

牙髓干细胞与血管周细胞性能比较研究

吴文婧, 丁如愿, 张菁, 张红艳, 胡露露, 李颂

摘要 目的 比较人牙髓干细胞(DPSCs)与血管周细胞相关性能,研究是否可以用DPSCs取代血管周细胞用于血管再生。方法 比较DPSCs和血管周细胞2种细胞成骨、成神经多向分化潜能。Matrigel三维培养技术评价DPSCs和血管周细胞稳定血管样结构的能力。Transwell试验评价DPSCs和血管周细胞的迁移能力和对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)迁移行为的影响。结果 DPSCs和血管周细胞呈相似的形态,经诱导后均可向成骨和成神经分化。2种细胞在Matrigel基质胶上与HUVEC共培养均能建立稳定的管腔样结构。在Transwell试验中,DPSCs和血管周细胞均表现类似的趋化能力。结论 DPSCs具有与血管周细胞相似的形态和功能特征,可以尝试用于体外血管再生。

关键词 周细胞; 牙髓干细胞; 细胞迁移; 成血管; 分化

中图分类号 R 322.12; R 322.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)10-1545-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.013

血管新生是组织修复的基础,血管新生异常常常影响机体损伤的正常愈合。血管由内衬血管壁的内皮细胞层和血管周细胞组成。研究^[1]表明,在血管形成过程中,首先由增殖的血管内皮细胞形成管腔样结构,然后血管周细胞迁移聚集,2种细胞共同调节血管的稳定性。周细胞在全身毛细血管和微血

管周围广泛分布,能够稳定血管结构,对血管的发育以及重塑具有重要作用。然而,现阶段分离血管周细胞还有一定的困难,这限制了其在体外血管重建中的运用。有研究^[2-4]报道,来源于脑组织、脐带、脂肪等的间充质干细胞和血管周细胞有许多相似之处,这些间充质干细胞在细胞表型、基因表达和分化能力等方面与血管周细胞有着高度的相似性。但是,这些组织来源的间充质干细胞获取困难,相对来说,来源于牙髓的牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)具有无创伤、易于分离、增殖率高等优势,可以从第三恒磨牙、正畸牙或其他原因拔除的健康牙的牙髓组织中分离培养获得,而不受伦理问题的影响。在该研究中,选择血管稳定能力、迁移功能和干性分化潜能作为评价标准,比较DPSCs和血管周细胞之间的相似性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 原代血管周细胞和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)(美国ScienCell公司); Matrigel基质胶(美国BD公司); 周细胞培养基(美国ScienCell公司)和ECM培养基(Lonza公司); Transwell细胞小室(美国BD公司); DMEM培养基(美国HyClone公司); Dispase酶和I型胶原酶(美国Sigma公司); CO₂恒温孵箱(英国Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 DPSCs的分离培养与鉴定 取临床小于25岁健康患者因正畸或阻生拔除健康无龋的牙齿,拔出后立即放入含5%双抗PBS中,摇晃冲掉牙根表面血迹,立即冰盒保存,送至实验室。4 h内将牙齿

2020-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81400497)

作者单位: 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 口腔疾病研究安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 吴文婧, 女, 硕士研究生;

李颂, 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 3197053337@qq.com;

胡露露, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: queenyhoo@yeah.net

pre-treated antigen tablets with 4% paraformaldehyde. After blocking, incubation of the serum to be tested and incubation of the fluorescent secondary antibody, the results were observed by immunofluorescence microscopy. **Results** The fluorescence of the fluorescent secondary antibody was observed in the serum samples of patients infected with KSHV by immunofluorescence technique, while the fluorescence of the secondary antibody was not observed by the specimens not infected with KSHV. **Conclusion** The cell antigenic tablets of KSHV which can detect serum have been successfully prepared, which provides a method for further studying the epidemiology of KSHV.

Key words Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; LANA; cell antigen tablets; immunofluorescence

放入超净工作台,用无菌纱布包裹牙齿,锤子砸开牙齿,超净工作台内分开牙齿,镊子取出牙髓,去掉根尖1/3根髓,将牙髓移入无菌培养皿中,用2%双抗PBS反复冲洗干净。将牙髓组织剪碎后移入15 ml离心管中,加入1 ml浓度为3 mg/ml胶原酶和1 ml浓度为4 mg/ml Dispase 酶,混匀后37 °C震荡消化40~60 min,加入培养基终止消化,以1 000 r/min离心5 min,弃上清液,细胞重悬于20%胎牛血清的 α -MEM培养液中,吹打混匀后置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。3~5 d后观察细胞生长情况,以后3 d换液,培养10~12 d,当细胞长至约90%融合度时,用0.25%胰蛋白酶消化传代培养。取P3代DPSCs, PBS洗涤2次,用胰酶消化收集,以1 × 10⁶/ml分装至1.5 ml EP管,分别加入CD105、CD29、CD90、CD73、CD45、CD44、CD34抗体,4 °C避光孵育1 h, PBS洗涤后重悬,流式细胞仪检测。

1.2.2 多向诱导分化 成骨分化:以4 × 10³/cm²接种于12孔板上,培养至70%融合度时,更换成骨诱导培养基(含 α -MEM, 10% FBS, 1%双抗, 50 μ g/ml磷酸抗坏血酸, 10 mmol/L β -磷酸甘油, 10 nmol/L地塞米松, 10 nmol/L 1,25二羟基维生素D₃)培养4周,每3 d换液1次。诱导4周后,用10%中性缓冲福尔马林固定1 h,弃去固定液,用双蒸水冲洗3次,加入茜素红染色。

成神经分化:以4 × 10³/cm²接种于12孔板上,培养至70%融合度时,更换成神经诱导培养基(含神经诱导培养基, 40 ng/ml成纤维细胞生长因子,

20 ng/ml表皮生长因子)培养4周,每3 d换液1次。诱导4周后,检测成神经分化。

1.2.3 体外成血管实验 预先对48孔板进行基质胶涂层,按照DPSC + HUVEC(1:4)、血管周细胞 + HUVEC(1:4)接种在孔板上,37 °C与5% CO₂条件下孵育。于3、7、11、14、18、24、30、36、42 h在倒置显微镜下观察小管形成情况并采集图像。

1.2.4 细胞趋化实验 DPSC和HUVEC在血清饥饿24 h后,消化重悬细胞,调整细胞悬液密度为1 × 10⁶/ml,上室每孔加0.1 ml HUVEC悬液,下室分别加入0.6 ml的DPSCs或血管周细胞悬液,所有样本均设有复孔,37 °C与5% CO₂条件下培养12 h。固定染色镜检,计算下表面迁移细胞数,评价DPSCs和血管周细胞对HUVEC迁移行为的影响。

1.3 统计学处理 每次实验独立重复 ≥ 3 次,采用GraphPad Prism 5软件对数据进行分析。数据以均值 \pm 标准差表示。两组间比较采取独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DPSCs的流式鉴定 流式细胞仪对DPSCs进行表面抗原的检测,结果显示细胞纯度较高,均阳性表达CD105、CD73、CD90、CD29、CD44,阴性表达CD34、CD45,符合间充质来源的干细胞特征,为间充质来源(图1)。

2.2 DPSCs与血管周细胞的多向分化潜能 在倒

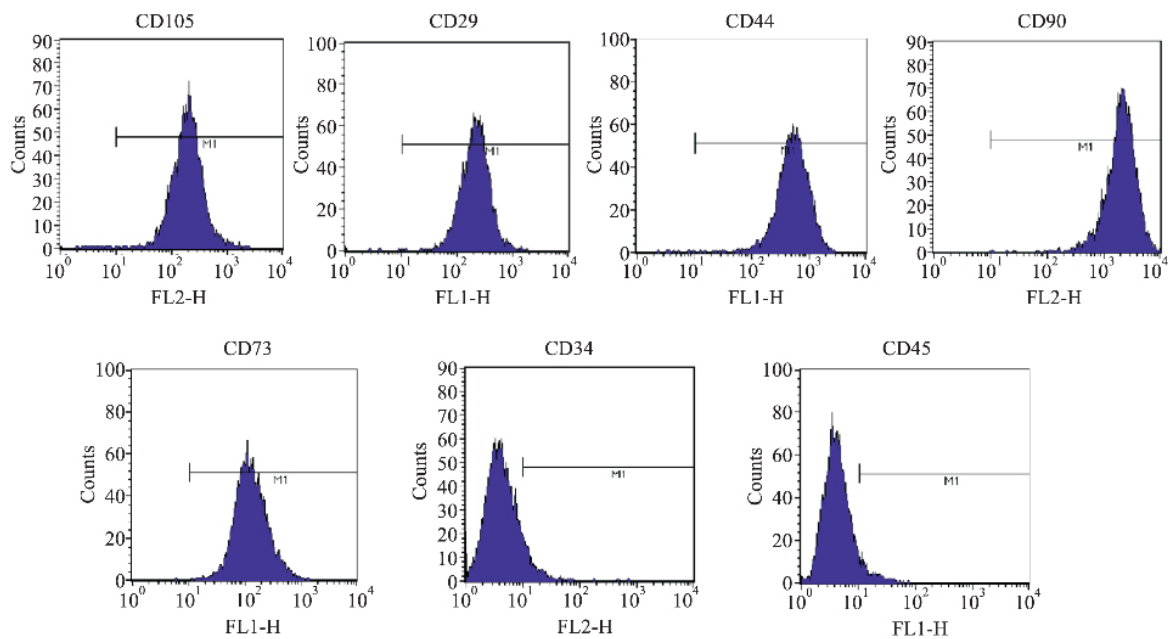


图1 流式细胞术检测DPSCs表面标志物

置显微镜下, DPSCs 和血管周细胞均呈梭形, 贴壁生长, 两者表现出类似的形态学特征(图2)。

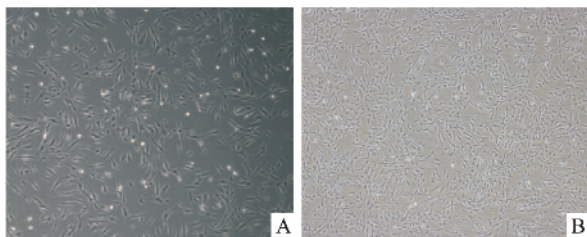


图2 细胞体外培养的形态学观察 ×40
A: DPSCs; B: 血管周细胞

DPSCs 和血管周细胞经成骨诱导液诱导4周后, 茜素红染色显示红色的矿化结节。经神经诱导液诱导4周后, 观察到两组细胞均缩小变窄并向两侧伸长, 呈长轴突样, 类似神经元样细胞的形态。发现两组细胞均能向成骨细胞和神经细胞分化, 可见 DPSCs 和血管周细胞均具有相似的多向分化能力(图3)。

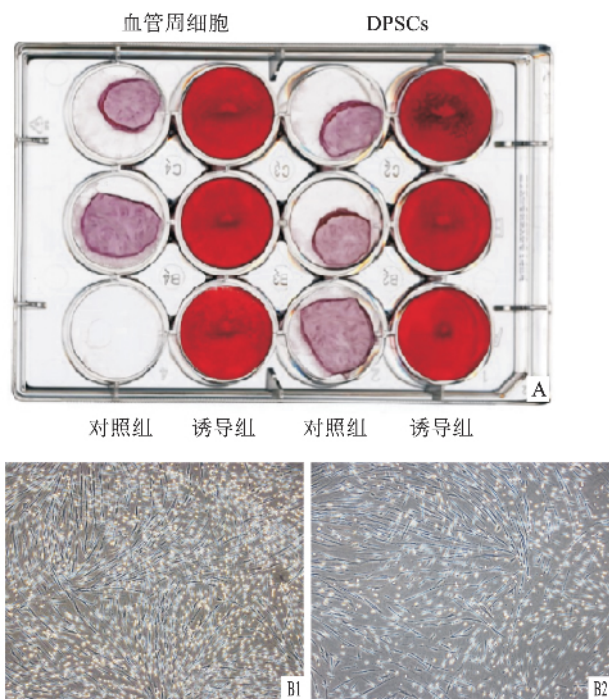


图3 诱导成骨和成神经分化
A: 成骨诱导; B1: DPSCs 成神经诱导 ×40; B2: 血管周细胞成神经诱导 ×40

2.3 DPSCs/血管周细胞与 HUVEC 共培养形成稳定的管状结构 本研究进行了 Matrigel 成血管实验, 以 HUVEC、DPSCs + HUVEC 和血管周细胞 + HUVEC 在 Matrigel 上共培养, 比较各组的成血管能

力。结果显示, 两组细胞均可加强由 HUVEC 形成的网状结构, 网状结构相互连接, 形成管腔样结构, 并维持到 42 h。可见 DPSCs 和血管周细胞均能增强 HUVEC 产生的管状结构的稳定性(图4)。

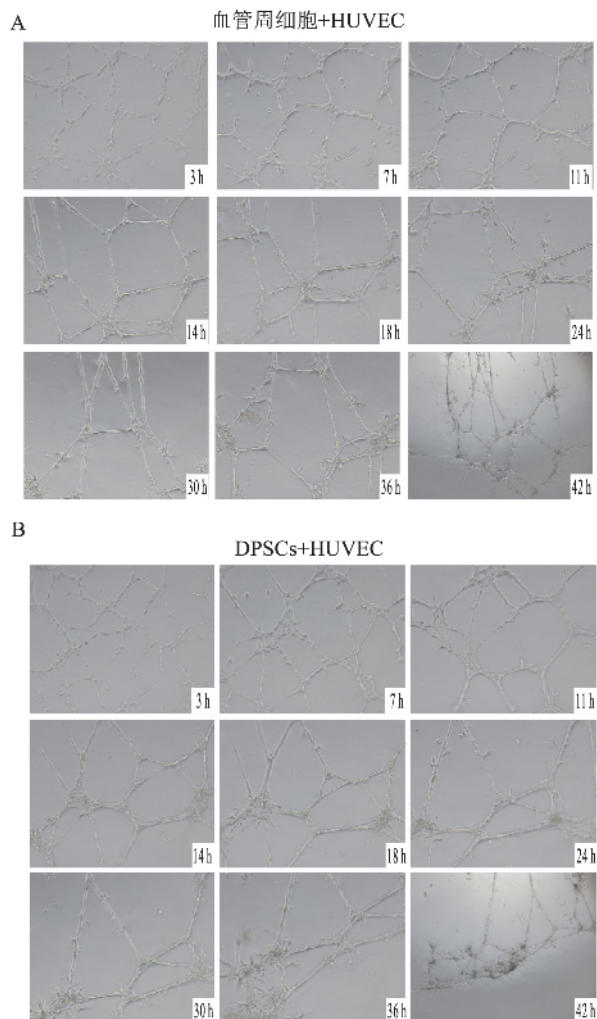


图4 体外 Matrigel 成血管实验结果 ×10
A: 血管周细胞 + HUVEC; B: DPSCs + HUVEC

2.4 迁移功能 DPSCs 和血管周细胞与 HUVEC 在 Transwell 孵育 12 h 后, 上室中各实验组均有一定数量的 HUVEC 进入下室, 表明 DPSCs 和血管周细胞对 HUVEC 均有较强的趋化作用, 两者间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图5)。

3 讨论

血管周细胞是血管结构的重要组成部分, 也称为壁细胞, 嵌入在小血管、毛细血管和微血管的基底膜中^[5] 在促进血管新生方面起着重要的作用, 如稳定血管结构和刺激血管生成^[6]。并且血管周细

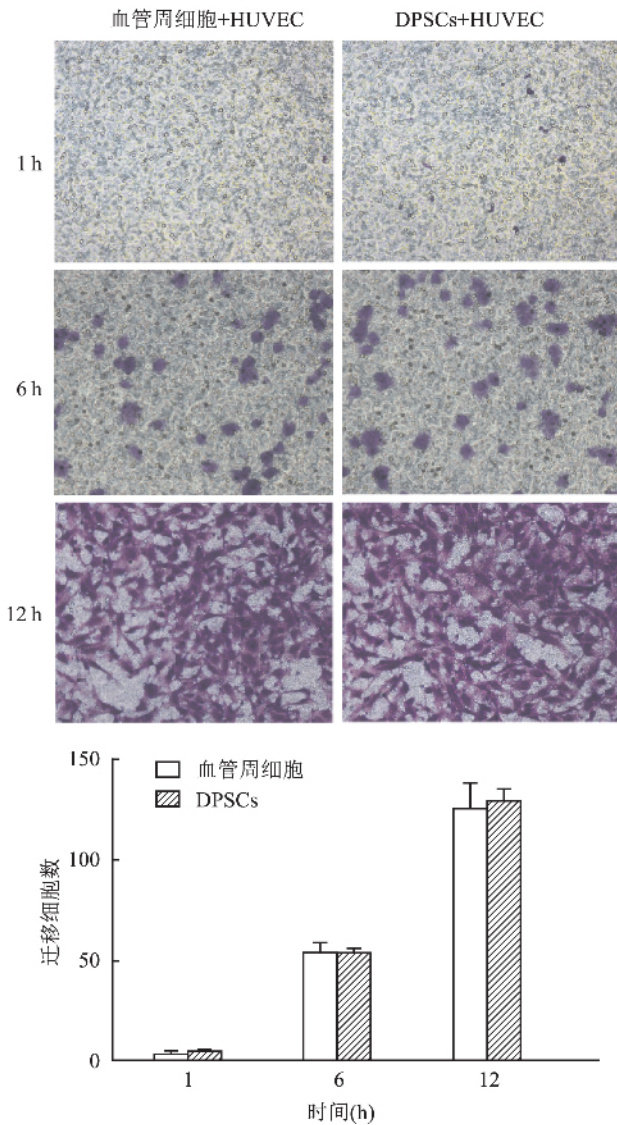


图5 血管周细胞和 DPSCs 对 HUVEC 迁移行为的影响 ×20

胞已被证明可分化为各种谱系,如肌纤维、成牙骨质细胞样细胞、脂肪细胞和软骨细胞等^[7-9]。血管周细胞的多能分化能力和血管生成潜能使其成为细胞治疗的潜在候选细胞,但目前血管周细胞的分离仍然具有挑战性。2000年,Gronthos et al^[10]首次从牙髓组织中成功分离出 DPSCs,并进一步证明了 DPSCs 具有自我更新和多向分化的潜能,可以被诱导分化为骨、软骨、肌肉、血管内皮等多种细胞类型。研究发现 DPSCs 能分泌多种成血管因子,用 DPSCs 培养液培养内皮细胞可促进内皮细胞的迁移能力以及成血管能力^[11-12]。有学者对 DPSCs 进行成血管诱导,发现 DPSCs 可分化为内皮样细胞,在体外可形成血管样结构^[13-14]。另外,颅面血管周细胞和 DPSCs 均起源于颅神经嵴,DPSC 的解剖位置和发育起源与周细胞相似。Shi et al^[15]研究表明,大部分

DPSCs 表达血管周细胞标志物 3G5,也证实了它们与血管周细胞的相似性。所有这些证据提示是不是可以用来来源充足、获取容易的 DPSCs 作为血管周细胞的替代物。本研究从临床上获得牙髓组织,体外分离培养得到 DPSCs,并对细胞进行验证,流式细胞仪检测显示 CD105 +、CD73 +、CD90 +、CD29 +、CD44 + 及 CD34 -、CD45 -,与间充质干细胞的表达一致。在细胞形态学方面,比较了 DPSCs 和血管周细胞后发现两种细胞均呈梭形,贴壁生长,形态无明显差异。本课题组还研究了两种细胞的分化能力,发现 DPSCs 和血管周细胞均能向成骨细胞和神经细胞分化。Matrigel 胶成血管实验是一种常应用于血管内皮细胞功能的成血管研究的体外模型。本研究在 Matrigel 上将血管周细胞或 DPSCs 与 HUVEC 共培养,两组共培养均观察到有明显的血管形成,且维持较长时间,验证了 DPSCs 同样也具有显著的促成血管能力。在此基础上,通过 Transwell 实验进一步研究 DPSCs 对血管内皮细胞的趋化作用。Transwell 趋化实验是将被趋化细胞接种在上室内,通过小室底部的通透性膜,下层培养液中的成分可以作用到上室内的细胞,以此研究下层物质对细胞迁移的作用。将 HUVEC 分别和血管周细胞、DPSCs 两种细胞同时培养于 Transwell 的上下室,培养 12 h 后,可以清楚观察到两组 HUVEC 的迁移。初步证明了 DPSCs 对 HUVEC 也有显著的趋化作用。而血管内皮细胞的迁移对于新生血管形成是至关重要的。

综上所述,本研究从细胞分化、趋化和促成血管能力等多个角度,对 DPSCs 和血管周细胞进行比较,提示 DPSCs 和周细胞具有相似的功能,为临床上 DPSCs 作为血管周细胞的替代提供了理论依据。

参考文献

[1] Teichert M, Milde L, Holm A et al. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation [J]. Nat Commun, 2017, 8: 16106.
 [2] Ozen I, Boix J, Paul G. Perivascular mesenchymal stem cells in the adult human brain: a future target for neuroregeneration [J]. Clin Transl Med, 2012, 1(1): 30.
 [3] Covas D T, Panepucci R A, Fontes A M et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146 + perivascular cells and fibroblasts [J]. Exp Hematol, 2008, 36(5): 642-54.
 [4] Panina Y A, Yakimov A S, Komleva Y K et al. Plasticity of adipose tissue-derived stem cells and regulation of angiogenesis [J].

- Front Physiol, 2018, 9: 1656.
- [5] van Dijk C G, Nieuweboer F E, Pei J Y, et al. The complex mural cell: pericyte function in health and disease [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 190: 75–89.
- [6] Harrell C R, Simovic Markovic B, Fellabaum C, et al. Molecular mechanisms underlying therapeutic potential of pericytes [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 21.
- [7] Tawonsawatruk T, West C C, Murray I R, et al. Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing—non-union [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22779.
- [8] Minutti C M, Modak R V, Macdonald F, et al. A macrophage–pericyte axis directs tissue restoration *via* amphiregulin-induced transforming growth factor beta activation [J]. *Immunity*, 2019, 50(3): 645–54.
- [9] Yianni V, Sharpe P T. Perivascular-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(10): 1066–72.
- [10] Gronthos S, Mankani M, Brahmet J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25): 13625–30.
- [11] Dissanayaka W L, Hargreaves K M, Jinet L, et al. The interplay of dental pulp stem cells and endothelial cells in an injectable peptide hydrogel on angiogenesis and pulp regeneration *in vivo* [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(3–4): 550–63.
- [12] 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): 803–12.
- [13] Aksel H, Huang G T. Human and swine dental pulp stem cells form a vascularlike network after angiogenic differentiation in comparison with endothelial cells: A quantitative analysis [J]. *J Endod*, 2017, 43(4): 588–95.
- [14] Martínez-Sarrà E, Montori S, Gil-Recio C, et al. Human dental pulp pluripotent-like stem cells promote wound healing and muscle regeneration [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 175.
- [15] Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(4): 696–704.

Comparison of the properties of dental pulp stem cells and perivascular cells

Wu Wenjing, Ding Ruyuan, Zhang Jing, et al

(*Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Oral Diseases Research, Hefei 230032*)

Abstract Objective To compare the related properties of human dental pulp stem cells (DPSCs) and pericytes, and to investigate whether DPSCs can be used to replace pericytes for vascular regeneration. **Methods** DPSCs and pericytes were induced into osteogenesis and neurogenic differentiation *in vitro* to identify the multidirectional differentiation potential. Matrigel three-dimensional culture technique was used to evaluate the ability of DPSC and pericytes to stabilize vascular-like structure. Transwell assay was performed to evaluate the induced capacities of DPSCs and pericytes on the migration behavior of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Results** DPSCs and pericytes showed similar morphology and could differentiate into osteogenic and neurogenic cells after induction. The two kinds of cells co-cultured with HUVEC on the Matrigel could establish stable vascular-like structure. In Transwell assay, DPSC and pericytes showed strong induced capacities on the migration behavior of HUVEC. **Conclusion** DPSCs have similar morphological and functional characteristics to pericytes and can be used for vascular regeneration.

Key words pericytes; dental pulp stem cells; cell migration; vascular formation; differentiation