

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2023.10.004

· 基础研究 ·

# 干细胞因子促进共培养 DPSCs 与 HUVECs 的成血管能力

姬红娇<sup>1</sup>, 徐丽莉<sup>2</sup>, 丁文通<sup>1</sup>, 李培慧<sup>1</sup>, 王彦九<sup>1</sup>, 潘爽<sup>1</sup>

1. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 哈尔滨医科大学口腔医学院, 黑龙江 哈尔滨(150001); 2. 北京大学口腔医学院第二门诊部, 北京(100101)

**【摘要】** 目的 探讨干细胞因子(stem cell factor, SCF)对共培养的牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)成血管能力的影响。方法 本研究已通过单位伦理委员会审查批准。实验分为HUVECs组、SCF+HUVECs组、DPSCs+HUVECs组、SCF+DPSCs+HUVECs组。将SCF与培养液混合,制备成SCF浓度为100 ng/mL的混合培养液,按1:5的比例将DPSCs和HUVECs在体外进行共培养。通过CCK-8增殖实验观察每组细胞在第1、3、5、7天的增殖能力,细胞划痕实验和Transwell迁移实验分别检测SCF对直接或间接共培养条件下细胞迁移的影响,采用基质胶管形成实验检测各组细胞血管生成能力,通过ELISA检测每组细胞培养上清液中血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)的浓度,Western blot检测CD31、CD34和VEGFA的蛋白表达水平。结果 细胞划痕实验和Transwell迁移实验结果表明SCF显著促进了DPSCs和HUVECs共培养组细胞的迁移( $P < 0.05$ );体外基质胶管形成实验显示,SCF+DPSCs+HUVECs组中管状结构的分支数目和分支总长度显著高于其他组( $P < 0.05$ ),并且该组中成血管相关蛋白CD31、CD34和VEGFA的表达水平较高( $P < 0.01$ )。结论 SCF能够增强共培养DPSCs和HUVECs的迁移能力和体外成血管能力。

**【关键词】** 牙髓再生; 血管生成; 干细胞因子; 生长因子; 牙髓干细胞; 人脐静脉内皮细胞; 共培养; 组织工程

**【中图分类号】** R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)10-0712-08

**【引用著录格式】** 姬红娇,徐丽莉,丁文通,等. 干细胞因子促进共培养DPSCs与HUVECs的成血管能力[J]. 口腔疾病防治, 2023, 31(10): 712-719. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.10.004.

**Effect of stem cell factor on the angiogenic ability of cocultured DPSCs and HUVECs** JI Hongjiao<sup>1</sup>, XU Lili<sup>2</sup>, DING Wentong<sup>1</sup>, LI Peihui<sup>1</sup>, WANG Yanjiu<sup>1</sup>, PAN Shuang<sup>1</sup>. 1. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, School of Stomatology, Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2. Second Clinical Division, Peking University Hospital of Stomatology, Beijing 100101, China

Corresponding author: PAN Shuang, Email: panshuang@hrbmu.edu.cn, Tel: 86-451-85553234

**【Abstract】 Objective** To study the effect of stem cell factor (SCF) on the angiogenic ability of cocultured dental pulp stem cells (DPSCs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** This study has been reviewed and approved by the Ethics Committee. The experiment was split into the HUVECs, SCF+HUVECs, DPSCs+HUVECs, and SCF+DPSCs+HUVECs groups. A mixture of SCF and culture medium was used to prepare a mixed culture medium with an SCF concentration of 100 ng/mL. *In vitro* coculture of DPSCs and HUVECs was performed at a 1:5 ratio. CCK-8 proliferation assay was used to observe the proliferative capacity of cells in each group on days 1, 3, 5, and 7. Wound healing and Transwell migration assays were used to detect the effect of SCF on cell migration under either direct or indirect coculture conditions, respectively. *In vitro* angiogenesis experiments were performed to detect

**【收稿日期】** 2023-02-11; **【修回日期】** 2023-03-20

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81970924)

**【作者简介】** 姬红娇, 医师, 硕士, Email: hongjiao2@163.com; 徐丽莉, 主治医师, 硕士, Email: 19689876@qq.com

**【通信作者】** 潘爽, 主任医师, 博士, Email: panshuang@hrbmu.edu.cn, Tel: 86-451-85553234



微信公众号

the angiogenic capacity of the cells in each group. The vascular endothelial growth factor A (VEGFA) concentration in the cell culture supernatant was detected using ELISAs, and the protein expression levels of CD31, CD34, and VEGFA were detected using Western blot analysis. **Results** Wound healing and Transwell migration experiments showed that SCF significantly promoted the migration of cocultured DPSCs and HUVECs ( $P < 0.05$ ). The *in vitro* angiogenesis experiment showed that the number of branches and the total length of branches of tubular structures in the SCF+DPSCs+HUVECs group were significantly greater than those of the other groups ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of the vascular-related proteins CD31, CD34, and VEGFA in this group were greater ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** SCF can enhance the migration and *in vitro* angiogenesis of cocultured DPSCs and HUVECs.

**【Key words】** dental pulp regeneration; angiogenesis; stem cell factor; growth factor; dental pulp stem cells; human umbilical vein endothelial cells; coculture; tissue engineering

**J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(10): 712-719.**

**【Competing interests】** The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No.81970924).

在牙髓再生的组织工程领域中,主要包括神经再生、血管再生和牙本质再生,其中血管再生是关键,建立丰富和瞬时的血液供应对于牙髓组织的成功再生和长期生存是必要的<sup>[1]</sup>。牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)是牙髓再生的种子细胞<sup>[2-4]</sup>。内皮细胞是组织再生过程中新血管形成的潜在来源<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究结果表明,以1:5的比例直接共培养DPSCs和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),可促进血管形成,但形成的管状结构6 h后便发生分解<sup>[6]</sup>。文献报道,在共培养体系中加入生长因子可促进更多管状结构的形成和长期稳定<sup>[7-8]</sup>。

干细胞因子(stem cell factor, SCF),又称为Kit配体,是介导细胞血管形成和调节造血及其他生物过程的细胞因子<sup>[9-11]</sup>,相关研究及本课题组前期结果证实适宜浓度(100 ng/mL)的SCF可分别提高DPSCs和HUVECs的迁移能力和管状结构形成能力<sup>[12-13]</sup>。因此,本实验拟通过将SCF作用于共培养条件下的DPSCs和HUVECs,探讨其是否可以促进稳定血管结构生成。

## 1 材料和方法

本实验已获得哈尔滨医科大学附属第一医院伦理委员会批准。

### 1.1 主要试剂与仪器

DMEM培养基(SH30022.01, Hyclone, 美国); ECM培养基(1001, ScienCell, 美国); 胎牛血清(10099-141, Gibco, 美国); 青霉素-链霉素混合溶液(15140-122, Gibco, 美国); SCF干细胞因子(AF-300-

07, PeproTech, 美国); Matrigel基质胶(356234, Corning, 美国); 活细胞示踪剂CM-DiI(40718ES60, 翌圣, 中国); 活细胞示踪剂CMFDA(40721ES60, 翌圣, 中国); 一抗(鼠抗人): CD31(3528s, CST, 美国); 一抗(兔抗人): CD34(GB111693, 赛维, 中国); 一抗(兔抗人): 血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)(WL03335, 万类, 中国); 羊抗小鼠二抗(BA1050, 博士德, 中国); 羊抗兔二抗(BA1054, 博士德, 中国)。酶标仪(Epoch, Biotek, 美国), 荧光显微镜及照相系统(IX73, Olympus, 日本), 显影仪(FluorChem FC3, ProteinSimple, 美国)。

### 1.2 细胞培养和实验分组

HUVECs购买自iCell(赛百慷, 中国)。本实验所采用的DPSCs均为经过课题组鉴定后冻存的原代细胞, 选取第3~7代的细胞用于后续实验<sup>[14]</sup>。实验分组分别为: HUVECs组、SCF+HUVECs组、DPSCs+HUVECs组和SCF+DPSCs+HUVECs组, SCF浓度为100 ng/mL, DPSCs与HUVECs按照1:5的比例接种于孔板中。

### 1.3 CCK-8法检测细胞增殖能力

0.25%胰酶分别消化HUVECs和DPSCs, 用内皮细胞培养基或者混合培养液(ECM:DMEM=1:1)重悬将其调整为 $3 \times 10^3$ 个/孔的细胞悬液备用。每组设6个复孔, 其中两个复孔只加培养液作为空白对照, 将各组细胞混匀后接种在4个96孔板中, 分别培养1、3、5、7 d, 每孔避光加入10  $\mu$ L CCK-8溶液, 37  $^{\circ}$ C孵箱避光孵育1 h, 取出冷却至室温, 用酶标仪测定波长在450 nm处每个孔的吸光度值进行统计分析。

#### 1.4 细胞划痕实验检测水平向迁移能力

胰酶分别消化 HUVECs 和 DPSCs, 用混合培养液或 ECM 重悬将其调整为  $3 \times 10^5$  个/孔的细胞悬液, 每组设置 3 个复孔, 将各组细胞混匀后接种在 6 孔板中。待细胞贴壁并铺满孔板后, 使用  $200 \mu\text{L}$  枪头垂直于孔板划痕, 然后用 PBS 轻轻洗涤 2 遍, 洗去脱落的细胞, 吸净 PBS 后在各组中加入含或不含 SCF 的无血清培养液, 放入  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  孵箱中继续培养。在 0、12、24 h 后放置在倒置显微镜下观察拍照, 图像采集后用 Image J 软件检测划痕面积, 计算各组细胞 12、24 h 的愈合面积百分比, 进行统计分析。

#### 1.5 Transwell 实验检测 HUVECs 垂直向迁移能力

先用胰酶消化 DPSCs, 用混合培养液将其重悬为  $4 \times 10^3$  个/孔的细胞悬液, 每组设置 3 个复孔, 按照分组设置分别在 24 孔板下室中加入  $500 \mu\text{L}$  含或不含 SCF 的培养液。然后用胰酶消化 HUVECs, 无血清内皮细胞培养基将其制备成  $2 \times 10^4$  个/孔的细胞悬液, 均匀接种于上室中, 将 24 孔板置于孵箱中培养 48 h。孵育完成后, 于各孔上下室加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 遍后加入 0.1% 结晶紫染色 30 min, 用干净的棉签轻轻擦去上室未穿过聚碳酸酯膜的细胞, 将上室放于显微镜下随机取 5 个视野观察并拍照计数。

#### 1.6 体外基质胶管形成实验检测血管形成能力

将所需基质胶插入冰盒, 置于  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜备用。向经过预冷处理的 96 孔板中加入  $60 \mu\text{L}$ /孔基质胶, 每组设置 3 个复孔, 放入  $37^\circ\text{C}$  孵箱预凝胶化 30 min。在此期间, 用胰酶分别消化 HUVECs 和 DPSCs, 按照分组要求向铺胶的孔板内每孔加入  $100 \mu\text{L}$  含  $1.2 \times 10^4$  个细胞的悬液。完成上述操作后, 将孔板置于  $37^\circ\text{C}$  孵箱中培养, 分别在第 3、6、9、12 h 后, 于显微镜下观察并拍照记录管状结构的形成情况, 使用 Image J 软件量化各组管状结构的分支数量和分支总长度进行统计分析。此外, 将用细胞示踪剂 CMFDA 标记的 DPSCs、CM-DiI 标记的 HUVECs 按照 1:5 的比例接种于凝胶化的 Matrigel 基质胶上, 用于观察两种细胞的分布情况。

#### 1.7 酶联免疫吸附实验检测 VEGFA 的浓度

采用双抗体夹心 ELISA 法检测上清液中 VEGFA 的浓度。依照分组将  $3 \times 10^5$  个/孔的细胞悬液均匀接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 培养 3 d。收集细胞培养上清液后在  $4^\circ\text{C}$ ,  $1\ 000 \times g$  条件下离心 20 min, 除去杂质及细胞碎片, 取上清加入抗人

VEGFA 抗体包被的酶标板上进行检测。用酶标仪在  $450 \text{ nm}$  波长处测 OD 值, VEGFA 浓度与  $\text{OD}_{450}$  值之间成正比, 通过绘制标准曲线计算出样品中 VEGFA 的浓度。

#### 1.8 Western blot 实验检测成血管相关蛋白的表达水平

Western blot 检测不同分组的细胞中 CD31、CD34 和 VEGFA 蛋白表达情况。按照分组将  $3 \times 10^5$  个/孔的细胞悬液均匀接种于 6 孔板中, 待细胞完全贴壁后 72 h 加入细胞裂解液 (RIPA:PMSF = 100:1), 分组收集于 EP 管中超声裂解, 离心后提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白浓度测定。用 10% Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 湿转法转至 PVDF 膜上, 5% 封闭蛋白粉室温封闭 2 h,  $4^\circ\text{C}$  冰箱过夜孵育一抗 CD31 (1:1 000)、CD34 (1:1 000)、VEGFA (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000)。取出洗膜后加入二抗, 室温孵育 1 h, 使用超敏 ECL 发光试剂盒, FC3 显影仪检测显影, 图像采用 ImageJ 软件进行灰度值分析, GAPDH 为内参。

#### 1.9 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差表示。采用单因素方差分析进行多组间比较,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

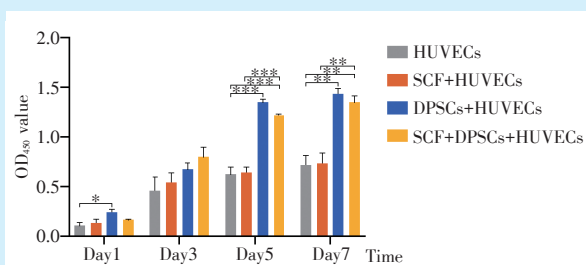
### 2.1 DPSCs 与 HUVECs 共培养可提高细胞的增殖能力

CCK-8 增殖实验结果显示 (图 1), 第 1、5、7 天 DPSCs+HUVECs 组的细胞增殖能力高于 HUVECs 组 ( $P < 0.05$ ), SCF+DPSCs+HUVECs 组在第 5 天时增殖能力显著优于 HUVECs 和 SCF+HUVECs 组 ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.001$ ), 第 7 天时 SCF+DPSCs+HUVECs 组增殖能力依旧高于 HUVECs 和 SCF+HUVECs 组 ( $P = 0.003$ ,  $P = 0.003$ ), 但加或不加 SCF 组间无显著差异 ( $P = 0.999$ ,  $P = 0.892$ )。

### 2.2 SCF 促进共培养的 DPSCs 和 HUVECs 划痕愈合

为检测 SCF 和 DPSCs 与 HUVECs 直接共培养时, 对各组细胞迁移能力的影响, 进行了细胞划痕实验。首先, 于显微镜下对 0、12、24 h 各组细胞的迁移情况拍照观察 (图 2a)。划痕实验的量化结果显示 12、24 h 后, 相较于其他三组, SCF+DPSCs+HUVECs 组的细胞向划痕处迁移明显 (HUVECs 组 vs. SCF+DPSCs+HUVECs 组, 12 h:  $P < 0.001$ , 24 h:

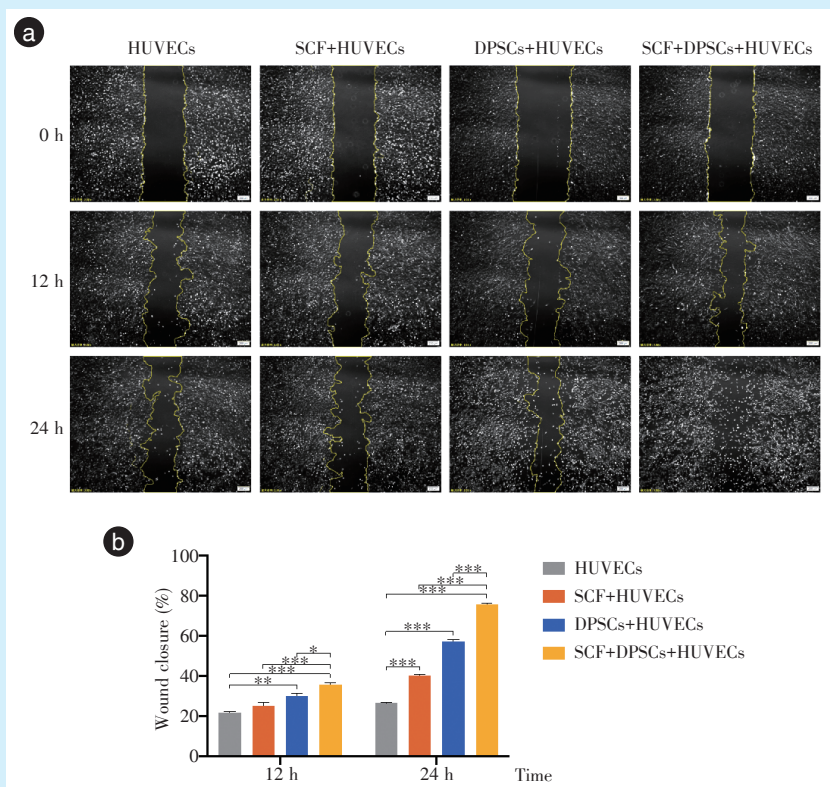




On days 1, 3, 5, and 7, the OD<sub>450</sub> values of each group were detected and analyzed. The cell proliferation ability of DPSCs and HUVECs cocultured group was higher than that of HUVECs cultured alone. \*:  $P < 0.05$ . \*\*:  $P < 0.01$ . \*\*\*:  $P < 0.001$ . DPSCs: dental pulp stem cells. HUVECs: human umbilical vein endothelial cells. SCF: stem cell factor

Figure 1 The proliferative ability of the cells was measured by the CCK-8 assay

图1 CCK-8法检测细胞的增殖能力



a: microscope migration images of groups of cells at 0, 12 and 24 h (40 ×). After 12 h, the areas of cell scratches decreased in all groups. After 24 h, the areas of cell scratches decreased significantly in all groups, and scratches in the SCF + DPSCs + HUVECs group had fused. b: statistical analysis of the percent scratch healing area was performed after image acquisition using Image J to detect the area of scratch and calculate the percentage of scratch healing area for 12 h and 24 h by the formula = (0 h scratch area - 12 h or 24 h scratch area) / 0h scratch area × 100. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ . DPSCs: dental pulp stem cells; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; SCF: stem cell factor

Figure 2 Effect of SCF on migration capacity of DPSCs and HUVECs under direct coculture conditions

图2 SCF对DPSCs和HUVECs直接共培养条件下迁移能力的影响

$P < 0.001$ ; SCF + HUVECs 组 vs. SCF + DPSCs + HUVECs 组, 12 h:  $P = 0.001$ , 24 h:  $P < 0.001$ ; DPSCs + HUVECs 组 vs. SCF + DPSCs + HUVECs 组, 12 h:  $P = 0.029$ , 24 h:  $P < 0.001$ ), DPSCs + HUVECs 组划痕愈合面积百分比大于 HUVECs 组 (12 h:  $P = 0.003$ , 24 h:  $P < 0.001$ )。24 h, SCF + HUVECs 组的愈合面积百分比大于 HUVECs 组 ( $P < 0.001$ ) (图 2b)。

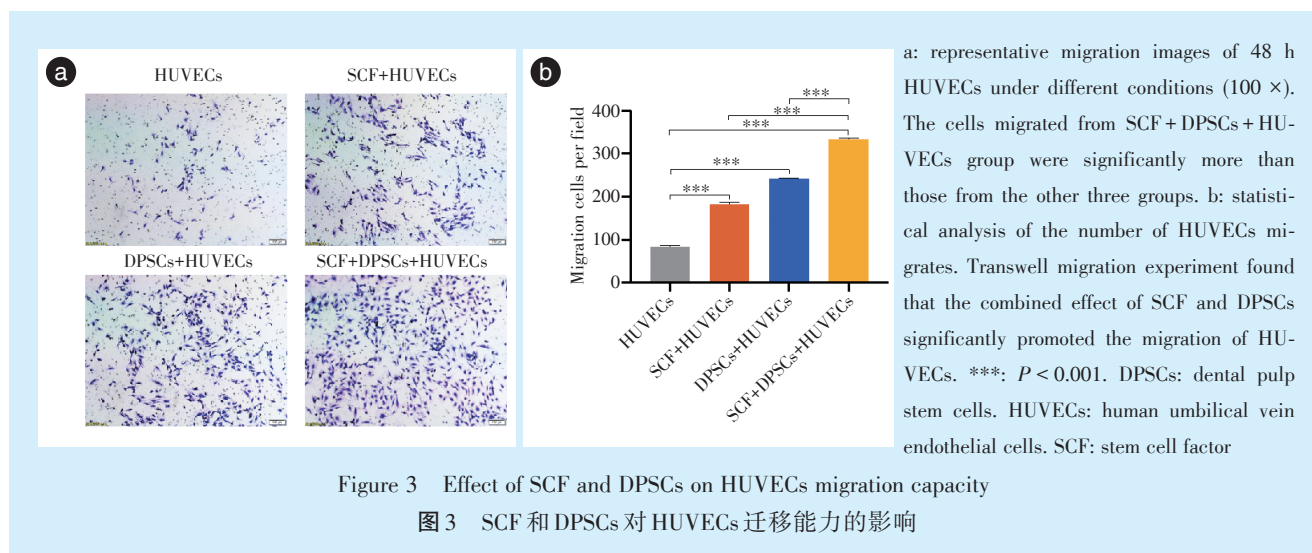
### 2.3 SCF和DPSCs促进HUVECs迁移

为检测 SCF 和 DPSCs 与 HUVECs 间接共培养时,二者对 HUVECs 迁移能力的影响,进行了 Transwell 迁移实验。图 3a 是 48 h 后各组具有代表性的迁移图像。实验结果显示,与下室只加入培养液

的对照组相比,单独加入 SCF 或 DPSCs 组可诱导上室 HUVECs 的迁移 ( $P < 0.001$ ),当 SCF 和 DPSCs 共同作用时, HUVECs 的迁移数量显著多于二者单独使用时 ( $P < 0.001$ ) (图 3b)。

### 2.4 SCF作用于共培养的DPSCs和HUVECs促进管状结构的形成

体外基质胶管形成实验结果中显示,3 h 各组开始形成小管样结构,6、9、12 h 管状结构进一步成熟稳定,管腔直径增加 (图 4a)。SCF + DPSCs + HUVECs 组与其他组相比,形成的小管样结构分支数目多,分支的总长度也相对较长。通过对 4 个时间节点管状结构分支的数量进行统计分析 (图



4b), 结果发现 SCF+HUVECs 组和 DPSCs+HUVECs 组分支数目高于 HUVECs 组 (HUVECs 组 vs. SCF + HUVECs 组, 3 h:  $P < 0.001$ , 6 h:  $P = 0.002$ , 9 h:  $P = 0.017$ , 12 h:  $P = 0.021$ ; HUVECs 组 vs. DPSCs+HUVECs 组, 3 h:  $P < 0.001$ , 6 h:  $P < 0.001$ , 9 h:  $P = 0.001$ , 12 h:  $P = 0.001$ ), SCF+DPSCs+HUVECs 组管状结构的数目高于其他三组 ( $P < 0.001$ )。从对各组管状结构分支总长度的统计分析结果中 (图 4c) 发现, 管状结构形成的 12 h 后, SCF+DPSCs+HUVECs 组分支总长度显著高于其他三组 (HUVECs 组 vs. SCF + DPSCs+HUVECs 组,  $P < 0.001$ ; SCF + HUVECs 组 vs. SCF + DPSCs+HUVECs 组,  $P < 0.0001$ ; DPSCs+HUVECs 组 vs. SCF + DPSCs+HUVECs 组,  $P = 0.001$ )。

虽然 SCF 和 DPSCs 单独与 HUVECs 培养也可促进管状结构的形成, 但促进效果低于 SCF 作用于共培养的 DPSCs 和 HUVECs 的情况。将活细胞示踪剂 CMFDA 标记的 DPSCs (绿色荧光)、CM-DiI 标记的 HUVECs (红色荧光) 按照 1:5 的比例接种于凝胶化的 Matrigel 基质胶上, 分别在 3、9 h 于荧光显微镜下拍照, 用于观察两种细胞的分布变化情况。在 3 h, DPSCs 多分布于管状结构交叉点处, 随着小管的进一步成熟稳定, 到 9 h, DPSCs 会慢慢由交叉点处向分支上转移, 发挥周细胞样细胞的功能, 维持管状结构的稳定 (图 4d)。

### 2.5 SCF 促进 DPSCs 和 HUVECs 共培养组中血管生成相关蛋白的表达

ELISA 结果显示, 经 100 ng/mL SCF 处理的 DPSCs 和 HUVECs 共培养组上清液中 VEGFA 的浓度高于其他三组 ( $P < 0.001$ ), DPSCs+HUVECs 组的

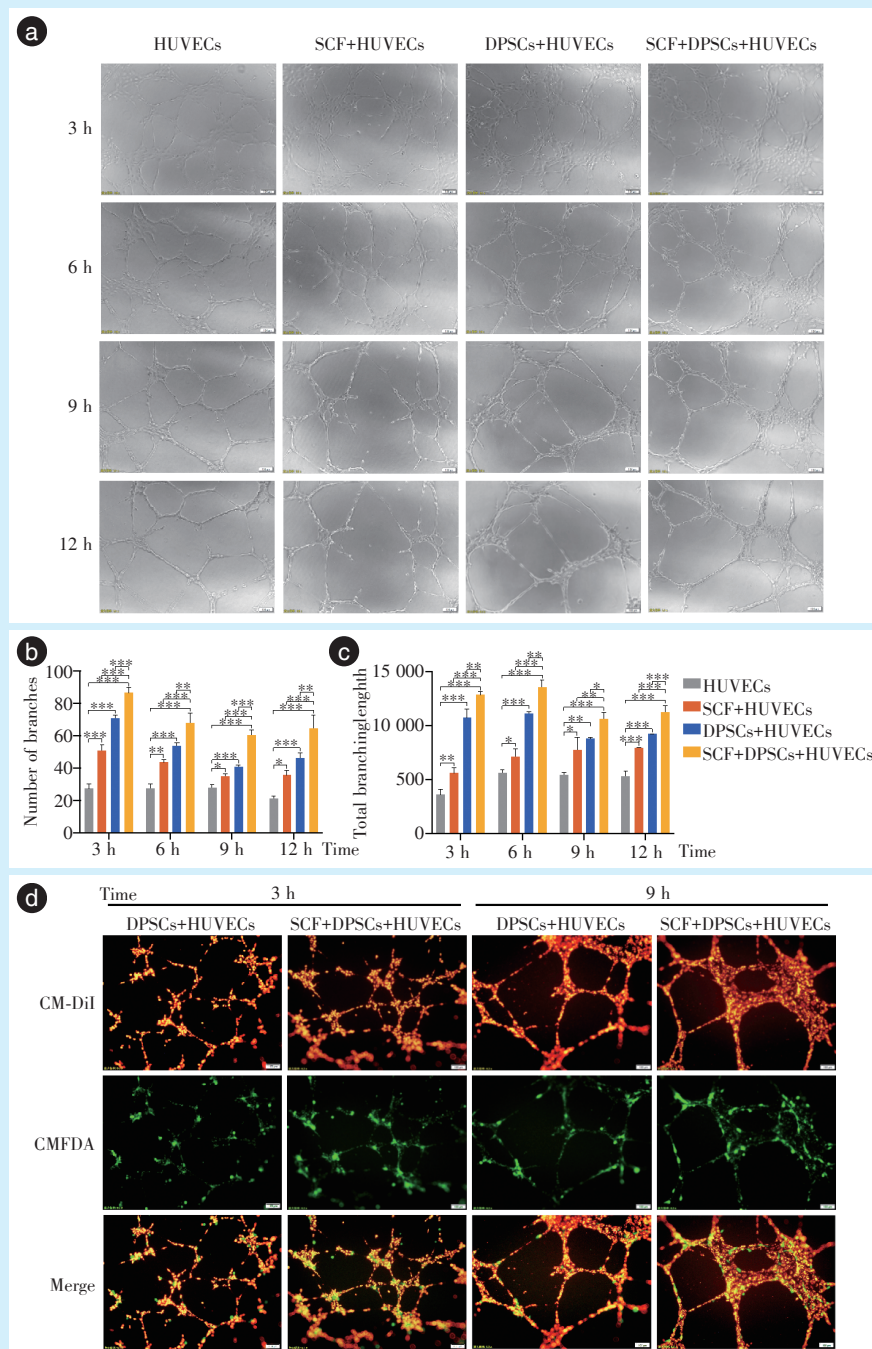
VEGFA 浓度也显著高于 HUVECs 单独培养组 ( $P < 0.001$ ) (图 5a)。通过 Western blot 检测 CD31、CD34 和 VEGFA 这三种血管生成相关蛋白的表达情况。SCF+DPSCs+HUVECs 组血管生成相关蛋白的表达量多于其他三组 (图 5b)。与 HUVECs 组相比, SCF+HUVECs 组、DPSCs+HUVECs 组和 SCF+DPSCs+HUVECs 组中 CD31 的表达水平均有所提高 ( $P < 0.001$ ), SCF+DPSCs+HUVECs 组中 CD34 和 VEGFA 的表达水平高于 SCF+HUVECs 组和 DPSCs+HUVECs 组 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ ) (图 5c)。因此, 与对照组相比, 单独使用 SCF 或 DPSCs 作用于 HUVECs, 也可促进成血管相关蛋白表达水平的提高, 但作用不如二者共同作用时明显。

### 3 讨论

牙髓是一种发育成熟的非矿化牙体组织, 仅通过牙体硬组织包绕形成的狭窄根尖孔与根尖周组织建立联系, 当其暴露于机械创伤和致龋环境中时会导致根管内或根尖周组织的感染<sup>[15]</sup>。在牙髓再生中, 根尖孔的存在限制了宿主向整个根管系统供血的能力, 为了弥补这一局限性, 潜在实验策略是将干细胞与能够诱导血管生成的生长因子协同应用, 从而促进更多牙髓血管的生成<sup>[16]</sup>。

DPSCs 被认为是牙髓再生的重要细胞来源<sup>[17]</sup>, 主要通过两种方式诱导牙髓血管的生成。一种方式是 DPSCs 和内皮细胞通过旁分泌途径分泌促血管生成因子, 从而增强细胞的增殖迁移和管形成能力<sup>[18-20]</sup>。Kim 等<sup>[21]</sup>证明 DPSCs 与 HUVECs 联合使用可显著增加后肢缺血动物模型中微血管的数量, 且 DPSCs 分泌的 VEGF 能够促进 HUVECs





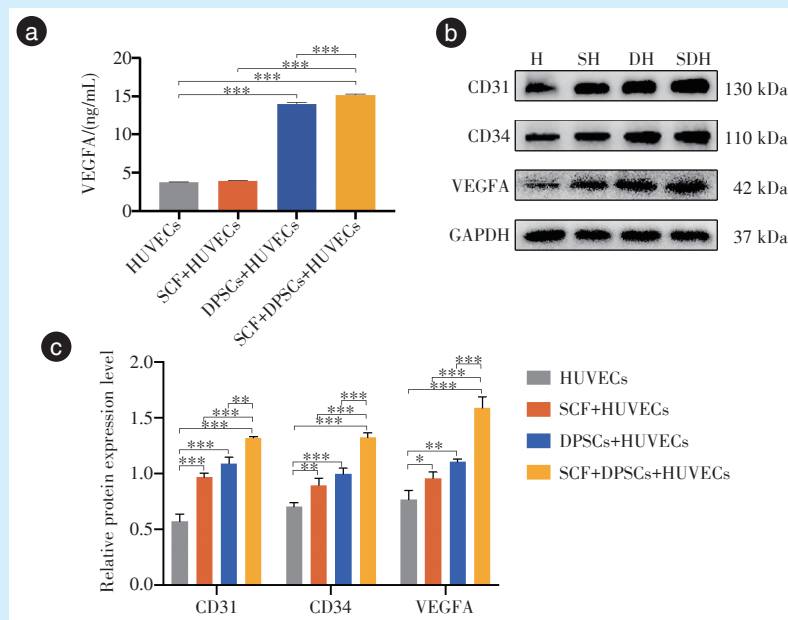
a: microscope images of the formation of tubular structures in each group of cells at 3 h, 6 h, 9 h, and 12 h (100 ×). The coculture of DPSCs and HUVECs group formed more tubular structures than that of HUVECs group. b: statistical analysis of the number of branches of the tube. c: statistical analysis of the branch length of the tube. d: fluorescent images of tubular structures in coculture group labeled with live cell tracer at 3 h and 9 h. DPSCs are distributed at nodes of tubule structures at 3 h. As tubules continue to mature and stabilize, at 9 h DPSCs slowly migrate from nodes to branches, to play the role of pericytoid cells and to maintain the stability of the tubular structures. CM-DiI (red): HUVECs. CMFDA (green): DPSCs. \*:  $P < 0.05$ . \*\*:  $P < 0.01$ . \*\*\*:  $P < 0.001$ . DPSCs: dental pulp stem cells. HUVECs: human umbilical vein endothelial cells. SCF: stem cell factor

Figure 4 Effect of SCF on the vascular formation capacity of cocultured DPSCs and HUVECs  
图4 SCF对共培养的DPSCs和HUVECs成血管能力的影响

的增殖和新血管的形成。本实验中, DPSCs和HUVECs共培养组与单独的HUVECs相比,细胞的增殖、迁移能力以及管状结构形成能力均显著增加。另一种方式是DPSCs利用其多向分化潜能分化为周细胞样细胞直接参与管状结构的形成<sup>[22-23]</sup>。据报道, DPSCs表达周细胞标记物,并且在与内皮细胞共培养血管生成模型中稳定形成的管状结构<sup>[24]</sup>。本研究使用活细胞示踪剂分别对DPSCs和HUVECs进行标记,通过荧光显微镜拍照观察共培养组细胞在3 h和9 h的细胞分布动态变

化,发现DPSCs由管状结构的节点向分支方向转移,包绕在管腔周围,依附于HUVECs类似周细胞样细胞,稳定管状结构。根据以上实验结果分析, DPSCs代表了周细胞的有效来源,适当的培养条件可以产生具有稳定血管和促进血管成熟能力的群体。

SCF既可以发挥促进细胞血管形成的作用,也可以诱导干细胞的自我更新、迁移和存活<sup>[25-26]</sup>。本研究中, SCF明显促进了HUVECs的迁移,使其形成更多的血管样结构。Cucco等<sup>[27]</sup>发现DPSCs表



a: VEGFA concentration (ng/mL) in cell supernatant of each group was detected by ELISA. The concentration of VEGFA in the supernatant of SCF+DPSCs+DPSCs group was higher than that of other groups. b: western blot images of CD31, CD34, VEGFA. The expression level of angiogenesis-related proteins in the SCF+DPSCs+DPSCs group was significantly higher than that of the other groups. c: using GAPDH as reference, the relative expression levels of vascular-related proteins were analyzed. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ . H: HUVECs. SH: SCF + HUVECs. DH: DPSCs + HUVECs. SDH: SCF + DPSCs + HUVECs. DPSCs: dental pulp stem cells. HUVECs: human umbilical vein endothelial cells. SCF: stem cell factor; VEGFA: vascular endothelial growth factor A

Figure 5 Effect of SCF on angiogenesis-related proteins expression of cocultured DPSCs and HUVECs

图5 SCF对共培养的DPSCs和HUVECs血管形成相关蛋白表达的影响

达 SCF 和 CD117, 证实了 SCF 信号通路可通过 CD117 调控 DPSCs 中 Bmi-1 基因的表达, 进而促进 DPSCs 的自我更新。在本实验中, 当 SCF 作用于共培养的 DPSCs 与 HUVECs 时, 迁移能力和成管能力显著高于其他组, 同时对血管生成标志物的检测结果表明, SCF+DPSCs+HUVECs 组中 CD31、CD34 和 VEGFA 三种蛋白的表达水平最高, 即 SCF 的应用可进一步促进 DPSCs 和 HUVECs 成血管相关蛋白表达的增加, 提高细胞的血管形成能力。

SCF 作用于共培养的 DPSCs 和 HUVECs 时, 形成的管状结构的数目更多且更加稳定, 血管形成相关蛋白的表达水平也较高, 即 SCF 可促进共培养 DPSCs 和 HUVECs 的迁移, 增强细胞的血管形成能力。下一步的目标是研究此过程中涉及的成血管的具体信号通路和作用机制, 以及如何在体内应用形成富含血管样结构的牙髓组织, 从而成功实现临床转化。

**【Author contributions】** Ji HJ performed the experiment, analyzed the data and wrote the article. Xu LL, Ding WT, Li PH and Wang YJ performed the experiment, analyzed the data and revised the article. Pan S designed the study and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

#### 参考文献

[1] Kumar N, Maher N, Amin F, et al. Biomimetic approaches in clinical endodontics[J]. *Biomimetics (Basel)*, 2022, 7(4): 229. doi: 10.3390/biomimetics7040229.

- [2] Gronthos S, Brahim J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells[J]. *J Dent Res*, 2002, 81(8): 531-535. doi: 10.1177/154405910208100806.
- [3] Sabbagh J, Ghassibe-Sabbagh M, Fayyad-Kazan M, et al. Differences in osteogenic and odontogenic differentiation potential of DPSCs and SHED[J]. *J Dent*, 2020, 101: 103413. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103413.
- [4] Mattei V, Martellucci S, Pulcini F, et al. Regenerative potential of DPSCs and revascularization: direct, paracrine or autocrine effect? [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(5): 1635-1646. doi: 10.1007/s12015-021-10162-6.
- [5] Zhang S, Zhang W, Li Y, et al. Cotransplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and endothelial cells for angiogenesis and pulp regeneration *in vivo*[J]. *Life Sci*, 2020, 255: 117763. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117763.
- [6] 吴一梦, 张爽, 潘爽, 等. 脐静脉内皮细胞与牙本质浸提液诱导的牙髓干细胞共培养成血管的研究[J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(5): 504-508. doi: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.05.010.
- Wu Y, Zhang S, Pan S, et al. Angiogenic potentials of coculture of human umbilical vein endothelial cells and dentin extract-induced human dental pulp stem cells[J]. *J Oral Sci Res*, 2017, 33(5): 504-508. doi: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.05.010.
- [7] Liu Y, Gan L, Cui DX, et al. Epigenetic regulation of dental pulp stem cells and its potential in regenerative endodontics[J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(11): 1647-1666. doi: 10.4252/wjsc.v13.i11.1647.
- [8] Siddiqui Z, Acevedo-Jake AM, Griffith A, et al. Cells and material-based strategies for regenerative endodontics[J]. *Bioact Mater*,

- 2022, 14: 234-249. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.11.015.
- [9] Kim KL, Seo S, Kim JT, et al. SCF (stem cell factor) and cKIT modulate pathological ocular neovascularization[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(10): 2120-2131. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313179.
- [10] Xie DM, Chen Y, Liao Y, et al. Cardiac derived CD51-positive mesenchymal stem cells enhance the cardiac repair through SCF-mediated angiogenesis in mice with myocardial infarction[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 642533. doi: 10.3389/fcell.2021.642533.
- [11] Takematsu E, Massidda M, Auster J, et al. Transmembrane stem cell factor protein therapeutics enhance revascularization in ischemia without mast cell activation[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2497. doi: 10.1038/s41467-022-30103-2.
- [12] 闫昕, 刘斌, 卢士红, 等. 干细胞因子对内皮细胞增殖、迁移、管状形成能力的影响及对CD133+细胞的趋化效应[J]. *中华血液学杂志*, 2011, 32(5): 326-330. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.05.009.
- Yan X, Liu B, Lu SH, et al. The effects of stem cell factor on proliferation, transmigration, capillary tube formation of endothelial cells and on the chemotaxis of CD133+ cells[J]. *Chin J Hematol*, 2011, 32(5): 326-330. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.05.009.
- [13] Mu X, Shi L, Pan S, et al. A customized self-assembling peptide hydrogel-wrapped stem cell factor targeting pulp regeneration rich in vascular-like structures[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(27): 16568-16574. doi: 10.1021/acsomega.0c01266.
- [14] 孙靖宜, 李艳萍, 潘爽, 等. 石墨烯对牙髓干细胞增殖、迁移能力及细胞形态的影响[J]. *口腔疾病防治*, 2021, 29(10): 656-662. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.10.002.
- Sun JX, Li YP, Pan S, et al. Effects of graphene on the proliferation, migration and morphology of dental pulp stem cells[J]. *J Prev Treat Stomatol Dis*, 2021, 29(10): 656-662. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.10.002.
- [15] Widbiller M, Schmalz G. Endodontic regeneration: hard shell, soft core[J]. *Odontology*, 2021, 109(2): 303-312. doi: 10.1007/s10266-020-00573-1.
- [16] Yan H, De Deus G, Kristoffersen IM, et al. Regenerative endodontics by cell homing: a review of recent clinical trials[J]. *J Endod*, 2023, 49(1): 4-17. doi: 10.1016/j.joen.2022.09.008.
- [17] Wu Y, Li B, Yu D, et al. CBX7 rejuvenates late passage dental pulp stem cells by maintaining stemness and pro-angiogenic ability[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2023. doi: 10.1007/s13770-023-00521-4.
- [18] Gong T, Xu J, Heng B, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates DPSCs to induce sprouting angiogenesis of endothelial cells[J]. *J Dent Res*, 2019, 98(7): 803-812. doi: 10.1177/0022034519843886.
- [19] Oh M, Zhang Z, Mantesso A, et al. Endothelial-initiated crosstalk regulates dental pulp stem cell self-renewal[J]. *J Dent Res*, 2020, 99(9): 1102-1111. doi: 10.1177/0022034520925417.
- [20] Zhang Y, Liu J, Zou T, et al. DPSCs treated by TGF- $\beta$ 1 regulate angiogenic sprouting of three-dimensionally co-cultured HUVECs and DPSCs through VEGF-Ang-Tie2 signaling[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 281. doi: 10.1186/s13287-021-02349-y.
- [21] Kim CK, Hwang JY, Hong TH, et al. Combination stem cell therapy using dental pulp stem cells and human umbilical vein endothelial cells for critical hindlimb ischemia[J]. *BMB Rep*, 2022, 55(7): 336-341. doi: 10.5483/BMBRep.2022.55.7.003.
- [22] Parthiban SP, He W, Monteiro N, et al. Engineering pericyte-supported microvascular capillaries in cell-laden hydrogels using stem cells from the bone marrow, dental pulp and dental apical papilla[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21579. doi: 10.1038/s41598-020-78176-7.
- [23] Zhu SY, Yuan CY, Lin YF, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) and dental pulp stem cells (DPSCs) display a similar profile with pericytes[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021: 8859902. doi: 10.1155/2021/8859902.
- [24] Delle Monache S, Martellucci S, Clementi L, et al. *In vitro* conditioning determines the capacity of dental pulp stem cells to function as pericyte-like cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(10): 695-706. doi: 10.1089/scd.2018.0192.
- [25] Pan S, Dangaria S, Gopinathan G, et al. SCF promotes dental pulp progenitor migration, neovascularization, and collagen remodeling - potential applications as a homing factor in dental pulp regeneration[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2013, 9(5): 655-667. doi: 10.1007/s12015-013-9442-7.
- [26] Mu X, Liu H, Yang S, et al. Chitosan tubes inoculated with dental pulp stem cells and stem cell factor enhance facial nerve-vascularized regeneration in rabbits[J]. *ACS Omega*, 2022, 7(22): 18509-18520. doi: 10.1021/acsomega.2c01176.
- [27] Cucco C, Zhang Z, Botero TM, et al. SCF/C-kit signaling induces self-renewal of dental pulp stem cells[J]. *J Endod*, 2020, 46(9S): S56-S62. doi: 10.1016/j.joen.2020.06.035.

(编辑 周春华)



官网