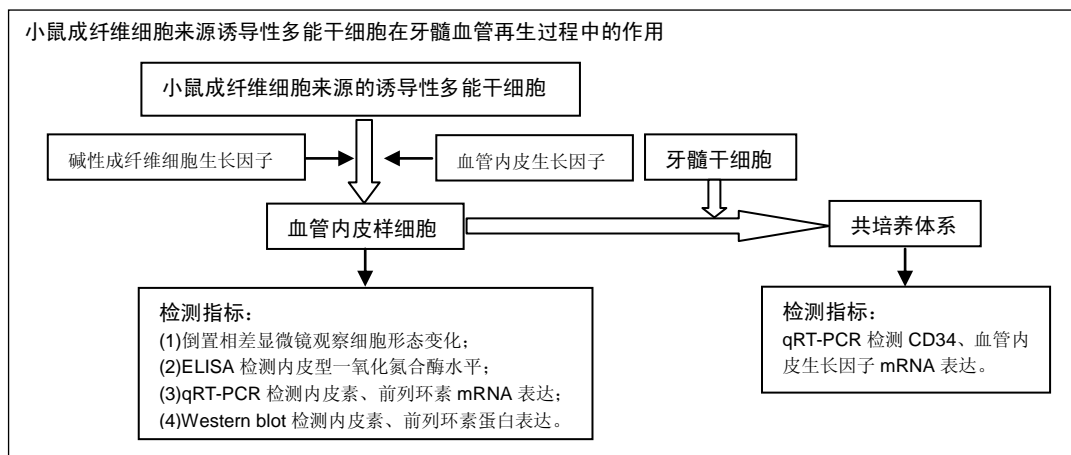


# 成纤维细胞来源诱导性多能干细胞定向分化为血管内皮样细胞及与牙髓干细胞的共培养

吕继忠(菏泽医学专科学校口腔教研室, 山东省菏泽市 274000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0902 ORCID: 0000-0003-2767-2248(吕继忠)

文章快速阅读:



吕继忠, 菏泽医学专科学校口腔教研室, 山东省菏泽市 274000

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-06-02



## 文题释义:

**诱导性多能干细胞:** 是近年来通过将成体细胞重编程而获得的能分化成多种器官和组织细胞的多能干细胞, 类似于胚胎干细胞和成体干细胞, 但不涉及伦理问题, 来源不受限制且更容易诱导定向分化, 可以实现自体细胞移植, 在再生医疗领域具有更广阔的应用前景。

**恒牙牙髓血管再生:** 萌出时间较短的牙齿在形态结构上尚未发育完全被定义为年轻恒牙, 创伤、龋病和畸形等因素均可导致牙髓感染、变性甚至坏死, 严重影响恒牙牙根的正常发育成熟。牙髓血管再生术已经应用于临床治疗牙髓坏死, 取得一定疗效。

## 摘要

**背景:** 牙髓的血管重建是为组织工程牙髓再生提供养分与能量供给的重要环节。干细胞的选择和血管内皮样细胞的定向分化已经成为真正实现牙髓再生的重要研究方向。

**目的:** 将小鼠成纤维细胞来源诱导性多能干细胞定向分化为血管内皮样细胞, 探讨其与牙髓干细胞共培养促进血管新生的可行性。

**方法:** ①采用酶消化法制备小鼠睾丸支持细胞饲养层; ②外源添加血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子诱导小鼠皮肤成纤维细胞来源诱导性多能干细胞定向分化为血管内皮样细胞并进行鉴定; ③建立血管内皮样细胞与牙髓干细胞共培养体系, 荧光实时定量 PCR 检测 CD34、血管内皮生长因子 mRNA 的表达。

**结果与结论:** ①诱导分化 14 d 后倒置显微镜下观察到细胞形态改变, 呈现血管内皮形态; ②流式细胞术鉴定诱导分化细胞 CD31 阳性, 呈现内皮细胞表型; ③诱导分化 14 d 后, 培养液上清中内皮型一氧化氮合酶水平明显高于未分化细胞( $P < 0.01$ ); ④诱导分化 14 d 后, 与未分化对照组相比, 实验组细胞内皮素表达增高( $P < 0.01$ ), 前列环素表达降低( $P < 0.01$ ); ⑤血管内皮样细胞与牙髓干细胞共培养 5 d 后, 与血管内皮样细胞单独培养组相比, 共培养组 CD34 和血管内皮生长因子表达增高( $P < 0.01$ ); ⑥结果表明, 小鼠成纤维细胞来源的诱导性多能干细胞可以定向分化为血管内皮样细胞, 与牙髓干细胞共培养后有形成血管的倾向。

## 关键词:

牙髓坏死; 牙髓血管再生; 诱导性多能干细胞; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 内皮细胞; 血管内皮生长因子; 牙髓干细胞; 干细胞

## 主题词:

诱导多功能干细胞; 内皮细胞; 牙髓; 干细胞; 组织工程

## 缩略语:

诱导性多能干细胞: induced pluripotent stem cells, iPSCs

## Fibroblasts-derived induced pluripotent stem cells in pulp revascularization: differentiation into vascular endothelial cells and co-culture with dental pulp stem cells

Lü Ji-zhong, Department of Stomatology, Heze Medical College, Heze 274000, Shandong Province, China

Lü Ji-zhong (Department of Stomatology, Heze Medical College, Heze 274000, Shandong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Dental pulp vascularization is an important process to provide nutrients and energy for the dental pulp regeneration. The choice of stem cells and their directional differentiation into vascular endothelial cells have become an important issue of research in the pulp regeneration.

**OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of mouse fibroblasts-derived induced pluripotent stem cells differentiating into vascular endothelial cells and forming new blood vessels by co-culture with dental pulp stem cells.

**METHODS:** (1) The feeder layer of mouse Sertoli cells was prepared by enzyme digestion. (2) Mouse fibroblasts-derived induced pluripotent stem cells were induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor to differentiate into vascular endothelial cells, and differentiated cells were then identified. (3) The co-culture system of vascular endothelial cells and dental pulp stem cells was established. Real-time fluorescence quantitative real-time PCR was used to detect mRNA expression of CD34 and vascular endothelial growth factor in the two groups.

**RESULTS AND CONCLUSION:** After 14 days of induced differentiation, the morphology of the vascular endothelium was visible under the inverted microscope. Flow cytometry results showed the differentiated cells were positive for CD31, indicating the phenotype of endothelial cells. Compared with the control group, the expression of endothelin and endothelial nitric oxide synthase increased ( $P < 0.01$ ), and the expression of prostacyclin decreased in the co-culture group at 14 days of induced differentiation ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the expression of CD34 and vascular endothelial growth factor increased at 5 days of co-culture ( $P < 0.01$ ). These findings indicate that mouse fibroblasts-derived induced pluripotent stem cells can directionally differentiate into vascular endothelial cells and form new blood vessels by co-culture with dental pulp stem cells.

**Subject headings:** Induced Pluripotent Stem Cells; Endothelial Cells; Dental Pulp; Stem Cells; Tissue Engineering

## 0 引言 Introduction

牙髓是维持牙齿内环境稳态的惟一富含血管的结缔组织, 在发生不可逆炎症感染时只能去除牙髓, 而失去牙髓的牙齿成为死髓牙<sup>[1]</sup>。年轻恒牙的牙髓修复是目前口腔领域研究的热点问题, 尤其是牙髓的血管再生治疗为发生牙髓坏死年轻恒牙的保留带来了希望<sup>[2]</sup>。但研究发现, 牙髓血管再生治疗并没有实现牙髓组织的真正再生, 没有形成牙髓牙本质复合体, 只是在根管内壁和腔面形成牙骨质样、牙髓样和牙周膜样结缔组织, 增加了根管钙化的风险, 并且牙髓坏死清除后牙源性成体干细胞所剩无几, 无法满足牙髓再生需要<sup>[3]</sup>。因此, 选择何种干细胞和如何调控干细胞定向分化为血管内皮细胞, 是实现年轻恒牙牙髓血管再生的重要问题。

目前, 应用于组织工程血管化的内皮细胞来源主要包括胚胎干细胞、成体干细胞和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)<sup>[4]</sup>。然而, 由于供体组织来源的有限性、安全性、致癌性、免疫排斥和伦理问题使胚胎干细胞和成体干细胞的广泛应用受到限制<sup>[5]</sup>。iPSCs 最初是将皮肤成纤维细胞来源的体细胞重编程获得类似于胚胎干细胞特性的多能干细胞, 已有多个实验室在小鼠、大鼠、猴和猪等物种中建立了 iPS 细胞系<sup>[6-9]</sup>。体细胞重编程技术日趋完善, 已成功应用于人类细胞的研究和疾病模型动物的治疗, 具有可操作性和稳定性, 且安全性也在不断提高<sup>[10]</sup>。研究发现, 自体来源的 iPSCs 能分化为多种细胞类型, 可广泛应用于损伤或缺损组织的修复, 并且 iPSCs 在特定的诱导条件可以在体外模拟胚胎发育, 自发分化形成 3 个胚层<sup>[11]</sup>。也有研究表明 iPSCs 更容易被诱导重编程从而完成精确的定向分化, 可明显降低成瘤风险<sup>[12]</sup>。因此, 作者拟在无血清条件下诱导 iPSCs 定向分化为血管内皮样细胞并与牙髓干细胞共培养, 观察促进牙髓血管再生的可行性。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于 2015 年 12 月至 2017 年 2 月在菏泽医学专科学校中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 小鼠成纤维细胞来源 iPSCs 购于上海斯丹赛公司(货号: 0203-001)。

1.3.2 实验动物 8 d 龄清洁级 C57BL/6J 雄性小鼠, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号: SCXK 京 2009-0004。

1.3.3 实验试剂 DMEM 培养基(Gibco, 美国); IV 型胶原酶、胰蛋白酶、透明质酸酶(Sigma, 美国); 血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(Cytokine, 美国); 兔抗内皮素、兔抗前列环素、兔抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体(Santa Cruz, 美国); PrimeScript<sup>®</sup> II High Fidelity RT-PCR 试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix DimerEraser<sup>®</sup> 试剂盒(宝生物, 大连); 小鼠内皮型一氧化氮合酶 ELISA 试剂盒(默沙克, 中国); 标准型 Matrigel(BD, 美国)。

1.3.4 实验仪器 CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo, 美国); 超净工作台(苏州净化设备厂, 中国); DM6000 倒置显微镜(Leica, 德国); 台式高速冷冻离心机(Thermo, 美国); 酶标仪(BioTeK, 美国); 梯度基因扩增仪(Biometra, 德国); Odyssey FC 成像仪(Li-COR Biosciences, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)。

1.4 实验方法

1.4.1 乳鼠睾丸支持细胞分离与饲养层制备 选用 10 只 C57BL/6J 雄性乳鼠, 处死后冰上快速取出双侧睾丸去除被膜, 冰上剪碎加入 0.25% 胰蛋白酶, 37 °C 水浴振荡(80 r/min), 当组织呈悬浮絮状时加入 DMEM 培养基终止消化, 离心(800 r/min)10 min 去上清, 加入 0.1% 透明质酸酶 37 °C 水浴振荡(80 r/min) 消化生精小管至短小片段, 随后加入 0.1% IV 型胶原酶 37 °C 水浴振荡(80 r/min) 至大量细胞团出现, 100 目筛网过滤细胞, 离心(1 000 r/min)5 min 后重悬细胞, 接种于培养瓶进行常规培养。支持细胞完全

贴壁后,用 20 mmol/L 的 Tris-HCl 低渗处理去除生精细胞。将用超纯水以 9 : 1 的比例新鲜配置的即用型胶原滴入细胞培养皿至全部覆盖皿底,37 °C 培养箱中放置 12 h 干燥,制成支持细胞饲养层。

**1.4.2 iPSCs 向血管内皮样细胞定向分化** 实验分为对照组和诱导组。取生长状态良好的第 3 代已鉴定的小鼠皮肤成纤维细胞来源 iPSCs,以  $1 \times 10^5/\text{mm}^2$  的密度将细胞接种于事先准备好的带有支持细胞饲养层的培养皿中,对照组只用 DMEM 培养液培养,诱导组在 DMEM 培养液中加入 20  $\mu\text{g}/\text{L}$  血管内皮生长因子和 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  碱性成纤维细胞生长因子,每 2 d 不完全换液 1 次,两组连续培养 14 d。

**1.4.3 人牙髓干细胞与血管内皮样细胞共培养体系建立** 将事先配制好的 Matrigel 溶液平铺于培养皿底部,37 °C 恒温 30 min 后备用。将牙髓干细胞和诱导生成的血管内皮样细胞制成细胞悬液,以 1 : 1 的比例混合接种至铺胶培养皿底部,常规培养 5 d 后提取细胞进行基因与蛋白检测,对照组为血管内皮样细胞单独培养,实验组为牙髓干细胞与血管内皮样细胞共培养。

## 1.5 主要观察指标

**1.5.1 生化法检测细胞培养上清液中内皮型一氧化氮合酶水平** 在 iPSCs 向血管内皮样细胞定向分化连续培养的 14 d 内,每次换液时将换下的培养液离心取上清液-80 °C 冻存,直到第 14 天收集全部培养液上清,按照说明书操作,酶标仪检测两组培养上清中内皮型一氧化氮合酶水平。

**1.5.2 流式细胞术检测 iPSCs 向血管内皮样细胞定向分化前后 CD31 的表达** 取定向分化培养第 14 天的细胞制成细胞悬液加入抗体孵育 30 min,流式细胞仪检测 CD31 的表达。

**1.5.3 荧光实时定量 PCR 检测分化细胞中内皮素和前列环素 mRNA 的表达和共培养体系中 CD34、血管内皮生长因子 mRNA 的表达** 取定向分化培养第 14 天的细胞和人牙髓干细胞与血管内皮样细胞共培养 5 d 的细胞,冰上 Trizol 法提取 RNA,凝胶电泳判断提取质量,选择质量良好的 RNA 应用试剂盒进行反转录,所得 cDNA 作为模板,应用 SYBR<sup>®</sup> Premix DimerEraser<sup>®</sup> 试剂盒进行扩增反应,绘制扩增曲线和溶解曲线,以 GAPDH 作为对照。

## 基因引物

基因名称	引物序列(5'→3')
内皮素	F TCC TCC TGC TCG TCG CTG ATC GAT AAA GAC
	R TGT CAC ATC ACG CTC TCT GGA GGC CTG
前列环素	F AGG CGC GAC TCA AAA ACA TGC
	R CGT TGT AAG TCG TTC GAC CG
CD34	F CCA ACG CAG GAC ACG TAA TG
	R GCA CAG TCC TCA GCG TTG CA
血管内皮生长因子	F GAA GAA CGA AAC GCC AAG AAA
	R GCC GGC ACG AAG CTA GA C
GAPDH	F GCG CAT CAC CAT CTT CCA G
	R TGA GCG CTT CCA CAA TGC G

**1.5.4 Western blot 检测定向分化细胞中内皮素及前列环素蛋白的表达** 取定向分化培养第 14 天的细胞,加入全细胞裂解液冰上裂解提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,各组蛋白上样,配制 SDS-PAGE 胶进行分离和转膜,3%BSA 室温封闭 1 h,去除封闭液,分别加入 3%BSA 稀释的内皮素(1 : 200)、前列环素(1 : 100)和  $\beta$ -actin 多克隆抗体(1 : 1 000),4 °C 过夜,次日加入相应二抗(1 : 200),室温摇床孵育 1 h,化学发光显色,用目的条带灰度值比  $\beta$ -actin 条带灰度值计算蛋白相对表达量。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS 21.0 统计软件分析实验结果,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,显著性水平  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果 Results

**2.1 倒置相差显微镜下观察 iPSCs 向血管内皮样细胞定向分化前后的细胞形态** 复苏后的小鼠皮肤成纤维细胞来源的 iPSCs 呈形态均一的长梭形,细胞核呈卵圆形(图 1A)。定向分化培养第 14 天,细胞达到 85% 融合,呈铺路石状单层排列,细胞呈多边形,突起增多(图 1B)。

**2.2 ELISA 法检测分化前后细胞培养上清中内皮型一氧化氮合酶水平** 培养第 14 天,实验组细胞培养上清中内皮型一氧化氮合酶水平显著高于对照组[(30.64 $\pm$ 1.72) U/mL, (11.33 $\pm$ 0.75) U/mL,  $P < 0.05$ ]。

**2.3 流式细胞术检测定向分化前后细胞中 CD31 的表达** 对照组未分化细胞 CD31 阴性表达,实验组分化细胞 CD31 阳性表达,阳性率为 42.71%。

**2.4 荧光实时定量 PCR 检测分化细胞中内皮素和前列环素 mRNA 的表达和共培养体系中 CD34、血管内皮生长因子 mRNA 的表达** 定向分化培养第 14 天,与对照组相比,实验组内皮素 mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ ),前列环素 mRNA 表达明显降低( $P < 0.01$ ),见表 1。人牙髓干细胞与血管内皮样细胞共培养 5 d,共培养组 CD34、血管内皮生长因子 mRNA 表达明显升高( $P < 0.01$ ),见表 2。

**2.5 Western blot 检测定向分化细胞中内皮素及前列环素蛋白的表达** 定向分化培养第 14 天,与对照组相比,实验组内皮素的蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ ),前列环素的蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ ),见图 2。

## 3 讨论 Discussion

目前临床上应用组织工程原理进行牙髓再生主要包括 2 种途径,一是通过使根尖部出血形成的血凝块诱导原位细胞进行迁移和分化,实现牙髓的血管再生,牙髓腔内新生的活性组织为牙根的继续发育提供保证;二是将干细胞和生物支架一起移植到根管,诱导干细胞分化,完成牙本质牙髓的再生<sup>[1]</sup>。血管系统是人体胚胎发育过程中最早发生且执行功能的器官系统,胚胎时期来源于中胚层的内皮细胞聚集形成血管并交织成网,发育后期或成年期新生血

表 1 qRT-PCR 检测分化细胞中内皮素和前列环素 mRNA 的表达 (x±s)

Table 1 The mRNA expressions of endothelin and prostacyclin in the cells detected by qRT-PCR

指标	对照组	实验组	P 值
内皮素	1.00±0.00	3.79±0.26	0.000
前列环素	1.00±0.00	0.15±0.01	0.006

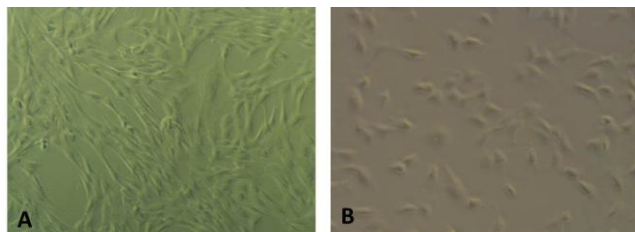


图 1 倒置相差显微镜下观察诱导性多能干细胞向血管内皮样细胞定向分化前后的细胞形态(×200)

Figure 1 Morphology of induced pluripotent stem cells differentiating into vascular endothelial cells under inverted phase contrast microscope (×200)

图注: 图中 A 为复苏后的小鼠皮肤成纤维细胞来源的诱导性多能干细胞, 呈形态均一的长梭形; B 为定向分化培养第 14 天, 细胞达到 85% 融合, 呈铺路石状单层排列, 细胞呈多边形。

管则由现存的血管以出芽的方式形成, 骨髓内的血管发生也不例外, 骨髓组织同样来源于胚胎时期的中胚层<sup>[13]</sup>。功能正常的血管系统对牙齿的发育与修复至关重要, 可以为牙齿提供营养与氧气, 并将代谢产物和二氧化碳进行清除, 而发挥重要作用的血管存在于骨髓组织内, 被坚硬的牙本质壁包围, 仅通过根尖孔与外界相通。由于结构的特殊性, 使得实现骨髓组织再生具有局限性。有研究者通过培养切片法发现在牙齿发育过程中, 牙胚的血管发生过程与人胚血管系统的建立过程相同。牙齿组织工程与牙齿发育过程相似, 体外培养时, 细胞可以通过扩散作用获得氧气与营养物质, 而移植入体内时, 单纯扩散不能满足牙胚继续发育的营养所需, 血管化成为牙胚继续发育的必要条件, 而此过程中侵入宿主脉管系统的血管化结构的形成过程正是血管再生<sup>[1]</sup>。有研究发现, 将骨髓来源干细胞与人脐静脉内皮前体细胞共培养可以形成血管网, 证实骨髓来源干细胞具有旁分泌促进血管再生的活性, 使骨髓来源干细胞与血管内皮细胞共移植实现骨髓再生成为可能<sup>[14]</sup>。该研究结果显示, 诱导分化 14 d 以后倒置显微镜下观察到细胞形态改变, 呈现血管内皮形态; 流式细胞术鉴定分化细胞 CD31 阳性, 呈现内皮细胞表型; 培养液上清中出现了主要存在于内皮细胞中的内皮型一氧化氮合酶, 随培养时间延长其含量逐渐升高, 表明成纤维细胞来源的 iPSCs 具有向血管内皮样细胞分化的倾向, 与其他研究结果一致。实验采用小鼠同源的睾丸支持细胞作为饲养层, 使细胞的诱导分化可以在不添加动物血清的条件下进行, 避免了动物来源血清引起免疫反应的不良影响。

表 2 qRT-PCR 检测共培养体系中 CD34、血管内皮生长因子 mRNA 的表达 (x±s)

Table 2 The expressions of CD34 and vascular endothelial growth factor in two groups by qRT-PCR

指标	对照组	共培养组	P 值
CD34	1.00±0.00	1.45±0.04	0.007
血管内皮生长因子	1.00±0.00	3.51±0.19	0.000

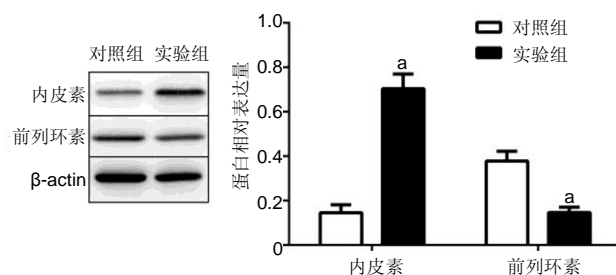


图 2 Western blot 检测定向分化细胞中内皮素及前列环素蛋白的表达

Figure 2 The expressions of endothelin and prostacyclin proteins detected by western blot

图注: 与对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.01。

血管内皮生长因子是迄今为止发现的作用最强的促进血管生成因子, 可以促进内皮细胞增殖、迁移并形成血管管腔样结构, 同时也发挥维持内皮细胞正常结构与功能的作用<sup>[15]</sup>。该研究将血管内皮生长因子作为诱导分化的细胞因子, 在碱性成纤维细胞生长因子的辅助下促进 iPSCs 向内皮细胞分化, 结果表明外源加入血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子可以使成纤维细胞来源的 iPSCs 向血管内皮样细胞分化, 与其他学者研究一致。然而, 关于分化后的血管内皮样细胞功能的鉴定方法尚未见报道。该研究除了检测培养上清中的内皮型一氧化氮合酶水平, 还结合检测了内皮细胞相关因子蛋白与 mRNA 的表达。内皮素作为内皮源性收缩因子, 前列环素属于内皮源性舒张因子, 二者达到平衡才能促进内皮细胞的生长与修复, 通常认为内皮素升高同时前列环素降低保持正常的比例可以维持内皮细胞微环境稳态<sup>[16]</sup>。该研究结果显示, 内皮素的基因与蛋白表达均在分化过程中增高, 而前列环素基因与蛋白的表达下降, 说明 iPSCs 定向分化的细胞与血管内皮细胞内两种因子分泌的情况一致, 进一步验证分化细胞是血管内皮样细胞。

研究发现, CD34 常常表达于正常的或新生的血管内皮细胞上, 可以作为敏感的血管标记物<sup>[17]</sup>。该研究建立骨髓干细胞与分化的血管内皮样细胞共培养体系, 在培养 5 d 后检测到培养物中有血管内皮生长因子和 CD34 的表达, 说明共培养体系内有内皮细胞聚集形成血管的倾向。

综上所述, 以睾丸支持细胞为饲养层同时加入血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子, 可以在无外源动

物血清的条件下体外诱导小鼠成纤维细胞来源的 iPSCs 向血管内皮细胞定向分化, 将分化细胞与牙髓干细胞共培养, 结果初步显示内皮样细胞有形成血管的倾向, 但诱导后的血管与正常血管的结构与功能是否一致, 还需要进一步研究。

**作者贡献:** 实验设计、实施、评估为吕继忠。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**利益冲突:** 作者声明在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**伦理问题:** 研究用动物组织的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Rombouts C, Giraud T, Jeanneau C, et al. Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *J Dent Res*. 2017;96(2):137-144.
- [2] Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. *J Dent Res*. 2015;94(6):759-767.
- [3] Seo JY, Park YJ, Yi YA, et al. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor Dent Endod*. 2015;40(1):14-22.
- [4] Liu Y, Olsen BR. Distinct VEGF functions during bone development and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62(5):363-368.
- [5] Paes BCMF, Moço PD, Pereira CG, et al. Ten years of iPSC: clinical potential and advances in vitro hematopoietic differentiation. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(3):233-250.
- [6] Kim EJ, Kang KH, Ju JH. CRISPR-Cas9: a promising tool for gene editing on induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med*. 2017;32(1):42-61.
- [7] Smith AS, Macadangdang J, Leung W, et al. Human iPSC-derived cardiomyocytes and tissue engineering strategies for disease modeling and drug screening. *Biotechnol Adv*. 2017;35(1):77-94.
- [8] Suh W. A new era of disease modeling and drug discovery using induced pluripotent stem cells. *Arch Pharm Res*. 2017;40(1):1-12.
- [9] Ratajczak MZ, Bujko K, Wojakowski W. Stem cells and clinical practice: new advances and challenges at the time of emerging problems with induced pluripotent stem cell therapies. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(11):879-890.
- [10] Kumar D, Anand T, Kues WA. Clinical potential of human-induced pluripotent stem cells: Perspectives of induced pluripotent stem cells. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(2):99-112.
- [11] Sunil PM. Induced pluripotent stem cells in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci*. 2016;8(Suppl 1):S23-S27.
- [12] Garcia-Martinez J, Bakker B, Schukken KM, et al. Aneuploidy in stem cells. *World J Stem Cells*. 2016 6; 8(6):216-222.
- [13] Andreasen FM, Kahler B. Pulpal response after acute dental injury in the permanent dentition: clinical implications-a review. *J Endod*. 2015;41(3):299-308.
- [14] Javed F, Al-Kheraif AA, Romanos EB, et al. Influence of orthodontic forces on human dental pulp: a systematic review. *Arch Oral Biol*. 2015;60(2):347-356.
- [15] 胡继宏, 贾佳, 路娟, 等. 低氧下血管内皮细胞生长因子转染人骨髓间充质干细胞向血管内皮样细胞的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2017,21(9):1352-1356.
- [16] 杨文娟, 洪泽, 严思敏, 等. 氧化应激对血管活性物质的影响及其机制研究进展[J]. *药学研究*, 2015,34(12):726-730.
- [17] Puztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(4):385-395.