

# 前列腺素E1联合碱性成纤维细胞生长因子干预人牙髓干细胞增殖和血管生成能力的变化

项海东, 程东梅, 郭 晗, 高 琪(河北医科大学第二医院口腔内科, 河北省石家庄市 050000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2095

ORCID: 0000-0002-7727-1883(项海东)

文章快速阅读:

## 文章特点一

- (1)前列腺素E1、碱性成纤维细胞生长因子等多种细胞生长因子可相互作用构成功能性网络, 形成细胞生存、血管形成的微环境, 促使牙齿的发育及牙本质的形成;
- (2)前列腺素E1联合碱性成纤维细胞生长因子处理体外培养的人牙髓干细胞, 二者均能促进人牙髓干细胞增殖和血管生成, 且具有协同作用。

## 检测:

- (1)CCK-8法检测细胞增殖情况;
- (2)ELISA测定条件培养基中血管内皮生长因子、内皮抑素水平;
- (3)小管形成实验检测人脐静脉血管内皮细胞血管生成能力。

## 细胞因子:

- (1)5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  前列腺素E1;
- (2)5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子。

↓ 干预

## 细胞:

采用酶消化后有限稀释法体外分离培养人牙髓干细胞。

↓ 筛选最佳药物作用质量浓度和时间

## 分组:

- (1)空白对照组;
- (2)前列腺素E1组;
- (3)碱性成纤维细胞生长因子组;
- (4)前列腺素E1+碱性成纤维细胞生长因子组。



项海东, 男, 1982年生, 硕士, 主治医师, 主要从事口腔牙体牙髓病方面的研究。

通讯作者: 高琪, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 河北医科大学第二医院口腔内科, 河北省石家庄市 050000

文献标识码:A

投稿日期: 2019-09-07

送审日期: 2019-09-09

采用日期: 2019-10-31

在线日期: 2020-03-25



## 文题释义:

**前列腺素E1:** 是一种生物活性物质, 广泛存在于体内各组织细胞, 由 BERGSRTOEM 等于 1960 年首先分离获得, 并详细研究了其分子结构, 具有舒张血管、稳定细胞膜降低血小板黏附率、改善血液黏度及抗炎等作用, 可促进骨髓间充质干细胞和神经干细胞的增殖、迁移, 并促进细胞分泌血管内皮生长因子, 进而促进血管生成。

**碱性成纤维细胞生长因子:** 是一种肝素黏合多肽, 也是一种重要的潜在有丝分裂原, 属于成纤维细胞生长因子家族, 对细胞有丝分裂及分化具有很强的调节作用, 特别是对中胚层和神经外胚层来源的细胞作用更强, 可促进细胞生长, 研究发现牙髓中的成纤维细胞可表达碱性成纤维细胞生长因子, 在体外能明显促进人牙髓干细胞增殖。

## 摘要

**背景:** 前列腺素E1及碱性成纤维细胞生长因子可促使人牙髓干细胞增殖, 但两者联合应用对人牙髓干细胞增殖和血管生成能力的影响还未见研究。

**目的:** 探究前列腺素E1联合碱性成纤维细胞生长因子对人牙髓干细胞增殖和血管生成能力的影响。

**方法:** ①体外分离培养人牙髓干细胞, 经表面标志物检测鉴定后, 分别以 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  前列腺素E1及 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子单独作用于体外培养的人牙髓干细胞, 以未加药物处理的细胞作为空白对照组, 采用 CCK-8 法分别在 1, 2, 3 d 检测人牙髓干细胞增殖情况, 筛选最佳药物作用质量浓度和时间。②将体外培养的人牙髓干细胞分为 4 组: 空白对照组、前列腺素E1组、碱性成纤维细胞生长因子组、前列腺素E1+碱性成纤维细胞生长因子组, 采用 CCK-8 法检测人牙髓干细胞增殖情况, 然后提取人牙髓干细胞条件培养基, 以 ELISA 测定条件培养基中血管内皮生长因子、内皮抑素水平, 以小管形成实验检测人牙髓干细胞条件培养基干预后人脐静脉血管内皮细胞的体外小管形成能力。

**结果与结论:** ①前列腺素E1、碱性成纤维细胞生长因子的最佳作用质量浓度均为 20  $\mu\text{g/L}$ , 最佳作用时间为 2 d; ②与空白对照组相比, 前列腺素E1组、碱性成纤维细胞生长因子组、前列腺素E1+碱性成纤维细胞生长因子组人牙髓干细胞相对增殖率、血管内皮生长因子水平、人脐静脉血管内皮细胞体外血管生成能力均显著升高( $P < 0.05$ ), 内皮抑素水平显著降低( $P < 0.05$ ); 前列腺素E1+碱性成纤维细胞生长因子组上述各指标均优于前列腺素E1组、碱性成纤维细胞生长因子组( $P < 0.05$ ); ③结果表明, 前列腺素E1联合碱性成纤维细胞生长因子可促进人牙髓干细胞增殖, 增强人脐静脉血管内皮细胞体外小管形成能力。

## 关键词:

前列腺素E1; 碱性成纤维细胞生长因子; 人牙髓干细胞; 细胞增殖; 血管生成

中图分类号: R459.9; R394.2; R318

## 缩略语:

碱性成纤维细胞生长因子: basic fibroblast growth factor, bFGF; 前列腺素E1: prostaglandin E1, PGE1

Xiang Haidong, Master, Attending physician, Department of Stomatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Corresponding author: Gao Qi, Associate chief physician, Associate professor, Master's supervisor, Department of Stomatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

## Changes in the proliferation and angiogenesis of human dental pulp stem cells after treated with prostaglandin E1 combined with basic fibroblast growth factor

Xiang Haidong, Cheng Dongmei, Guo Han, Gao Qi (Department of Stomatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Prostaglandin E1 and basic fibroblast growth factor can promote the proliferation of human dental pulp stem cells, but the effects of their combinations on the proliferation of human dental pulp stem cells and angiogenesis are unknown.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of prostaglandin E1 combined with basic fibroblast growth factor on the proliferation and angiogenesis of human dental pulp stem cells.

**METHODS:** (1) Human dental pulp stem cells were isolated and cultured *in vitro*. After detection and identification of surface markers, prostaglandin E1 and basic fibroblast growth factor at concentrations of 5, 10, 20, 50 and 100  $\mu\text{g/L}$  were used to treat human dental pulp stem cells *in vitro*. The untreated cells served as control group. The cell proliferation was detected by cell counting kit-8 assay, and the optimum drug concentration and time of drug action were screened. (2) The *in vitro* cultured human dental pulp stem cells were divided into four groups: blank control group, prostaglandin E1 group, basic fibroblast growth factor group and combination group. The cell proliferation was detected by cell counting kit-8 assay. Human dental pulp stem cell conditioned medium was extracted. The levels of vascular endothelial growth factor and endostatin in the culture medium were detected by ELISA. The *in vitro* tubular formation ability of human umbilical vein endothelial cells after culture in conditioned medium was tested by tubule formation experiment.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The optimum concentration of prostaglandin E1 and basic fibroblast growth factor was 20  $\mu\text{g/L}$ , and the optimum time of action was 2 days. Compared with the blank control group, the relative proliferation rate, level of vascular endothelial growth factor and the angiogenesis ability of human umbilical vein endothelial cell *in vitro* in the prostaglandin E1, basic fibroblast growth factor and combination groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the level of endostatin was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). All above index levels in the combination group were significantly superior to those in the prostaglandin E1 and basic fibroblast growth factor groups ( $P < 0.05$ ). In summary, prostaglandin E1 combined with basic fibroblast growth factor can promote the proliferation of human dental pulp stem cells and enhance the tubular formation ability of human umbilical vein endothelial cells *in vitro*.

**Key words:** prostaglandin E1; basic fibroblast growth factor; human dental pulp stem cells; cell proliferation; angiogenesis

## 0 引言 Introduction

人牙髓干细胞是2000年GRONTHOS等首先发现的一种具有间充质干细胞典型生物学特征的干细胞, 具有高度增殖和自我更新分化的特性, 不仅乳牙牙髓组织中存在牙髓干细胞, 而且发育完成的恒牙牙髓组织中也存在该细胞<sup>[1-2]</sup>。体外培养的人牙髓干细胞可以向软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞等多种细胞分化<sup>[3]</sup>, 与成牙本质细胞的发生相关, 同时还可促进牙髓内血管再生, 介导并重建牙髓血运<sup>[4]</sup>。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是一种肝素黏合多肽, 也是一种重要的潜在有丝分裂原, 具有很强的促细胞生长作用<sup>[5]</sup>, 研究发现牙髓中的成纤维细胞能表达bFGF, 在体外明显促进人牙髓干细胞增殖<sup>[6]</sup>; 人牙髓干细胞还可通过分泌血管生成相关因子促进血管内皮细胞的增殖和迁移<sup>[7]</sup>, 并预测bFGF可增强人牙髓干细胞促人脐静脉血管内皮细胞体外小管形成的作用, 进而间接增强其血管生成能力。前列腺素E1 (prostaglandin E1, PGE1)是广泛存在于体内的一种生物活性物质, 具有舒张血管、稳定细胞膜及抗炎等作用<sup>[8]</sup>, 可促进骨髓间充质干细胞和神经干细胞的增殖、迁移<sup>[9]</sup>, 促进细胞分泌血管内皮生长因子, 进而促进血管生成<sup>[10]</sup>, 但其对人牙髓干细胞的作用目前还未知。

该实验联合使用PGE1和bFGF处理体外培养的人牙髓干细胞, 探索其对人牙髓干细胞增殖和血管生成能力的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 2019年3至6月在河北医科大学第二医院完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验材料与试剂 人脐静脉血管内皮细胞(CRL-1730)(美国ATCC公司); PGE1(P8908)、bFGF(372040)、DAPI(D9542)、血管内皮生长因子(RAB0507)ELISA试剂盒、内皮抑素(RAB0095)ELISA试剂盒(Sigma公司); 胎牛血清(11011-8611)、DMEM高糖培养基(11995)、PBS(P1022)、中性蛋白酶Dispase(D6430)、胶原酶I(C8140)、胰蛋白酶-EDTA消化液(T1300)、100 $\times$ 青霉素混合液(P1400)(Solarbio公司); APC-CD34(clone 581)、PE-CD29(HUTS-21)、FITC-CD44(G44-26)、PE-CD45(HI30)、FITC-CD90(5E10)(BD Biosciences公司); APC-CD133(AC133-1)(Miltenyi Biotec公司); CD29(ab179471)、CD44(ab216647)、CD90(ab133350)、CD34(ab81289)、CD45(ab214437)、CD133(ab19898)一抗、Alexa Fluor 488标记的羊抗兔二抗(ab199091)(Abcam公司); Matrigel(354248)(BD Biocoat公司)。

1.3.2 实验仪器 酶标仪(Model 680)(美国Bio-Rad公司); 倒置相差显微镜(CKX53)、自动荧光显微镜(BX63)(日本Olympus公司); 低温高速离心机(Centrifuge 5424R)(德国Eppendorf股份公司)。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 培养基配制、细胞培养及条件培养基的提取

(1)人脐静脉血管内皮细胞、人牙髓干细胞完全培养基: 在500 mL DMEM高糖基础培养基中加入体积分数为10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的混合液(100 $\times$ )混匀。

(2)人牙髓干细胞的体外分离、培养: 参照文献[11], 收集志愿者因正畸减数或阻生而新鲜拔除的健康完整恒牙, 超净台中用含1%青霉素和链霉素混合液的PBS漂洗干净, 在无菌条件下用拔髓针取出牙髓, 将牙髓剪成小组织块(约1 mm<sup>3</sup>), 转移至离心管中, 加入10倍量的Dispase酶、胶原酶 I 混合液(比例为1:1)混匀后37 °C消化1 h, 加入胎牛血清终止消化, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入人牙髓干细胞完全培养基混匀, 使用细胞筛网过滤得到单细胞悬液, 计数后调整细胞浓度为1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 在37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>条件下培养, 每3 d更换1次培养液(弃去未贴壁细胞), 取对数生长期的原代细胞加入胰酶消化后, 采用有限稀释法接种于96孔培养板, 使每孔细胞数少于3个, 常规培养12 h后标记出单个细胞的孔, 待单细胞克隆生长至孔底80%时加入胰酶消化, 合并多个克隆培养的细胞扩大培养, 即为第1代。

(3)人脐静脉血管内皮细胞的培养: 取出冻存细胞, 在39 °C水浴中快速融化, 以1 000 r/min的转速离心5 min, 去除上清, 加入人脐静脉血管内皮细胞完全培养基重悬接种在25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 在37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>条件下培养, 当细胞增至85%左右时加入胰酶消化, 以1:3的比例进行传代培养。

(4)人牙髓干细胞条件培养基的提取<sup>[12]</sup>: 将生长状态良好的人牙髓干细胞接种在25 cm<sup>2</sup>培养瓶中进行常规培养, 待细胞长至80%时更换为DMEM高糖基础培养基继续培养24 h, 收集培养液, 1 000 r/min离心10 min, 收集上清备用。

1.4.2 人牙髓干细胞鉴定 CD29、CD44、CD90是人牙髓干细胞的标志抗原<sup>[13]</sup>, CD34、CD45、CD133是造血干/祖细胞的标志抗原<sup>[14]</sup>, 采用细胞免疫荧光和流式细胞技术检测上述抗原的表达, 可用来鉴定人牙髓干细胞。取对数期第1代人牙髓干细胞, 胰酶消化后制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>, 吸取1 mL细胞悬液置于EP管中, 以300×g的转速离心5 min后弃去上清, 加入300 mL Buffer, 分别加入适宜浓度的抗体APC-CD34、PE-CD29、FITC-CD44、PE-CD45、FITC-CD90、APC-CD133于4 °C下避光孵育30 min, 然后上流式细胞仪检测并使用FlowJo软件对结果进行分析。

以上剩余的单细胞悬液接种于24孔板中(以0.2%明胶铺板)培养, 待细胞长至80%时弃去培养基, PBS漂洗, 加入5% BSA室温封闭1 h, 分别加入CD29、CD44、CD90、CD34、CD45、CD133一抗4 °C孵育过夜, PBS漂洗3次, 加入Alexa Fluor 488标记的羊抗兔二抗室温避光孵育2 h, PBS漂洗3次, 加入DAPI孵育30 min, PBS漂洗3次, 在荧光显微镜下观察以上标志蛋白表达。

1.4.3 CCK-8实验及细胞分组 取对数期第2代人牙髓干细胞接种于96孔板中(5×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>), 分别以5, 10, 20, 50, 100 μg/L的PGE1及5, 10, 20, 50, 100 μg/L的bFGF单

#### 人牙髓干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	志愿者因正畸减数或阻生而新鲜拔除的健康完整恒牙
原代培养方法:	酶消化后有限稀释法
基础培养基:	DMEM 高糖培养基
添加材料:	体积分数为10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的混合液(×100)
细胞传代:	每3 d更换1次培养液, 待单细胞克隆生长至孔底80%时开始传代, 按1:3的比例传代
细胞鉴定:	细胞免疫荧光和流式细胞技术

独处理人牙髓干细胞, 以未加药物处理的细胞作为空白对照组, 每组设4个孔, 分别在培养第1, 2, 3天加入CCK-8试剂, 继续培养2 h, 在全自动酶标仪中测定450 nm波长下各孔吸光度值, 计算各组细胞的相对增殖率。公式为: 相对增殖率(%)=药物处理组吸光度值/空白对照组吸光度值×100%。

根据CCK-8实验结果选择最佳药物质量浓度及作用时间进行后续实验。取1.4.1中的对数期第3代人牙髓干细胞接种于60 mm培养皿中, 细胞浓度为5×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 分为4组: 对照组、PGE1组、bFGF组和PGE1+bFGF组, 培养24 h后用药物处理各组细胞, 然后收集细胞进行CCK-8实验。

1.4.4 ELISA检测血管内皮生长因子、内皮抑素水平 参照1.4.1中的步骤提取上述各组分人牙髓干细胞条件培养基, 采用ELISA测定试剂盒根据制造商说明书检测培养基中血管内皮生长因子、内皮抑素水平。

1.4.5 小管形成实验 将移液枪枪头、24孔板等实验中接触Matrigel基质胶的物品预冷, Matrigel基质胶置于4 °C冰箱中过夜融化, 以每孔300 μL加入24孔板中, 在37 °C静置1 h以成胶, 取对数期传代人脐静脉血管内皮细胞接种于24孔板中, 分为4组: 对照组、PGE1组、bFGF组和PGE1+bFGF组, 细胞浓度为2×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>, 待细胞贴壁后将人脐静脉血管内皮细胞完全培养基更换为对应的上述各组分人牙髓干细胞条件培养基继续培养6 h, 取出细胞培养板, 在倒置显微镜下观察并拍照, 采用Image-Pro Plus软件分析形成小管的长度。

1.5 主要观察指标 ①PGE1、bFGF干预后人牙髓干细胞的相对增殖率; ②PGE1、bFGF干预后人牙髓干细胞条件培养基中血管内皮生长因子、内皮抑素水平; ③PGE1、bFGF干预后人牙髓干细胞条件培养基对人脐静脉血管内皮细胞体外血管生成能力的影响。

1.6 统计学分析 数据以统计学软件SPSS 22.0进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较行 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 人牙髓干细胞的鉴定结果 免疫荧光和流式细胞仪检测结果显示, 第1代培养的人牙髓干细胞表达CD29、

CD44、CD90标志抗原,不表达CD34、CD45、CD133标志抗原,见图1,表明实验分离、培养的人牙髓干细胞纯度较高。

**2.2 PGE1、bFGF对人牙髓干细胞增殖的影响** 与空白对照组相比,PGE1及bFGF单独处理都能提高人牙髓干细胞的相对增殖率( $P < 0.05$ ),并且20  $\mu\text{g/L}$ 的PGE1及20  $\mu\text{g/L}$ 的bFGF在干预第2天时人牙髓干细胞的相对增殖率最高,见图2, 3。因此,实验选择PGE1及bFGF质量浓度均为20  $\mu\text{g/L}$ ,作用时间为2 d来进行后续实验。

**2.3 PGE1联合bFGF对人牙髓干细胞增殖的影响** 与对照组相比,PGE1组、bFGF组和PGE1+bFGF组细胞相对增殖率均显著升高( $P < 0.05$ );与PGE1组、bFGF组相比,PGE+bFGF组细胞相对增殖率进一步升高( $P < 0.05$ ),见图4。

**2.4 PGE1联合bFGF对人牙髓干细胞分泌血管内皮生长因子、内皮抑素的影响** 与对照组相比,PGE1组、bFGF组和PGE1+bFGF组人牙髓干细胞培养基中血管内皮生长因子水平显著升高( $P < 0.05$ ),内皮抑素水平显著降低( $P < 0.05$ );与PGE1组、bFGF组相比,PGE+bFGF组培养基中血管内皮生长因子水平进一步升高( $P < 0.05$ ),内皮抑素水平进一步降低( $P < 0.05$ ),见图5。

**2.5 PGE1联合bFGF对人脐静脉血管内皮细胞血管生成能力的影响** 与对照组相比,PGE1组、bFGF组和PGE1+bFGF组人牙髓干细胞条件培养基干预后人脐静脉血管内皮细胞成管长度均显著增加( $P < 0.05$ );与PGE1组、bFGF组相比,PGE+bFGF组人牙髓干细胞条件培养基干预后人脐静脉血管内皮细胞成管长度进一步增加( $P < 0.05$ ),见图6, 7。

### 3 讨论 Discussion

人牙髓干细胞具有自我更新及多向分化潜能,诱导其分化可获得多种功能细胞,在牙髓的损伤修复及再生过程中发挥着重要作用<sup>[15-16]</sup>。该实验分离、培养恒牙牙髓组织中的人牙髓干细胞,采用流式细胞和细胞免疫荧光技术检测人牙髓干细胞表面抗原,结果显示细胞表达CD29、CD44、CD90人牙髓干细胞标志抗原,不表达CD34、CD45、CD133造血干/祖细胞标志抗原,表明从牙髓组织中分离、培养的细胞确实为人牙髓干细胞,且纯度很高,为后续研究打下了良好的基础。

成纤维细胞生长因子最早是在牛脑和垂体的提取物中发现的一类细胞生长因子家族,来源于中胚层和神经外胚层细胞,具有广泛的生物学活性,成纤维细胞生长因子家族成员之间有一定的同源性和结构相似性,种属之间具有高度保守性,均能诱导多种细胞增殖和分化,可刺激细胞迁移、促进血管生成、组织器官损伤修复等<sup>[17]</sup>。PGE1由BERGSRTOEM等在1960年首先分离并详细得出其分子结构,在临床上别名为前列地尔,用于治疗心肌梗死、血

栓性脉管炎、闭塞性动脉硬化等疾病,可促进髓系祖细胞的增殖<sup>[18]</sup>,但PGE1联合bFGF对人牙髓干细胞增殖的作用目前还不清楚,该研究的CCK-8实验结果显示,PGE1及bFGF单独处理均能促进人牙髓干细胞增殖,在0-20  $\mu\text{g/L}$ 时随剂量升高促进增殖作用增强,到达20  $\mu\text{g/L}$ 时趋于稳定,并且在2 d内随作用时间延长促进增殖作用增强,在第2天时趋于稳定,因而该研究选择的PGE1、bFGF最佳作用质量浓度均为20  $\mu\text{g/L}$ ,最佳作用时间为2 d。以PGE1和bFGF联合处理人牙髓干细胞,其相对增殖率高于PGE1、bFGF单独处理,表明PGE1和bFGF联合对人牙髓干细胞具有协同作用。

研究表明,人牙髓干细胞可合成分泌促进血管形成的血管内皮生长因子,进而促进体外培养的血管内皮细胞成管<sup>[19-20]</sup>,因此理论上bFGF可以通过促进人牙髓干细胞增殖来增强其血管生成相关因子的分泌,进而增强其血管形成能力。PGE1能够有效地预防和治疗显微外科术后血管危象<sup>[21]</sup>,并促进血管内皮细胞产生血管内皮生长因子和内皮型一氧化氮合酶,修复心力衰竭患者血管内皮细胞功能<sup>[22]</sup>,但PGE1对人牙髓干细胞的作用还不清楚。结果显示以PGE1、bFGF分别处理人牙髓干细胞,其细胞培养基中血管内皮生长因子水平以及人脐静脉血管内皮细胞体外血管生成能力均显著升高,而内皮抑素水平显著降低,表明PGE1、bFGF均能促进人牙髓干细胞增殖、分泌血管内皮生长因子,抑制其分泌内皮抑素,增强人牙髓干细胞对人脐静脉血管内皮细胞的血管形成能力,以PGE1和bFGF联合处理人牙髓干细胞,其细胞培养基中血管内皮生长因子水平以及人脐静脉血管内皮细胞体外血管生成能力均高于两者单独处理,而内皮抑素水平低于两者单独处理,表明PGE1及bFGF联合具有协调作用,可进一步促进人牙髓干细胞增殖,进而提高人脐静脉血管内皮细胞体外成管能力,且PGE1、bFGF对人牙髓干细胞诱导人脐静脉血管内皮细胞血管形成能力的促进作用可能是通过影响血管内皮生长因子、内皮抑素的分泌实现的,但PGE1、bFGF两者之间的相互作用及具体联系尚未研究清楚,是后续需要深入研究的内容。

**作者贡献:** 实验设计为项海东、高琪,实验实施为项海东、程东梅、郭晗,实验评估为项海东、高琪,资料收集为项海东、程东梅。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

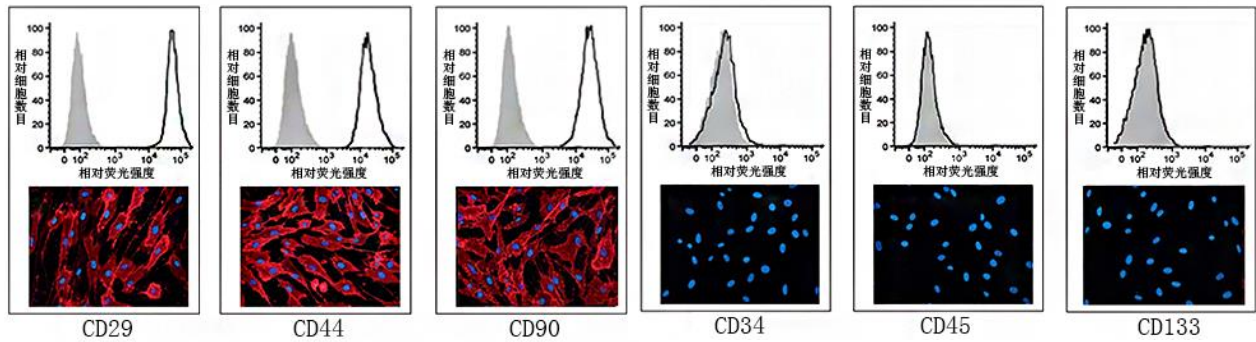
**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 该实验所用标本为因牙齿正畸拔除的废旧牙齿,不涉及医学伦理。

**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:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

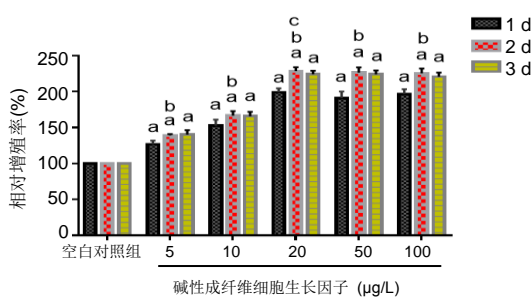
**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。



图注: 上图是该抗原的流式细胞图, 下图是该抗原的细胞免疫荧光图( $\times 400$ )

图 1 人牙髓干细胞的鉴定

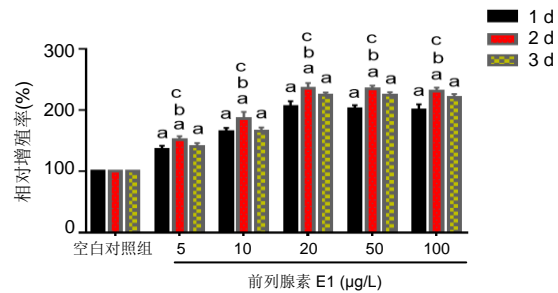
Figure 1 Identification of human dental pulp stem cells



图注: 与空白对照组相比,  $^aP < 0.05$ ; 同一质量浓度时, 与 1 d 相比,  $^bP < 0.05$ , 与 3 d 相比,  $^cP < 0.05$

图 2 不同质量浓度的碱性成纤维细胞生长因子对人牙髓干细胞增殖的影响

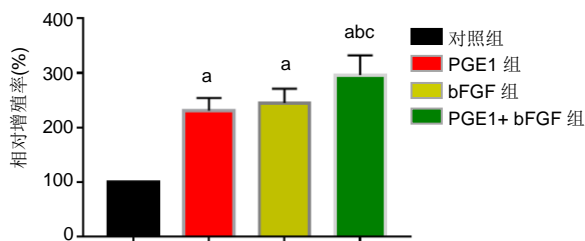
Figure 2 Effect of basic fibroblast growth factor at different concentrations on the proliferation of human dental pulp stem cells



图注: 与空白对照组相比,  $^aP < 0.05$ ; 同一质量浓度时, 与 1 d 相比,  $^bP < 0.05$ , 与 3 d 相比,  $^cP < 0.05$

图 3 不同质量浓度的前列腺素 E1 对人牙髓干细胞增殖的影响

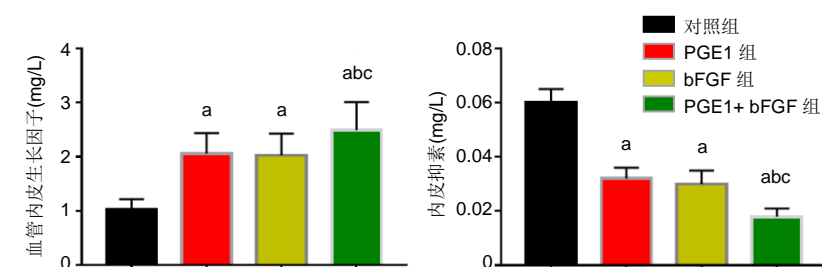
Figure 3 Effect of prostaglandin E1 at different concentrations on the proliferation of human dental pulp stem cells



图注: 与对照组相比,  $^aP < 0.05$ ; 与 PGE1 组相比,  $^bP < 0.05$ , 与 bFGF 组相比,  $^cP < 0.05$ 。PGE1: 前列腺素 E1; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 4 前列腺素 E1 联合碱性成纤维细胞生长因子对人牙髓干细胞增殖的影响

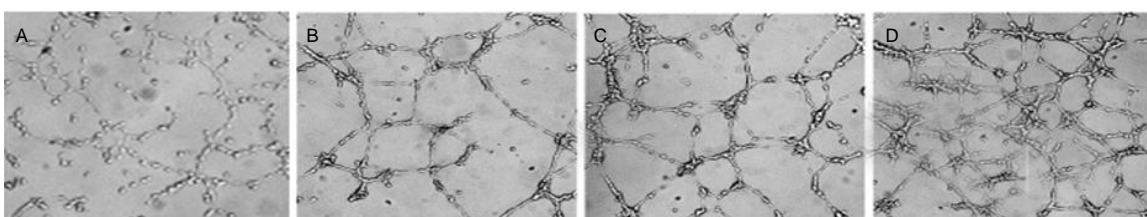
Figure 4 Effect of prostaglandin E1 combined with basic fibroblast growth factor on the proliferation of human dental pulp stem cell



图注: 与对照组相比,  $^aP < 0.05$ ; 与 PGE1 组相比,  $^bP < 0.05$ , 与 bFGF 组相比,  $^cP < 0.05$ 。PGE1: 前列腺素 E1; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 5 各组分人脐静脉血管内皮细胞培养基中血管内皮生长因子、内皮抑素水平

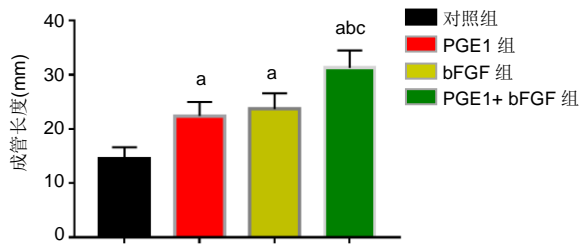
Figure 5 Levels of vascular endothelial growth factor and endostatin in the culture medium of human dental pulp stem cells in each group



图注: A: 对照组; B: PGE1 组; C: bFGF 组; D: PGE1+bFGF 组。PGE1+bFGF 组人脐静脉血管内皮细胞管状结构明显增多, 成管长度增加。PGE1: 前列腺素 E1; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 6 各组分人脐静脉血管内皮细胞成管情况( $\times 200$ )

Figure 6 Tubular formation ability of human umbilical vein endothelial cells in each group ( $\times 200$ )



图注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 PGE1 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , 与 bFGF 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。PGE1: 前列腺素 E1; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

图 7 各组人脐静脉血管内皮细胞成管长度比较

Figure 7 Comparison of the length of human umbilical vein endothelial cells among groups

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过河北医科大学第二医院张英怀教授审核。

**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4.0”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] GHARAEI MA, XUE Y, MUSTAFA K, et al. Human dental pulp stromal cell conditioned medium alters endothelial cell behavior. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):69.
- [2] KIM HB, BAIK KY, SEONWOO H, et al. Effects of pulsing of light on the dentinogenesis of dental pulp stem cells in vitro. *Sci Rep*. 2018;8(1):2057.
- [3] XIAO J, YANG D, LI Q, et al. The establishment of a chemically defined serum-free culture system for human dental pulp stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):191.
- [4] AGHAZADEH M, SAMIEI M, HOKMABAD VR, et al. The Effect of Melanocyte Stimulating Hormone and Hydroxyapatite on Osteogenesis in Pulp Stem Cells of Human Teeth Transferred into Polyester Scaffolds. *Fibers and Polymers*. 2018;19(11):2245-2253.
- [5] HAGHIGHI F, DAHLMANN J, NAKHAEI-RAD S, et al. bFGF-mediated pluripotency maintenance in human induced pluripotent stem cells is associated with NRAS-MAPK signaling. *Cell Commun Signal*. 2018;16(1):96.
- [6] 刘亚楠, 李祥伟, 孙宏晨. bFGF调控DPSCs迁移、增殖和分化的研究进展[J]. *口腔医学*, 2017,37(8):746-750.
- [7] 柳鑫, 肖燕, 江川, 等. 牙髓干细胞来源外泌体诱导内皮细胞血管生成能力的研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2018,28(4):187-196.
- [8] XU F, LIU X, WANG C, et al. Prostaglandin E1 Preconditioning Attenuates Liver Ischemia Reperfusion Injury in a Rat Model of Extrahepatic Cholestasis. *Biomed Res Int*. 2018;2018:3812424.
- [9] 吉章阁, 张素平, 凌莉, 等. 前列腺素E1对脑梗死后神经干细胞增殖和迁移的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2013,39(6):326-330.
- [10] LIU B, ZHANG S, XIONG X, et al. Lipo-prostaglandin E1 modifies cognitive impairment in rats with vascular cognitive impairment by promoting angiogenesis via the VEGF/VEGFR pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(3):3117-3124.
- [11] ASGHARI SANA F, ÇAPKIN YURTSEVER M, KAYNAK BAYRAK G, et al. Spreading, proliferation and differentiation of human dental pulp stem cells on chitosan scaffolds immobilized with RGD or fibronectin. *Cytotechnology*. 2017;69(4):617-630.
- [12] 孙旭鸯, 陈湧. Twist通过ERK通路对外鼻咽喉癌细胞血管生成的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2019,35(2):298-304.
- [13] HONG JW, LIM JH, CHUNG CJ, et al. Immune Tolerance of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T-Cells and Induced by TGF- $\beta$ 1 and IL-10. *Yonsei Med J*. 2017;58(5):1031-1039.
- [14] MOSSAHEBI-MOHAMMADI M, ATASHI A, KAVIANI S, et al. Efficient Expansion of SALL4-Transduced Umbilical Cord Blood Derived CD133+Hematopoietic Stem Cells. *Acta Med Iran*. 2017;55(5):290-296.
- [15] MOKRY J, SOUKUP T, MICUDA S, et al. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:673513.
- [16] AL-ZER H, KALBOUNEH H. Dental pulp stem cells-derived schwann cells for peripheral nerve injury regeneration. *Neural Regen Res*. 2015;10(12):1945-1946.
- [17] BLUEMN EG, COLEMAN IM, LUCAS JM, et al. Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling. *Cancer Cell*. 2017;32(4):474-489.e6.
- [18] TAETLE R, MENDELSON J. Modulation of normal and abnormal myeloid progenitor proliferation by cyclic nucleotides and PGE1. *Blood Cells*. 1980;6(4):701-718.
- [19] 冯毅, 马静, 黄贞. 牙髓干细胞促进牙髓血管生成的相关分子机制研究[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2013,23(12):768-772.
- [20] 刘景, 袁媛. HDPSCs在体外促进血管再生的潜能及其分子机理研究[J]. *现代口腔医学杂志*, 2018,32(1):11-15.
- [21] 刘俊, 刘氘, 张飞, 等. 前列地尔预防和治疗显微外科术后血管危险的临床对照研究[J]. *赣南医学院学报*, 2019, 39(2):22-24,44.
- [22] HAIDER DG, BUCEK RA, GIURGEA AG, et al. PGE1 analog alprostadil induces VEGF and eNOS expression in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(5):H2066-2072.