

DMOG 对人牙周膜干细胞成骨分化和成血管能力影响的体外研究

张璐^{1,2}, 许敏^{1,2}, 李汉青^{1,2}, 王芳^{1,2}, 何家才^{1,2}

摘要 目的 探讨二甲氧已二酰甘氨酸(DMOG)对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)体外成骨分化和成血管能力的影响。方法 采用组织块法分离培养 hPDLSCs,应用流式细胞仪进行鉴定。给予 0、0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 处理,MTT 法分析 DMOG 对 hPDLSCs 增殖能力和细胞活力影响,RT-PCR 检测核心结合因子 2(RUNX2)、碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OCN)、血管内皮生长因子(VEGF)基因 mRNA 表达,Western blot 法检测低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、VEGF 蛋白表达。成骨诱导 14 d 后行 ALP 染色及茜素红染色。结果 从人牙周膜组织中分离培养的细胞经鉴定为 hPDLSCs。MTT 结果显示,DMOG 可呈剂量依赖性地抑制 hPDLSCs 的增殖($P < 0.05$),DMOG 能提高缺氧条件下 hPDLSCs 的细胞活力($P < 0.05$)。RT-PCR 和 Western blot 结果显示,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 可显著上调 RUNX2、ALP、OCN 基因 mRNA 表达($P < 0.05$),而 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 可显著上调 VEGF 基因 mRNA 和 HIF-1 α 、VEGF 蛋白水平的表达($P < 0.05$)。ALP 和茜素红染色显示,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 可显著促进 hPDLSCs 成骨分化中 ALP 的表达和钙结节的形成。结论 DMOG 通过上调 HIF-1 α 的表达,促进 hPDLSCs 的成骨分化和成血管能力。

关键词 二甲氧已二酰甘氨酸;人牙周膜干细胞;低氧诱导因子-1 α ;成骨分化;成血管能力

中图分类号 R 318

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1178-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.005

目前由于严重的创伤、炎症、肿瘤切除等因素导致的颌骨缺损的治疗面临巨大挑战,而自体骨和异体骨在临床应用受限,运用基因工程技术修复骨缺

损成为当前研究热点^[1]。低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible-1 α , HIF-1 α)是一种低氧条件下被激活的转录因子,能调控细胞的增殖、分化和多种基因的表达,但常氧下易降解^[2]。有研究^[3]证实 HIF-1 α 基因转染的骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有更好的成骨成血管能力,改善骨的修复与再生,然而其潜在风险阻碍了临床应用。二甲氧已二酰甘氨酸(dimethylolallylglycine, DMOG)是人工合成的小分子脯氨酰羟化酶抑制剂,能够稳定常氧下 HIF-1 α 的表达^[4],因此作为一种新的替代方案,有希望安全应用于临床。鉴于此,该实验运用 DMOG 探讨其对牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)体外成骨分化和成血管能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS)(浙江天航生物科技有限公司);胰酶消化液、RIPA 裂解液、蛋白浓度测定试剂盒、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);PBS 缓冲剂(美国 Solarbio 公司);DMOG(美国 Selleck 公司);PCR 引物(上海生物工程股份有限公司);逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);茜素红(美国 Sigma 公司);HIF-1 α 兔单克隆抗体(美国 CST 公司);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)小鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),山羊抗鼠/兔二抗(北京中杉金桥公司);PVDF 膜(美国 Invitrogen 公司);CO₂ 恒温孵箱(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司);酶标仪(美国 Bio-tek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hPDLSCs 体外分离培养 收集 12~28 岁因正畸减数需要拔除的牙体牙周均健康的前磨牙,在超净工作台内,无菌条件下,将牙齿牙冠向下用含 3 倍双抗的 PBS 反复冲洗。用无菌刀片刮取牙根中

2018-04-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371114、81771117);安徽省自然科学基金(编号:1408085MKL29);安徽省科技攻关计划项目(编号:1604a0802082)

作者单位:¹ 安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医学院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:张璐,女,硕士研究生;

何家才,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:hejiacai@163.com

三分之一的牙周膜组织,剪成约 1 mm^3 的小块,以 5 mm 间隔铺于 6 孔板皿底,加入少量 DMEM 培养液(含 20% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱 4~6 h 待组织块贴壁,加入上述 DMEM 培养液 2 ml。每 3~5 d 换液 7~15 d 左右当细胞从组织块周围爬出并达孔底 60% 左右时,用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.2 流式细胞术检测 hPDLSCs 表面标志物 取第 3 代 hPDLSCs,0.25% 胰酶消化,PBS 洗 3 遍,调整密度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 的单细胞悬液,分装到 EP 管中,每管 0.2 ml。分别加入 CD34-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC、CD90-APC、CD105-PE、CD146-PE 抗体和阴性对照 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 60 min,PBS 洗 3 遍后重悬,用流式细胞仪检测。

1.2.3 MTT 法检测 hPDLSCs 增殖能力与细胞活力

取对数生长期的 hPDLSCs,以 $4 \times 10^3/\text{孔}$ 的密度接种于 96 孔板,次日细胞贴壁后,加入不同浓度的 DMOG (0、0.1、1、10、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)。于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别培养 24、48、72 h,弃上清液,每孔加入 100 μl 标准培养基(不含血清的 DMEM 培养基)和 20 μl 浓度 5 g/L 的 MTT $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 4 h,弃孔内上清液,每孔加入 150 μl 的 DMSO 溶液,待甲臞充分溶解后,在酶标仪上测定 490 nm 处的吸光度值,每组设 5 个复孔。

1.2.4 Western blot 检测 取对数生长期的 hPDLSCs,以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞贴壁至皿底 80%,加入不同浓度的 DMOG (0、0.1、1、10、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$),分别于 12、24、72 h 后,提取各组细胞总蛋白。BCA 测定试剂盒测定各组蛋白浓度,调整各组浓度一致,99 $^\circ\text{C}$ 、10 min 使蛋白变性,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,然后转移到 0.45 μm 的 PVDF 膜上,5% BSA 封闭液室温下封闭 1 h,分别加抗 HIF-1 α (1:1 000)、抗 VEGF (1:800)、抗 β -actin (1:1 000) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,相应二抗 1:5 000 室温孵育 1 h,经 ECL 曝光成像。

1.2.5 RT-PCR 检测 取对数生长期的 hPDLSCs,以 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板,待细胞贴壁,实验组加入不同浓度的 DMOG (0、0.1、1、10、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$),分别于 1、3、7、14 d 提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR 定量检测核心结合因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、VEGF 基因表达水平。按 TRIzol 试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA,使用 PrimeScriptTM-PCR kit 逆转录试

剂盒合成 cDNA,以此为模板,用目的基因的引物进行扩增和检测。每个样品设置 3 个复孔,PCR 所有引物由上海生工生物工程公司设计合成,引物序列见表 1。

1.2.6 ALP 染色 取对数生长期的 hPDLSCs,以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种于 12 孔板,次日更换为不同浓度 DMOG 的成骨诱导分化培养基,每 3 d 换液,分别于成骨诱导培养 14 d 后,加入 One-StepTM NBT/BCIP 溶液 (PIERCE) 染色,拍照。

1.2.7 茜素红染色 同 1.2.6 方法培养细胞,14 d 时弃培养基,4% 多聚甲醛固定 30 min,蒸馏水洗 3 次,2% 茜素红染液染色 30 min,双蒸水冲洗,观察拍照,每孔加入 0.5 ml 10% 的氯化十六烷基吡啶,室温下待结节完全溶解,吸取上清液,在酶标仪上测定 562 nm 处的吸光度值。

表 1 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
RUNX2	F:GGACGAGGCAAGAGTTTCAC	105
	R:TTCCCGAGGTCCATCTACTG	
ALP	F:AGAATCTGGTGCAGGAATGG	122
	R:AGGCTCAAAGACCCCATGA	
OCN	F:GGCGCTACCTGTATCAATGG	113
	R:GATGTGGTCAGCCAACTCGT	
VEGF	F:CTACCTCCACCATGCCAAGT	121
	R:CTCGATTGGATGGCAGTAGC	
GAPDH	F:ACCCAGAAGACTGTGGATGG	125
	R:TTCAGCTCAGGGATGACCTT	

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPDLSCs 体外分离培养与鉴定 采用组织块法分离培养 hPDLSCs,约 7~15 d 可观察到有细胞从组织块周围爬出,细胞多呈长梭形并呈放射状排列,见图 1。流式细胞术检测结果显示,hPDLSCs 表

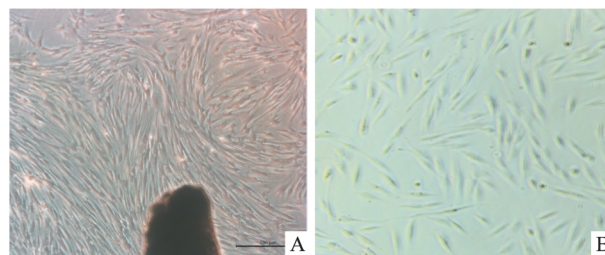


图 1 hPDLSCs 体外培养 $\times 100$
A:体外原代培养第 10 天;B:第二代 hPDLSCs

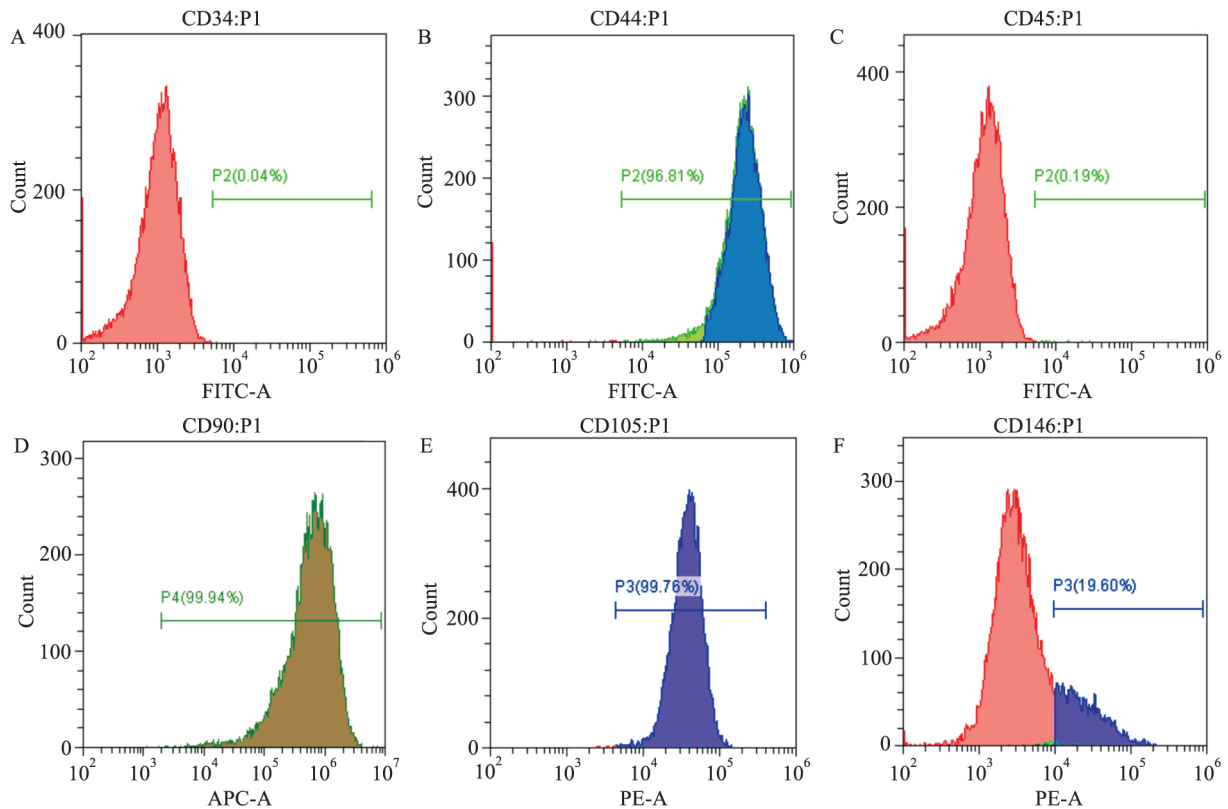


图2 流式细胞术检测细胞表面标志物

A: CD34; B: CD44; C: CD45; D: CD90; E: CD105; F: CD146

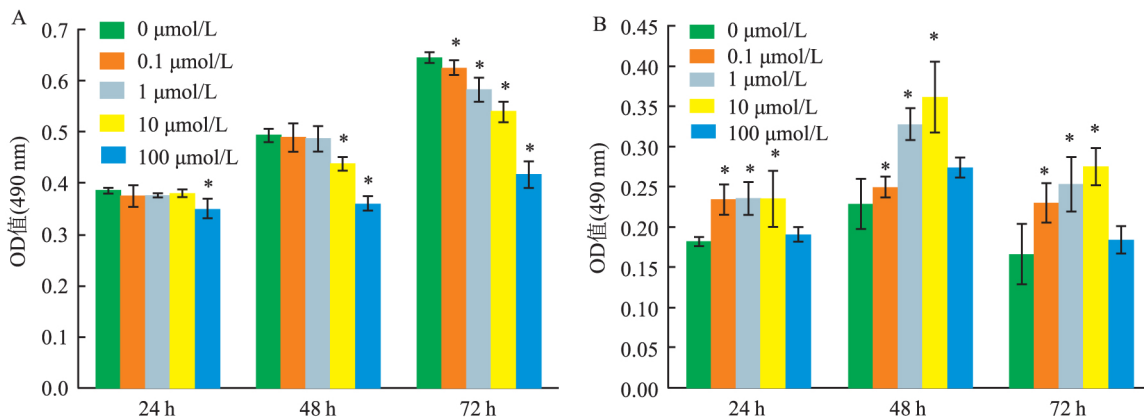


图3 MTT 法检测 DMOG 对 hPDLSCs 增值能力和细胞活力的影响

A: 基础培养; B: 缺血清培养; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

面抗原 CD44、CD90、CD105、CD146 呈阳性 ,CD34、CD45 呈阴性 见图 2。

2.2 DMOG 对 hPDLSCs 增值能力和细胞活力的影响 MTT 结果显示:在基础培养基中,与空白对照组比较,培养 72 h,0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组对 hPDLSCs 的增殖有明显抑制作用,差异有统计学意义($F = 103.991, P < 0.05$),且这种抑制具有剂量依赖性($P < 0.05$)。在缺血清培养基中,与空白对照组比较,培养 72 h,0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 的

DMOG 组 hPDLSCs 的细胞活性明显提高,差异有统计学意义($F = 10.722, P < 0.05$),100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组无明显差异,表明缺血清条件下,一定浓度范围的 DMOG 对 hPDLSCs 的细胞活力具有保护作用,见图 3。

2.3 Western blot 检测 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白水平的表达 Western blot 结果显示:空白对照组 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达水平较低,在 DMOG 的作用下,表达水平明显增加,见图 4。

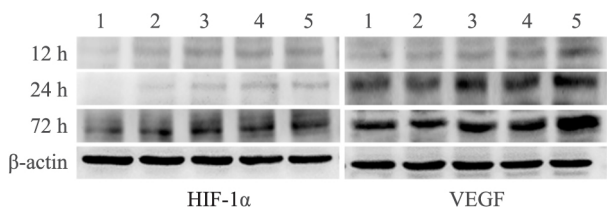


图4 Western blot 检测 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白水平的表达

1:0 $\mu\text{mol/L}$ 组;2:0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组;3:1 $\mu\text{mol/L}$ 组;4:10 $\mu\text{mol/L}$ 组;5:100 $\mu\text{mol/L}$ 组

2.4 DMOG 对 hPDLSCs 成骨分化和成血管相关基因表达的影响 RT-PCR 分别检测 1、3、7、14 d 成骨成血管相关基因 Runx2、ALP、OCN、VEGF 的相对表达水平。结果表明:与空白对照组比较,DMOG 处理的 hPDLSCs 在 3 ~ 14 d 时 Runx2 的表达水平缓慢增加 ($F = 9.129, 38.657, 1802.759, P < 0.05$);ALP 和 OCN 在 14 d 时基因表达水平明显增加,其中 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组 ALP、OCN 基因相对于空白对照组表达分别为 (6.597 ± 0.682) ($F = 68.527, P < 0.05$)、(2.956 ± 0.0425) ($F = 913.618, P < 0.05$), 而 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组成骨相关基因表达水平

较低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);VEGF 在 1 d 时表达水平明显增加并持续到 14 d,且 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组表达水平最高 ($F = 33.487, P < 0.05$), 见图 5。

2.5 ALP 染色及茜素红染色 成骨诱导培养 14 d,ALP 染色结果显示:与空白对照组比较,0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组 ALP 活性明显增高,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组明显降低;茜素红染色结果显示:与空白对照组比较,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组无明显差异,1、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组钙结节生成量明显增多,半定量分析显示分别为空白对照组的 1.6 倍和 2.1 倍,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMOG 组较空白对照组钙结节生成明显减少,差异有统计学意义 ($F = 317.612, P < 0.05$), 见图 6、7。

3 讨论

Seo et al^[5] 首次从人的牙周膜组织中成功分离出 hPDLSCs,因具有多向分化潜能和克隆形成能力,成为牙周再生最理想的种子细胞。近年来随着研究

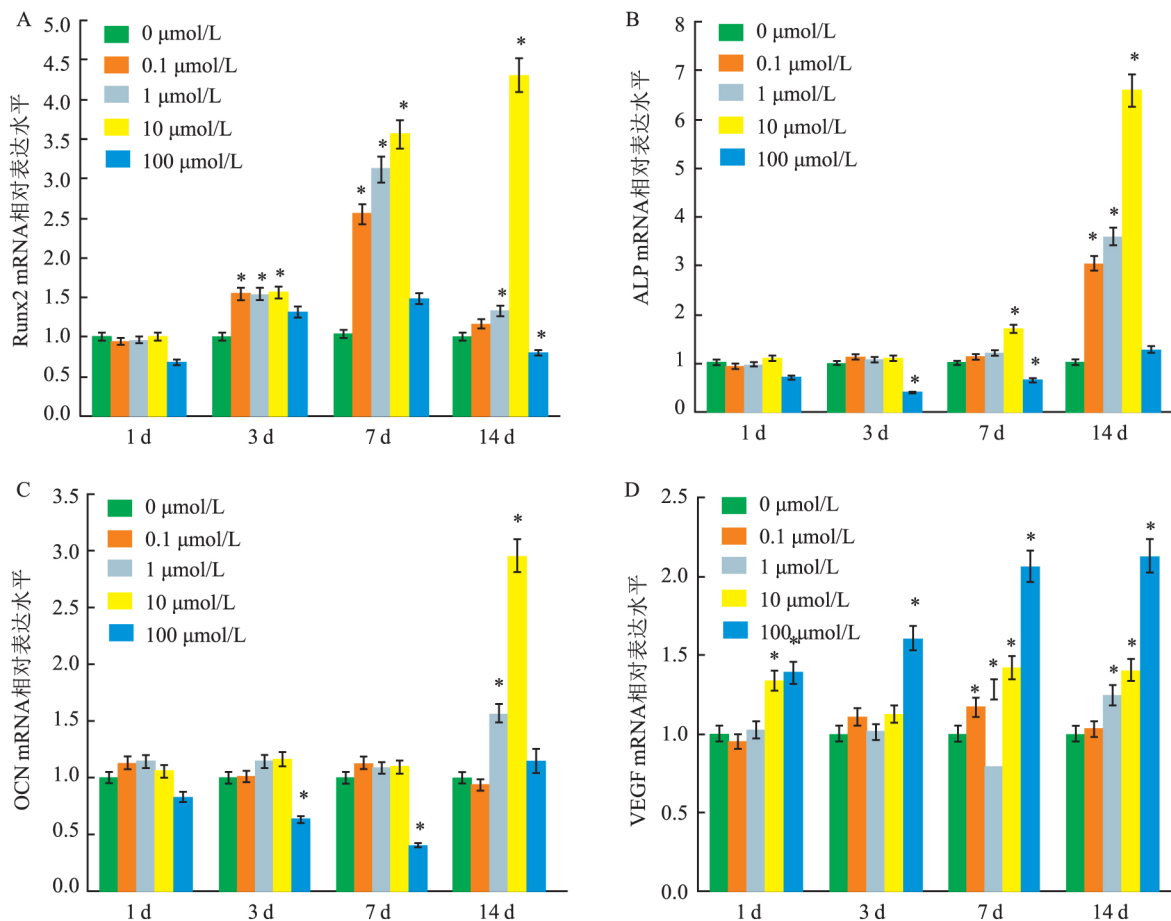


图5 RT-PCR 检测成骨分化和成血管相关基因表达

A: Runx2; B: ALP; C: OCN; D: VEGF; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$

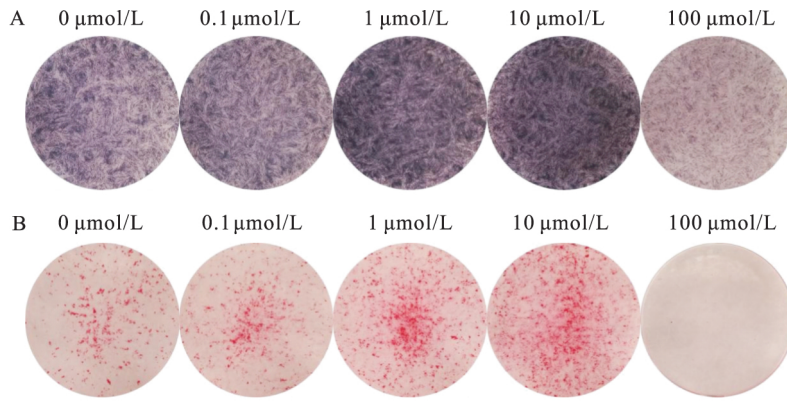


图6 ALP染色及茜素红染色
A: ALP染色; B: 茜素红染色

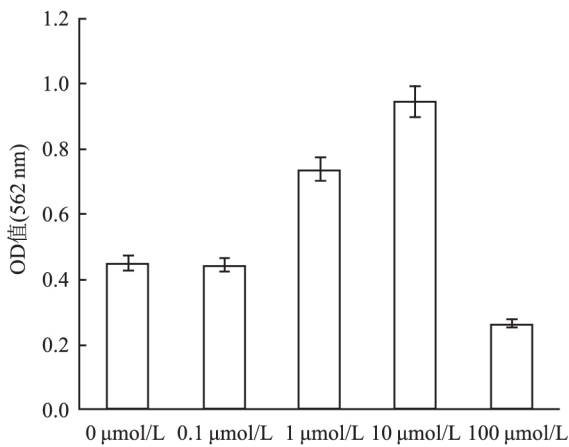


图7 茜素红染色的半定量分析

的深入，hPDLSCs 在骨修复再生、神经损伤修复等方面有了突破性进展^[6-7]，与 BMSCs 比较，避免骨穿带来的损伤和痛苦，临床操作方便，使 hPDLSCs 在组织工程技术中拥有巨大的运用前景。本实验采用组织块法分离培养 hPDLSCs，流式细胞术检测结果显示间充质干细胞表面抗原 CD44、CD90、CD105 表达为高度阳性，造血干细胞表面抗原的 CD34、CD45 为高度阴性，这表明所培养的细胞符合体干细胞的特性，为后续实验奠定了基础。

HIF-1α 是一个对氧分子敏感的复合体，在正常氧分压下，HIF-1α 亚基被脯氨酰羟化酶 (prolyl-hydroxylase, PHD) 羟基化而降解；在低氧条件下，PHD 被抑制，HIF-1α 与 HIF-1β 结合形成复合体，激活下游近百种靶基因的表达，调节细胞的增殖、分化等活动^[8]，而且 HIF-1α 可以诱导 VEGF 高表达，VEGF 促进新血管形成，进而为骨缺损区输送大量与成骨相关的生长因子，增加骨修复与再生能力^[9]。DMOG 作为一种小分子酮戊二酸类似物，通

过与内源性的 2-酮戊二酸竞争从而抑制 PHD，稳定 HIF-1α 表达，已被证实 DMOG 具有神经保护、能促进缺血疾病的血管再生和促进间充质干细胞的成骨分化作用^[10-12]。本实验给予不同浓度 DMOG 处理 hPDLSCs，探索 DMOG 对 hPDLSCs 成骨分化和成血管能力的影响。MTT 结果显示 DMOG 对 hPDLSCs 缺血清损伤具有保护作用，且 10 μmol/L 的 DMOG 作用最显著。有研究^[13]显示，90% 的间充质干细胞在移植体内的第 1 天死亡，只有少数能存活，因此可以认为 DMOG 可能提高 hPDLSCs 在体内移植部位的存活率。Western blot 检测结果显示，常氧状态下，HIF-1α 易降解，对照组表达较低，DMOG 处理组明显增加，表明 DMOG 能有效地抑制 HIF-1α 的降解，使其在细胞内稳定表达；VEGF 表达也显著增加，且具有浓度依赖性，VEGF 缓慢持续释放被认为是新血管形成的关键^[14]，因此，DMOG 能通过提高 hPDLSCs 成血管能力间接改善骨修复能力。间充质干细胞成骨分化始于前体成骨细胞，进而分化为成熟的成骨细胞，研究^[15]显示，Runx2 是间充质干细胞成骨分化的关键因子，能调节间充质干细胞向前体成骨细胞分化过程中所必须的非胶原蛋白（如 OCN），也是骨形成过程中最早和最具特异性的标志基因；ALP 是成骨细胞分化的早期标志物，并参与成骨细胞的钙盐沉积。因此，本实验通过检测 Runx2、ALP、OCN 的表达来探索 hPDLSCs 的成骨分化，RT-PCR 结果显示随着 DMOG 浓度的提高 hPDLSCs 的成骨分化能力逐渐增加，10 μmol/L 时增加最显著，但当浓度达到 100 μmol/L 时，成骨分化能力明显被抑制，与 ALP 染色和茜素红染色结果相一致，这可能与 DMOG 显著抑制细胞增殖有关，具体机制仍需进一步探究。

参考文献

- [1] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions [J]. *J Orthop Surg Res* 2014 9(1):18.
- [2] Riddle R C, Khatri R, Schipani E, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic-osteogenic coupling [J]. *J Mol Med (Berl)* 2009 87(6):583-90.
- [3] Zou D, Zhang Z, Ye D, et al. Repair of critical-sized rat calvarial defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Stem Cells* 2011 29(9):1380-90.
- [4] Bernhardt W M, Gottmann U, Doyon F, et al. Donor treatment with a PHD inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogeneic kidney transplant model [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 106(50):21276-81.
- [5] Seo B M, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet* 2004 364(9429):149-55.
- [6] Diomedea F, Zini N, Gatta V, et al. Human periodontal ligament stem cells cultured onto cortico-cancellous scaffold drive bone regenerative process [J]. *Eur Cell Mater* 2016 32:181-201.
- [7] Li B, Jung H J, Kim S M, et al. Human periodontal ligament stem cells repair mental nerve injury [J]. *Neural Regen Res* 2013 8(30):2827-37.
- [8] Evans C E, Humphries J, Mattock K, et al. Hypoxia and upregulation of hypoxia-inducible factor 1 α stimulate venous thrombus recanalization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 30(12):2443-51.
- [9] Voellenkle C, van Rooij J, Guffanti A, et al. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs [J]. *RNA* 2012 18(3):472-84.
- [10] Milkiewicz M, Pugh C W, Egginton S. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice [J]. *J Physiol* 2004 560:21-6.
- [11] Nagel S, Papadakis M, Chen R, et al. Neuroprotection by dimethylxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011 31(1):132-43.
- [12] Ding H, Gao Y S, Wang Y, et al. Dimethylxalylglycine increases the bone healing capacity of adipose-derived stem cells by promoting osteogenic differentiation and angiogenic potential [J]. *Stem Cells Dev* 2014 23(9):990-1000.
- [13] Tang Y L, Tang Y, Zhang Y C, et al. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector [J]. *J Am Coll Cardiol* 2005 46(7):1339-50.
- [14] Elçin Y M, Dixit V. Extensive *in vivo* angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing [J]. *Artificial Organs* 2001 25(7):558-65.
- [15] Miron R J. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards [J]. *J Dent Res* 2012 91(8):736-44.

Effect of dimethylxalylglycine on osteogenic differentiation and angiogenesis of human periodontal ligament stem cells *in vitro*

Zhang Lu^{1,2}, Xu Min^{1,2}, Li Hanqing^{1,2}, et al

(¹Stomatologic College of Anhui Medical University Hefei 230032; ²The Affiliated Stomatologic Hospital of Anhui Medical University Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of DMOG on osteogenic differentiation and angiogenesis of hPDLSCs *in vitro*. **Methods** hPDLSCs was isolated and cultured by tissue block method and identified by flow cytometry. hPDLSCs was treated with DMOG of 0, 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{mol/L}$ effect of DMOG on proliferation and cell viability of hPDLSCs by MTT assay. The expression level of RUNX2, ALP, OCN, VEGF gene were detected by Real time-PCR and Western blot were used to detect protein levels of HIF-1 α and VEGF. After 14 days of osteogenic induction, alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining were performed. **Results** The cells isolated from human periodontal ligament tissues were identified as hPDLSCs. MTT results showed that DMOG inhibited proliferation of hPDLSCs in a dose-dependent manner and increased cell viability in serum deficient state ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blot showed that the expression of 10 $\mu\text{mol/L}$ DMOG group significantly increased RUNX2, ALP, OCN mRNA expression ($P < 0.05$); 100 $\mu\text{mol/L}$ DMOG group significantly up-regulated the expression of VEGF mRNA and HIF-1 α , VEGF protein ($P < 0.05$). ALP and alizarin red staining showed that 10 $\mu\text{mol/L}$ DMOG group could significantly promoted the expression of ALP and the formation of calcium nodules in osteogenic differentiation of hPDLSCs. **Conclusion** DMOG promotes the osteogenic differentiation and angiogenesis of hPDLSCs by up-regulating the expression of HIF-1 α .

Key words dimethylxalylglycine; human periodontal membrane stem cells; hypoxia inducible factor -1 alpha; osteogenic differentiation; angiogenesis