

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.008

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200724.1331.018.html\(2020-07-24\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200724.1331.018.html(2020-07-24))

miR-126 对人乳牙牙髓干细胞成血管分化影响的体外实验研究^{*}

王颖铤谣,王璞玉,侯佳龙,黄锦梅,秦宗长

(天津市口腔功能重建重点实验室/天津市口腔医院牙体牙髓科/南开大学附属口腔医院牙体牙髓科 300041)

[摘要] **目的** 研究微 RNA-126(miR-126)对人乳牙牙髓干细胞(SHED)成血管分化的影响。**方法** 选取 2018 年 1 月至 2019 年 9 月该院口腔科收治的 30 例健康儿童滞留乳牙,采用 I 型胶原酶消化分离 SHED,采用诱导培养基进行成血管定向诱导分化,分组:空白对照组(正常成血管分化 SHED)、阴性对照组(转染 miR-126 mimics 对照序列成血管分化 SHED)、过表达组(转染 miR-126 mimics 序列成血管分化 SHED)。采用实时定量 PCR(RT-PCR)检测 3 组 SHED 中 miR-126 及成血管相关基因血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1,又称 CD31)、血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)、血管生成素-1(ANG-1)mRNA 相对表达水平。采用 Western blot 法检测蛋白 CD31、VEGFR2、ANG-1 表达水平。**结果** 显微镜下形态观察结果显示,SHED 经定向诱导分化后呈长梭型典型血管内皮样细胞;与空白对照组、阴性对照组比较,过表达组 SHED 中 miR-126 mRNA,CD31、VEGF、ANG-1 mRNA 及蛋白表达水平显著增加($P<0.05$),SHED 血管样结构明显增多。**结论** 过表达 miR-126 可能通过上调 CD31、VEGF、ANG-1 表达促进入 SHED 成血管分化。

[关键词] RNA-126;乳牙牙髓干细胞;成血管分化;抗原,CD31;血管内皮细胞生长因子受体 2;血管生成素-1
[中图法分类号] R788 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)18-3008-05

In vitro experimental study of the effect of miR-126 on the angiogenic differentiation of human deciduous dental pulp stem cells^{*}

WANG Yingchengyao,WANG Puyu,HOU Jialong,HUANG Jinmei,QIN Zongchang

(Tianjin Key Laboratory of Oral and Maxillofacial Function Reconstruction/Department of Endodontics,Tianjin Stomatological Hospital/Department of Endodontics, the Affiliated Stomatological Hospital of Nankai University,Tianjing 300041,China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of microRNA-126 (miR-126) on the angiogenic differentiation of human deciduous dental pulp stem cells (SHED). **Methods** From January 2018 to September 2019, 30 healthy children with retained deciduous teeth in the Department of Stomatology of this hospital were selected, SHED was digested and separated by type I collagenase, the induction medium was used for the directional induction and differentiation of angiogenesis, and they were divided into the three groups: the blank control group (normal angiogenic differentiation SHED), the negative control group (transfected the angiogenic differentiation SHED with miR-126 mimics control sequence), the over expression group (transfected the angiogenic differentiation SHED with miR-126 mimics sequence). Real-time PCR (RT-PCR) was used to detect the relative-mRNA expression levels of miR-126 mRNA, vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, also known as CD31), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and angiopoietin-1 (Ang-1) in SHED of three groups. The expression levels of CD31, VEGFR2 and Ang-1 were detected by Western blot. **Results** SHED showed long-spindle typical vascular endothelial-like cells after directional induction and differentiation; compared with the blank control group and the negative control group, the expression levels of miR-126, CD31, VEGF, Ang-1 mRNAs and proteins of SHED in the over expression group were significantly increased ($P<0.05$), and the vascular structure of SHED was significantly increased. **Conclusion** Overexpression of miR-126 may promote the angiogenic differentiation of SHED by up-regulating the expression levels of CD31, VEGF and ANG-1.

[Key words] microRNA-126; primary dental pulp stem cells; angiogenic differentiation; antigens, CD31; vascular endothelial growth factor receptor 2; angiopoietin-1

^{*} 基金项目:天津市口腔医院硕士重点/青年项目(2019RSQN01)。 作者简介:王颖铤谣(1991—),硕士,主要从事医学口腔研究。

研究发现,人乳牙牙髓干细胞(stem cells from pulp of deciduous teeth, SHED)是一种多能干细胞,可在体外不同诱导物作用下定向诱导分化为神经细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成骨细胞及血管内皮细胞,且可分化为与宿主血脉相连的功能性血管,这对肿瘤、创伤、心血管疾病、器官移植等血管移植技术有重大意义^[1-2]。牙髓血管系统是为牙髓提高营养物质及排出代谢废物的通道,牙髓血管组织再生可有效恢复牙髓生理功能,可有效治疗牙髓病、根尖周病等常见口腔疾病。血管内皮细胞是一类多功能细胞,对机体内环境稳定及免疫功能的维持起重要作用,但自体来源 SHED 有限且增殖能力不强,在临床应用中严重受限^[3-5]。微 RNA-126(microRNA-126, miR-126)是一个血管内皮细胞损伤标志物,可在人类心脏、内皮系统、人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)中高度表达,与缺血相关管腔形成密切相关,然而关于 miR-126 与人 SHED 成血管分化的关系尚鲜有报道^[6-8]。因此本研究拟以人 SHED 为载体,探究 miR-126 对其成血管分化的影响,以期快速有效诱导血管生成、提高临床应用价值提供一定参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月至 2019 年 9 月本院口腔科收治的 30 例健康儿童滞留乳牙,纳入标准:(1)儿童年龄 6~10 岁;(2)样本采集及资料收集均取得研究对象及其监护人同意,并签字确认;(3)所有乳牙拔除前牙体周围组织均经充分消毒,拔除乳牙置于预冷含 3 倍青链霉素 DMEM 培养基中短暂密封保存,且在 4 h 内于无菌细胞室内进行原代 SHED 细胞提取。排除标准:(1)有牙髓炎症或感染性疾病者;(2)牙根吸收大于乳前牙一半者;(3)有严重呼吸、消化、血液等系统疾病者。

1.2 主要试剂及仪器

I 型胶原酶(货号 S00053)、胎牛血清(FBS,货号 10099141)均购自美国 Gibco 公司;H-DMEM 培养基(货号 12491-023)购自美国 Thermo Fisher 公司;miR-126 mimics、miR-126 mimics 对照序列及引物均由上海吉玛生物科技有限公司合成;TRIzol 试剂(货号 R0016)购自上海碧云天公司;Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR 试剂盒(货号 68314)、TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus, 货号 RR820A)、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis 试剂盒(货号 68315)、PrimeScript[™] II 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒(货号 6210A)均购自大连宝生物科技有限公司;Lipofectamine[®] 2000 转染试剂盒(货号 11668-1.5 mL)购自美国 Invitrogen 公司;兔抗血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1, 又称 CD31, 货号 ab32457)、兔抗血管内皮细胞生长因子受体 2

(VEGFR2, 货号 ab11939)、兔抗血管生成素-1(ANG-1, 货号 ab8451)、兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 货号 ab181602)、山羊抗兔 IgG(货号 ab205718)购自英国 Abcam 公司。FC 酶标仪、Forma Steri-Cycle i160 5% CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司;IX75 倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 方法

1.3.1 SHED 细胞分离、培养及鉴定

无菌环境下提取乳牙牙髓组织,剪碎置于 I 型胶原酶、中性蛋白酶混合液中 37 ℃ 消化 1 h,然后用 200 目细胞筛过滤,1 000 r/min 离心 5 min,DMEM 生长培养基(含 10% FBS、1% 青链霉素)重悬细胞沉淀然后转入 25 cm² 细胞培养瓶并添加 5 mL 生长培养基,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 天换液 1 次,待细胞汇合至 70% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化传代、扩大培养,传至 3~5 代 SHED 细胞进行后续试验。用倒置相差显微镜观察并拍照,记录 SHED 细胞生长状况及形态。

1.3.2 SHED 细胞转染及分组

取生长状态良好的 3~5 代 SHED 细胞消化计数后以 1×10^5 /mL 接种于 6 孔板,待 SHED 细胞完全贴壁后,将生长培养基更换为诱导培养基(2% FBS + 1% 青链霉素 + 50 μ g/L 血管内皮生长因子 + 10 μ g/L 成纤维细胞生长因子 + 0.1 mg/L 地塞米松 + 2 g/L 牛血清清蛋白),培养 2 d 后转染 miR-126 mimics 对照序列(阴性对照组)及 miR-126 mimics 序列(过表达组),之后每 2 天换液 1 次至培养第 14 天,收集细胞进行后续试验。另以无转染的诱导培养基培养的 SHED 细胞作为空白对照组,每组均设 6 个复孔。转染采用 Lipofectamine[®] 2000 转染法,具体步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 Matrigel 血管生成实验

试验前 1 天将 -80 ℃ 保存的 Matrigel 胶转移至 4 ℃ 冰箱缓慢融化,于冰上用预冷枪头将 Matrigel 胶移至预冷 48 孔板,每孔 200 μ L,迅速置于 37 ℃ 培养箱中孵育 30 min,消化 3 组 SHED 细胞,制成 3×10^5 /mL 单细胞悬液,分别取 100 μ L 滴入已凝固 Matrigel 表面,并继续于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱常规培养,倒置显微镜下观察 3 组 SHED 细胞成血管分化情况。

1.3.4 SHED 细胞中 miR-126 水平及血管生成相关基因 mRNA 水平检测

收集 3 组 SHED 细胞,采用 TRIzol 试剂提取总 RNA,并反转录得到 cDNA,分别以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-PCR)扩增,引物序列详见表 1。RT-qPCR 采用 20 μ L 反应体系:SYBR Green Premix(2 $\times$) 10 μ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μ L, cDNA(50 ng/ μ L) 2 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, ddH₂O 6.0 μ L。反应条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s, 60 ℃ 34 s,

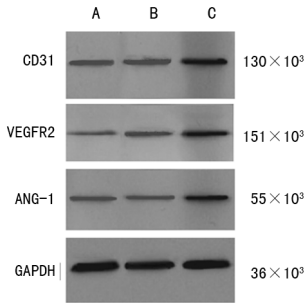
表 2 各组细胞 CD31、VEGFR2、ANG-1 mRNA 及蛋白相对表达水平比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	CD31		VEGFR2		ANG-1	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
空白对照组	1.12±0.15	0.34±0.05	1.02±0.11	0.23±0.04	1.00±0.10	0.27±0.06
阴性对照组	1.17±0.18	0.35±0.06	1.04±0.12	0.26±0.05	1.01±0.12	0.25±0.04
过表达组	4.72±1.11 ^{ab}	0.71±0.08 ^{ab}	3.95±1.03 ^{ab}	0.58±0.07 ^{ab}	3.68±1.01 ^{ab}	0.54±0.06 ^{ab}
F	59.592	63.984	47.048	163.268	41.105	53.659
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与空白对照组比较;^b: $P<0.05$,与阴性对照组比较。

2.3 血管分化相关基因及蛋白相对表达水平比较

与空白对照组、阴性对照组比较,miR-126 过表达组 SHED 中 CD31、VEGFR2、ANG-1 mRNA 及蛋白表达水平均显著增加($P<0.05$),见表 2、图 3。



A:空白对照组;B:阴性对照组;C:过表达组。

图 3 Western blot 检测 CD31、VEGFR2、ANG-1 表达

3 讨 论

SHED 由 2003 年 MIURA 等^[9]首次分离完成,其具有间充质干细胞的生物学特征,可自我更新和高度增殖,还具有向内皮细胞分化的潜能,诱导物决定其分化方向。SHED 可在适宜体内或体外诱导环境下具有分化为牙本质细胞、肌细胞、成骨细胞、内皮细胞、干细胞、脂肪细胞、基质细胞等多种子代组织细胞的能力。SHED 可无创取材,患儿及家长接受度高,不受伦理学争议,且相对于成人牙髓干细胞,其凋亡性衰老性低,增殖活性高,短期内可获得研究需要细胞量且可传至 10 代^[10],在干细胞治疗应用时可避免交叉感染,降低免疫排斥反应^[11-12],可为临床常见牙髓炎、根尖病等治疗,促进牙髓活力恢复提供新的思路,应用前景广阔。因此本研究选择 SHED 作为研究材料,具有可行性,以期能为 SHED 研究进展及未来乳牙干细胞在牙周炎治疗中成熟应用提供基础。本研究在倒置相差显微镜下鉴定 SHED 发现采用成血管诱导培养基定向分化诱导 14 d 后 SHED 呈长梭形紧密排列,为典型血管内皮样细胞,提示细胞分离诱导成功,可用于下游试验。

微 RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性非编码小 RNA,可通过抑制其靶蛋白翻译发挥作用,人类至少有 30% 基因受 miRNA 调控,其在机体多种生

理病理过程中发挥重要作用。miR-126 是一种调节血管发展的 miRNA,有保护血管和粥样硬化的功能^[13-14]。王璐等^[6]研究报道,miR-126 过表达可上调 HUVEC 中 VEGF、ANG-1 表达促进其体外管腔形成能力及血管形成率。CHEN 等^[15]研究报道,过表达 miR-126 可通过激活 PI3K/AKT 通路而上调其下游 Caspase-9、Bax、基质金属蛋白-2(MMP-2),下调 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2),抑制血管内皮细胞(VEC)凋亡。本研究结果发现,与空白对照组及阴性对照组比较,过表达组 SHED 细胞血管样结构明显增多,提示过表达 miR-126 可能促进 SHED 细胞成血管分化。血管网络的建立需要多种细胞因子调节共同促进血管再生和分化,局部微血管新生和稳定对牙槽骨缺损修复再生有重要意义。血管生成因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bG-FG)和 ANG 等,VEGF 可通过与其受体 VEGFR2 结合,增加血管通透性,引起内皮细胞迁移,促进新生血管形成,而血管构建、成熟及稳定需要 ANG-1 及 Tie 家族参与^[16-19]。郑茜等^[20]研究报道,miR-126 过表达可通过抑制 MAPK 信号通路下调 Ki-67、PCNA、MMP-9、VEGF,抑制 oxLDL 处理的血管平滑肌细胞增殖和迁移。本研究结果发现,与空白对照组、阴性对照组比较,过表达组 SHED CD31、VEGF、ANG-1 mRNA 及蛋白表达水平显著增加,CD31 是免疫球蛋白超家族成员,可在成熟和未成熟血管中表达,是临床常见新生血管标志物,提示过表达 miR-126 可能通过诱导 CD31 表达,上调 VEGF、ANG-1 表达,促进 SHED 成血管分化。

综上所述,过表达 miR-126 可能通过上调 CD31、VEGF、ANG-1 表达促进 SHED 成血管分化,可能对临床牙髓疾病治疗及血管组织工程技术发展有一定参考价值。但关于 miR-126 影响 SHED 成血管分化的具体信号通路尚不清楚,有待进一步深入探究。

参考文献

[1] MOJARAD F, AMIRI I, RAFATJOU R, et al.

- The effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on osteogenic differentiation of stem cells from dental pulp of exfoliated deciduous teeth[J]. *J Dent (Shiraz)*, 2016,17(4):348-353.
- [2] NAKAJIMA K,KUNIMATSU R,ANDO K,et al. Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth,human dental pulp stem cells and human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2018,497(3):876-882.
 - [3] 杨雪,倪世磊,王婷婷,等. 载重组人血管内皮生长因子 165 的邻苯二酚壳聚糖促进乳牙牙髓干细胞血管形成的研究[J]. *口腔医学研究*,2019,35(4):28-32.
 - [4] 刘琼,文军,吴小明,等. 体外培养乳牙牙髓干细胞向血管内皮细胞定向分化的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*,2019,29(1):29-34.
 - [5] XU J,GONG T,WANG Y,et al. Inhibition of TGF- β Signaling in SHED Enhances Endothelial Differentiation[J]. *J Dent Res*,2018,97(2):218-225.
 - [6] 王璐,张洲铭,金诺,等. miR-126 多基因靶向调控血管再生的研究[J]. *实用口腔医学杂志*,2019,35(3):340-344.
 - [7] TANG F,YANG T L. MicroRNA-126 alleviates endothelial cells injury in atherosclerosis by restoring autophagic flux via inhibiting of PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2018,495(1):1482.
 - [8] 吴雪纯,贾永平. miR-126 在心血管疾病中的研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*,2016,10(12):1800-1803.
 - [9] MIURA M,GRONTHOS S,ZHAO M,et al. SHED:Stem cells from human exfoliated deciduous teeth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2003,100(10):5807-5812.
 - [10] 孙艳艳,袁梦桐,胡伟平. 牙髓干细胞的研究与应用 [J]. *实用口腔医学杂志*,2016,32(3):426-429.
 - [11] MEAD B,LOGAN A,BERRY M,et al. Concise review:dental pulp stem cells,a novel cell therapy for retinal and central nervous system repair[J]. *Stem Cells*,2017,35(1):61-67.
 - [12] WERLE S B,LINDEMANN D,STEFFENS D,et al. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells[J]. *Clin Oral Investig*,2016,20(1):75-81.
 - [13] CHISTIYAKOV D A,OREKHOV A N,BOBRY-SHEV Y V. The role of miR-126in embryonic angiogenesis,adult vascular homeostasis,and vascular repair and its alterations in atherosclerotic disease [J]. *J MolCell Cardiol*,2016,97(1):47-55.
 - [14] 郑茜,张勇,杨东伟. MiR-126 通过 MAPK 信号通路抑制 oxLDL 处理的血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. *中国免疫学杂志*,2018,34(2):192-198.
 - [15] CHEN L,WANG J,WANG B,et al. MiR-126 inhibits vascular endothelial cell apoptosis through targeting PI3K/Akt signaling[J]. *Ann Hematol*,2016,95(3):365-374.
 - [16] 胡建新,席晓甜,王晓敏,等. 地锦草调控 NF- κ B/VEGF 信号通路抑制肿瘤血管生成的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*,2018,24(23):165-170.
 - [17] MAHAJAN K D,NABAR G M,XUE W,et al. Mechanotransduction effects on endothelial cell proliferation via CD31 and VEGFR2: implications for immunomagnetic separation[J]. *Bio-technol J*,2017,12(9):1600750.
 - [18] RAKOCEVIC J,ORLIC D,MITROVIC-AJTIC O,et al. Endothelial cell markers from clinician's perspective[J]. *Exp Mol Pathol*,2017,102(2):303-313.
 - [19] 赵松峰,张晓坚,赵高峰. 姜黄素下调人血管瘤内皮细胞中血管内皮细胞生长因子和血管生成素 2 的表达及促进其凋亡的机制[J]. *中华实验外科杂志*,2018,35(4):649-651.
 - [20] 郑茜,张勇,杨东伟. MiR-126 通过 MAPK 信号通路抑制 oxLDL 处理的血管平滑肌细胞增殖和迁移[J]. *中国免疫学杂志*,2018,34(2):192-198.