *Cryobiology*, **60**, S45-S53. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.005>
- [23] 何波, 段永壮, 王增涛. 生物体的深低温保存技术研究进展[J]. 山东医药, 2007, 47(15): 78-79.
- [24] Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., *et al.* (2002) Vitrification of Human Spermatozoa without Cryoprotectants. *Cryo-Letters*, **23**, 93-102.
- [25] Sformo, T., Walters, K., Jeannot, K., *et al.* (2010) Deep Supercooling, Vitrification and Limited Survival to -100°C in the Alaskan Beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) Larvae. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 502-509. <https://doi.org/10.1242/jeb.035758>
- [26] Manuchehrabadi, N., Gao, Z., Zhang, J., *et al.* (2017) Improved Tissue Cryopreservation Using Inductive Heating of Magnetic Nanoparticles. *Science Translational Medicine*, **9**, eaah4586. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4586>
- [27] Rhim, E.M., Ahn, S.J., Kim, J.Y., *et al.* (2013) Cryopreservation Induces Macrophage Colony Stimulating Factor from Human Periodontal Ligament Cells *in vitro*. *Cryobiology*, **67**, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.06.006>
- [28] Kaku, M., Shimasue, H., Ohtani, J., *et al.* (2015) A Case of Tooth Autotransplantation after Long-Term Cryopreservation Using a Programmed Freezer with a Magnetic Field. *The Angle Orthodontist*, **85**, 518-524. <https://doi.org/10.2319/030314-148.1>
- [29] Seo, B.M., Miura, M., Sonoyama, W., *et al.* (2005) Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research*, **84**, 907-912. <https://doi.org/10.1177/154405910508401007>
- [30] Temmerman, L., de Pauw, G.A., Beele, H., *et al.* (2006) Tooth Transplantation and Cryopreservation: State of the Art. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **129**, 691-695. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2004.12.021>
- [31] Xu, J., Chen, Y., Zhou, M., *et al.* (2023) Effects of Cryopreservation on the Biomechanical Properties of Dentin in Cryopreserved Teeth: An *In-Vitro* Study. *Cryobiology*, **111**, 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2023.04.002>
- [32] Wang, J., Jiang, P., Zheng, C., *et al.* (2023) Cryopreservation of Human Dental Roots Using Vitrification for Autologous Human Tooth Tissue Banking. *Cryobiology*, **110**, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2022.11.241>
- [33] Laureys, W., Beele, H., Cornelissen, R., *et al.* (2001) Revascularization after Cryopreservation and Autotransplantation

- of Immature and Mature Apicoectomized Teeth. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, **119**, 346-352. <https://doi.org/10.1067/mod.2001.113259>
- [34] Wang, W., Yan, M., Aarabi, G., *et al.* (2022) Cultivation of Cryopreserved Human Dental Pulp Stem Cells—A New Approach to Maintaining Dental Pulp Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 11485. <https://doi.org/10.3390/ijms231911485>
- [35] Yoshizawa, M., Koyama, T., Izumi, N., *et al.* (2014) Autotransplantation or Replantation of Cryopreserved Teeth: A Case Series and Literature Review. *Dental Traumatology*, **30**, 71-75. <https://doi.org/10.1111/edt.12039>