

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1561-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250612

过表达 *circRNAs* 修饰牙髓干细胞来源的外泌体对人脐静脉内皮细胞血管生成的促进作用

刘景, 王艳, 黄旭

(新疆医科大学第五附属医院口腔科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:** 探讨过表达环状RNA (*circRNAs*) 修饰牙髓干细胞 (DPSCs) 来源外泌体 (Exo) 促进人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 血管生成在牙髓血管再生中的作用, 并阐明相关分子机制。**方法:** 分离乳齿源-、成人智齿源-和老年人恒牙源-原代 DPSCs。流式细胞术检测 3 种原代 DPSCs 表面标志物蛋白阳性表达情况。使用 3 种来源的 DPSCs 与 HUVECs 建立共培养体系, 将细胞分为乳牙源-原代 DPSCs 组、成人智齿源-原代 DPSCs 组和老年人恒牙源-原代 DPSCs 组。另将细胞分为 Exo-OE vector 组、Exo-*circ_0026827* OE 组和 Exo-*circRNA 124534* OE 组, 分别转染腺病毒介导的 OE vector、*circ_0026827* OE 和 *circRNA124534* OE 后, 分离其细胞培养上清液 Exo。细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测各组 HUVECs 增殖活性, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组 Exo 中血管生成相关 *circRNAs* 表达水平, Western blotting 法检测共培养细胞上清中 Exo 标志物相关蛋白表达水平。验证各组细胞 Exo 摄取情况, 血管生成-诱导实验检测细胞上清液中 Exo 分离情况。**结果:** 大部分细胞表面标志物表达情况为白细胞分化抗原 44 (CD44)(+)、白细胞分化抗原 34 (CD34)(-) 和基质细胞抗原 1 (Stro-1)(+), 鉴定为原代 DPSCs。CCK-8 法检测, 与乳牙源-原代 DPSCs 组比较, 成人智齿源-原代 DPSCs 组和老年人恒牙源-原代 DPSCs 组共培养的 HUVECs 增殖活性明显降低 ($P < 0.01$); 与成人智齿源-原代 DPSCs 组比较, 老年人恒牙源-原代 DPSCs 组共培养的 HUVECs 增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。3 种共培养体系细胞培养上清液 Exo 中白细胞分化抗原 9 (CD9)、热激蛋白 70 (HSP70) 和肿瘤易感基因 101 (TSG101) 均表达阳性。3 种共培养体系细胞上清液中 Exo 的粒径为 50~110 nm。RT-qPCR 法检测, 与乳牙源-原代 DPSCs 组比较, 成人智齿源-原代 DPSCs 组和老年人恒牙源-原代 DPSCs 组 Exo 中 *circRNA124534* 和 *circ_0026827* mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与成人智齿源-原代 DPSCs 组比较, 老年人恒牙源-原代 DPSCs 组 Exo 中 *circRNA124534* 和 *circ_0026827* mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.01$); 3 组 Exo 中 *circ*-信号诱导增殖相关基因 1 (*SIPAIL1*) mRNA 表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blotting 法检测, 与 Exo-OE vector 组比较, Exo-*circ_0026827* OE 组 HUVECs 中磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38 MAPK)、血管内皮生长因子 A (VEGF-A)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2)、血管发生素 1 (Ang-1)、基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与 Exo-OE vector 组比较, Exo-*circRNA124534* OE 组 HUVECs 细胞中 p-p38 MAPK、VEGF-A、VEGFR2、Ang-1、SDF-1 和 MMP-9 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。各组 HUVECs 均成功摄取 Exo。Exo-OE vector 组 HUVECs 呈现较为平铺的生长状态; 与 Exo-OE vector 组比较, Exo-*circ_0026827* OE 组和 Exo-*circRNA124534* OE 组 HUVECs 呈现网状排列的生长状态, 并有排列成管状的趋势。**结论:** 过表达 *circ_0026827* 和 *circRNA124534* 修饰乳牙 DPSCs 来源的 Exo 对 HUVECs 血管生成有一定促进作用。

[收稿日期] 2024-12-11 [录用日期] 2025-02-22

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目 (2021D01C431)

[作者简介] 刘景 (1980-), 女, 北京市人, 主任医师, 医学硕士, 主要从事牙体牙髓病诊疗方面的研究。

[通信作者] 刘景, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: chan039@sina.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

[关键词] 牙髓血管再生; 牙髓干细胞; 人脐静脉内皮细胞; 环状RNAs; 外泌体
[中图分类号] R781.3 [文献标志码] A

Promoting effect of overexpressed *circRNAs*-modified dental pulp stem cell-derived exosomes on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells

LIU Jing, WANG Yan, HUANG Xu

(Department of Stomatology, Fifth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the role of circular RNAs (*circRNAs*)-overexpressing modified dental pulp stem cells (DPSCs)-derived exosomes (Exo) in promoting angiogenesis of the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in dental pulp vascular regeneration, and to clarify the related molecular mechanism. **Methods:** The primary DPSCs derived from deciduous teeth, adult wisdom teeth, and elderly permanent teeth were isolated. Flow cytometry was used to detect the positive expression of surface marker proteins in three kinds of primary DPSCs. Co-culture systems were established using three sources of DPSCs and HUVECs, and the cells were divided into deciduous teeth-derived primary DPSCs group, adult wisdom teeth-derived primary DPSCs group, and elderly permanent teeth-derived primary DPSCs group. Additionally, the cells were divided into Exo-OE vector group, Exo-*circ_0026827* OE group, and Exo-*circRNA124534* OE group; after transfection with adenovirus-mediated OE vector, *circ_0026827* OE, and *circRNA124534* OE, respectively, the Exo from the cell culture supernatant were isolated. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation activities of the HUVECs in various groups; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of angiogenesis-related *circRNAs* in the Exo in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of Exo marker-related proteins in the supernatant of co-cultured cells. The uptakes of Exo by the cells in various groups were verified; angiogenesis induction experiment was used to detect the isolation of Exo from cell supernatant. **Results:** Most cells expressed CD44(+), CD34(-), and Stro-1(+), and were identified as primary DPSCs. The CCK-8 assay results showed that compared with deciduous teeth-derived primary DPSCs group, the proliferation activity of the HUVECs co-cultured in adult wisdom teeth-derived primary DPSCs group and elderly permanent teeth-derived primary DPSCs group was significantly decreased ($P < 0.01$); compared with adult wisdom teeth-derived primary DPSCs group, the proliferation activity of the HUVECs co-cultured in elderly permanent teeth-derived primary DPSCs group was significantly decreased ($P < 0.01$). cluster of differentiation 9 (CD9), heat shock protein 70 (HSP70), and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) were positively expressed in the Exo from the cell culture supernatant of three co-culture systems. The particle sizes of Exo from the cell supernatant in three co-culture systems were 50–110 nm. The RT-qPCR results showed that compared with deciduous teeth-derived primary DPSCs group, the mRNA expression levels of *circRNA124534* and *circ_0026827* in the Exo in adult wisdom teeth-derived primary DPSCs group and elderly permanent teeth-derived primary DPSCs group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with adult wisdom teeth-derived primary DPSCs group, the mRNA expression levels of *circRNA124534* and *circ_0026827* in the Exo in elderly permanent teeth-derived primary DPSCs group were significantly decreased ($P < 0.01$); there was no statistically significant difference in the *circ*-signal-induced proliferation-associated 1 like 1 (*SIPA1L1*) mRNA expression level among three groups ($P > 0.05$). The Western blotting results showed that compared with

Exo-OE vector group, the protein expression levels of phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), angiopoietin 1 (Ang-1), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in the HUVECs in overexpression *circ_0026827* and *circRNA124534* were significantly increased ($P < 0.01$); compared with Exo-OE vector group, the protein expression levels of p-p38 MAPK, VEGF-A, VEGFR2, Ang-1, SDF-1, and MMP-9 in the HUVECs in Exo-*circRNA124534* OE group were significantly increased ($P < 0.01$). The HUVECs in various groups successfully took up Exo. The HUVECs in Exo-OE vector group showed a relatively flattened growth state. Compared with Exo-OE vector group, the HUVECs in Exo-*circ_0026827* OE group and Exo-*circRNA124534* OE group showed a reticularly arranged growth state and a tendency to form tubular structures. **Conclusion:** The deciduous teeth DPSCs-derived Exo modified by overexpression *circ_0026827* and *circRNA124534* has a certain promoting effect on angiogenesis of the HUVECs.

KEYWORDS Dental pulp vascular regeneration; Dental pulp stem cells; Human umbilical vein endothelial cells; *Circular RNAs*; Exosomes

牙髓炎是由于损伤或感染引起的牙髓炎症。根尖牙周炎 (apical periodontitis, AP) 是由牙髓源性病原体引起的根周组织的炎症和损伤, 通常是牙髓坏死的结果^[1]。全球范围内年龄标准化患病率最高的疾病已被确定为口腔疾病, 其中恒牙龋齿在所有口腔疾病中患病率最高^[2]。全球 1/2 的成年人中至少有一颗牙齿患有 AP, 而全球至少有一颗牙齿有 AP 的患病率为 15%~85%^[3]。就牙髓炎而言, 评估其真实患病率更具挑战性, 因为高达 40% 的个体牙髓会感染, 而许多牙髓炎在没有症状的情况下进展至坏死^[4]。目前的治疗方法是根管治疗 (root canal therapy, RCT) 和牙髓血管重建术。尽管临床表现为完全恢复和组织学重建, 但真正的牙髓组织再生仍远未实现。再生牙髓学的目标是促进炎症或坏死牙齿恢复正常的牙髓功能^[5]。牙髓是一种高度血管化的组织, 需要足够的血液供应才能成功再生, 新再生的牙本质-牙髓组织必须与原始组织相似, 由组织良好的结缔组织和血管丰富、神经支配的活牙髓组成^[6]。因此, 牙髓的血管再生对于再生牙髓十分重要。

牙髓干细胞 (dental pulp stem cells, DPSCs) 属于间充质干细胞, 可以分化成多系细胞, 如脂肪细胞、神经细胞、血管内皮细胞和成骨细胞等^[7]。人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 是用于血管生成的重要间充质干细胞类型之一。但无论是在体向小鼠模型单独移植 DPSCs 或单独移植 HUVECs, 均不能形成新生血管腔内有足够红细胞的血管样结构。此类新生血管腔内需有红细胞存在, 才能表明在血管

周基质网中形成的新生血管样结构与宿主循环系统之间形成了良好的吻合^[8]。因此, 有必要深入研究 DPSCs 和 HUVECs 的混合培养是否具有促进形成血管腔内存在足够红细胞且与宿主循环系统之间能够形成良好吻合血管样结构的能力。此类研究在国内外少有报道。环状 RNAs (circular RNAs, circRNAs) 是一类调节性 RNAs, 与线性 RNAs 比较, 其通过反向剪接形成了圆形共价封闭结构, 对外切酶具有更大的抗性, 因此能够以细胞和组织特异性的方式高水平积累, 在调节性 RNAs 研究领域受到了极大的关注^[9-10]。circRNAs 以其独特的调控方式与多种病理生理过程密切相关, 包括作为微小 RNA (micro RNA, miRNA) 的海绵体竞争性结合和抑制 miRNAs、与 RNA 结合蛋白形成复合体并调节蛋白-蛋白相互作用及部分 circRNAs 还可能被翻译成功能蛋白等参与基因表达调控或直接参与执行细胞功能。本研究探讨外泌体 (exosome, Exo) 对 HUVECs 的血管生成能力的影响, 并阐明其相关机制, 旨在为 AP 的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 HUVECs 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。RNA 纯化试剂盒、TIANScrip II cDNA 第一链合成试剂盒、FastUniversal 快速荧光定量 PCR 预混试剂 (SYBR Green) 和 Bradford 蛋白质定量试剂盒购自天根生化 (北京) 科技有限公司 (中国), IlluTINGO 系列染料购自北京云肽生物科技有限公司, Matrigel 购自美国 BD 公司, 内皮细胞生长培养基 2 (endothelial cell growth medium-2, EGM-2) 完全

培养液(含生长因子)购自瑞士LONZA公司, FITC-标记免疫球蛋白G2a同型对照(IgG2a Isotype control)抗体或FITC-标记抗人白细胞分化抗原44(cluster of differentiation 44, CD44)、FITC-标记抗人白细胞分化抗原34(cluster of differentiation 34, CD34)或FITC-标记抗人基质细胞抗原1(stromal cell antigen-1, Stro-1)抗体、抗人磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase, p-p38 MAPK)多抗、血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)单抗、血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、血管发生素1(angiopoietin-1, Ang-1)单抗、基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)单抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多抗一抗、山羊抗兔免疫球蛋白G(轻链+重链)[immuno globulin G (light+heavy chain), IgG (H+L)]二抗和总Exo分离试剂均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。circRNA124534 OE和circ_0026827 OE过表达扩增引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司代为合成,腺病毒载体pADV-CMV-S-circRNA购自和元生物技术(上海)股份有限公司,腺病毒颗粒的包装实验也委托其代为完成。Attune NxT流式细胞仪和Multiskan FC酶标仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,ECLIPSE LV100N POL光学显微镜和ECLIPSE Ts2R倒置荧光显微镜购自日本尼康株式会社。

1.2 3种来源DPSCs的分离 1颗乳齿牙髓组织取自一名8岁儿童(女性)的乳齿。纳入标准为乳牙无临床病理特征,为健康牙齿,处于脱落状态,因矫形治疗而进行拔牙。排除标准为牙齿健康但无拔牙指征或牙齿有某些病理指征。父母接受孩子参与本研究,并签署书面知情同意书,同意捐献乳齿牙髓组织。

1颗成人智齿牙髓组织取自一名36岁成年男性的智齿。纳入标准为智齿无临床病理特征,为健康牙齿,因矫形治疗而进行拔牙。排除标准为牙齿健康但无拔牙指征或牙齿有某些病理指征。本人同意参与本研究,并签署书面知情同意书,同意捐献智

齿牙髓组织。

1颗老年人恒牙牙髓组织取自一名69岁成年男性的恒牙。纳入标准为恒牙因磨耗导致牙髓暴露;就诊前无自发疼痛或冷热刺激痛,临床检查无叩痛;露髓直径 $<1\text{ mm}$;牙周健康,无牙周袋。排除标准为患有系统性疾病或罕见病患者。本人同意参与本研究,并签署书面知情同意书,同意捐献智齿牙髓组织。

牙齿样本采集当天,用2%氯己定浸湿纱布直接清洁牙面5 min。向50 mL Falcon离心管中加入适量含 $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素、 $1\ 000\ \text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素和 $0.25\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两性霉素B的 $1\times$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS),将采集获得的牙齿样本浸没其中,在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下运送至实验室。在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下在上述 $1\times$ PBS缓冲液中将牙髓组织分割成尽可能小的小块,置于GentleMACS解离器上解离。然后以 $300\ \text{g}$ 离心10 min。收集下层细胞沉淀,加入终浓度为 $3\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ I型胶原酶和 $4\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 中性蛋白酶,将悬浮液置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 下孵育30 min。结束后再次以 $300\ \text{g}$ 离心10 min。弃上清液,加入含10%胎牛血清的5 mL DMEM F12完全培养液洗涤1次,使酶失活。然后悬浮液过 $80\ \mu\text{m}$ 细胞筛网,最后加入1 mL DMEM F12完全培养液重悬原代DPSCs并培养,使用传代5代以内的原代DPSCs进行后续实验。

1.3 流式细胞术检测3种原代DPSCs表面标志物蛋白阳性表达 制备终浓度为 $1\times 10^7\ \text{L}^{-1}$ 的原代DPSCs单细胞悬液。取 $100\ \mu\text{L}$,分别加入FITC-标记Isotype control抗体或FITC-标记抗人CD44、抗人CD34或抗人Stro-1抗体, $4\ ^\circ\text{C}$ 下避光孵育1 h。上机流式细胞仪进行分析检测,并分别计数 $\text{CD}44^+$ 、 $\text{CD}34^+$ 或 Stro-1^+ 细胞所占百分率,即为蛋白阳性表达情况^[11]。

1.4 原代DPSCs与HUVECs共培养体系建立、细胞分组和处理 采用24孔细胞培养板细胞小室进行共培养。下层24孔细胞培养板培养原代DPSCs,上层细胞小室培养HUVECs。培养液为含10%胎牛血清的DMEM F12完全培养液。根据不同来源原代DPSCs与HUVECs的共培养体系,将细胞分为乳牙源-原代DPSCs组、成人智齿源-原代DPSCs组和老年人恒牙源-原代DPSCs组,其中的原代DPSCs分别来源于乳牙、成人智齿和老年人恒牙。

1.5 细胞转染和分组 采用腺病毒载体pADV-

CMV-S-circRNA 介导 *circRNAs* 的过表达。*circRNA124534* OE 和 *circ_0026827* OE 过表达扩增引物委托上海生工生物(中国)代为合成^[12-13]。将上述2种过表达扩增产物接入腺病毒载体 pADV-CMV-S-circRNA 的多克隆位点中,并委托上海和元生物代为完成腺病毒颗粒的包装实验。OE vector 组为单纯腺病毒空载颗粒。

将细胞分为 Exo-OE vector 组、Exo-*circ_0026827* OE 组和 Exo-*circRNA124534* OE 组。3 组分别为乳牙-源原代 DPSCs 分别转染腺病毒介导的 OE vector、*circ_0026827* OE 和 *circRNA124534* OE 后,分离其细胞培养上清液 Exo。将 100 μ L 上述不同来源 Exo 加入 HUVECs 中,根据实验要求处理 HUVECs。

1.6 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法检测 3 种共培养体系中 HUVECs 增殖活性 原代 DPSCs 与 HUVECs 的共培养体系连续培养 48 h 后,取下上层细胞小室,置于一个新的 24 孔细胞培养板中,下层无细胞培养物。使用 CCK-8 试剂盒检测各组细胞增殖活性,按照试剂盒说明书操作,向细胞培养物中加入 CCK-8 试剂,再连续培养 6 h,采用酶标仪于 450 nm 波长处测定每孔吸光度 (A) 值,以 A 值代表细胞增殖活性,实验设置 6 个重复。

1.7 细胞培养上清液中 Exo 的分离和鉴定 使用总 Exo 分离试剂分离原代 DPSCs 培养上清液中的 Exo。采用 Western blotting 法测定 Exo 标志物白细胞分化抗原 9 (cluster of differentiation 9, CD9)、热激蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 和肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101) 的蛋白表达水平^[14]。采用透射电镜观察并拍摄 Exo 形态表现。采用纳米粒径分析仪分析测定 Exo 尺寸分布和浓度。

1.8 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测各组 Exo 中血管生成相关 *circRNAs* 表达水平 采用 RNA 纯化试剂盒提取 Exo 总 RNA。采用 TIANScript II cDNA 第一链合成试剂盒反转录合成 cDNA。采用 FastUniversal 快速荧光定量 PCR 预混试剂 (SYBR Green) 进行 RT-qPCR 反应。扩增引物为 *circRNA124534* 上游引物: 5'-TGAGCTTGTGAGTGAGTGGT-3', *circRNA124534* 下游引物: 5'-GCAAGGAGAATGGCGAGATG-3'。*circ_*信号诱导增殖相关基因 1 (signal-induced proliferation-associated

1 like 1, *SIPA1L1*) 上游引物: 5'-TGAAACTGG-ATGAACAAGGGAG-3', *circ_SIPA1L1* 下游引物: 5'-GCCGTCTGTGCCAACAAC-3'。*circ_0026827* 上游引物: 5'-GCTGAAGAATTAAATC-3', *circ_0026827* 下游引物: 5'-CGAAGTTCCGTCTACGGC-3'。*GAPDH* 上游引物: 5'-CGGACCAATACGACCAAATCCG-3', *GAPDH* 下游引物: 5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3'。

1.9 Western blotting 法检测共培养细胞上清中 Exo 标志物 CD9、HSP70 和 TSG101 蛋白表达水平

每皿 6 孔细胞培养板细胞培养物中加入 1 mL 含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液裂解细胞。随后提取细胞总蛋白质。采用 Bradford 蛋白质定量试剂盒定量总蛋白质浓度。按照标准流程进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 随后采用半干转印法将 PAGE 上的总蛋白质电转印至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭。滴加一抗工作液, 抗人 p-p38 MAPK (1:1 500)、VEGF-A (1:2 000)、VEGFR2 (1:2 000)、Ang-1 (1:2 000)、SDF-1 (1:1 500)、MMP-9 (1:2 000) 和 GAPDH (1:2 000) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 下使其与 PVDF 膜共同孵育过夜。次日, 滴加二抗工作液, 山羊抗兔 IgG 二抗 (1:6 000), 室温使其与 PVDF 膜共同孵育 1 h。使用超敏 ECL 化学发光底物对目的条带进行显影。

1.10 各组细胞 Exo 摄取情况验证 采用 IlluTINGO 系列染料对 Exo 和细胞质膜进行染色。EvLINK 染色标记 Exo, CellLINK 染色标记细胞质膜。采用倒置荧光显微镜观察并拍照 Exo 和细胞质膜, 通过 Merged 图片观察 Exo 摄取至胞内的情况, 2 种染色标记存在共定位情况。具体实验操作委托北京云肽生物科技有限公司代为完成 Exo 摄取实验。

1.11 血管生成-诱导实验检测各组细胞上清液中 Exo 分离情况 6 孔细胞培养板预包被一层 Matrigel, 将 HUVECs 单独培养于 6 孔细胞培养板中, 加入 EGM-2 完全培养液 (含生长因子)。Exo-OE vector 组、Exo-*circ_0026827* OE 组和 Exo-*circRNA124534* OE 组 HUVECs 细胞培养液在诱导开始时, 分别添加乳牙-源原代 DPSCs 转染了腺病毒介导的 OE vector 或 *circ_0026827* OE, 或 *circRNA124534* OE 后, 分离获得 100 μ L 细胞上清液 Exo。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C 恒温湿润的 CO₂ 孵育箱中连续诱导 48 h, 光学显微

镜下镜检观察并拍照。

1.12 统计学分析 采用GraphPad v8软件进行统计学分析。计量数据包括各组原代DPSCs表面标志物CD44、CD34和Stro-1蛋白表达阳性率、细胞增殖活性、细胞中*circRNAs*表达水平和共培养细胞上清中Exo标志物CD9、HSP70和TSG101蛋白表达水平,均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,2组间样本均数比较采用独立样本*t*检验,组间样本均数两两比较采用事后Tukey's检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

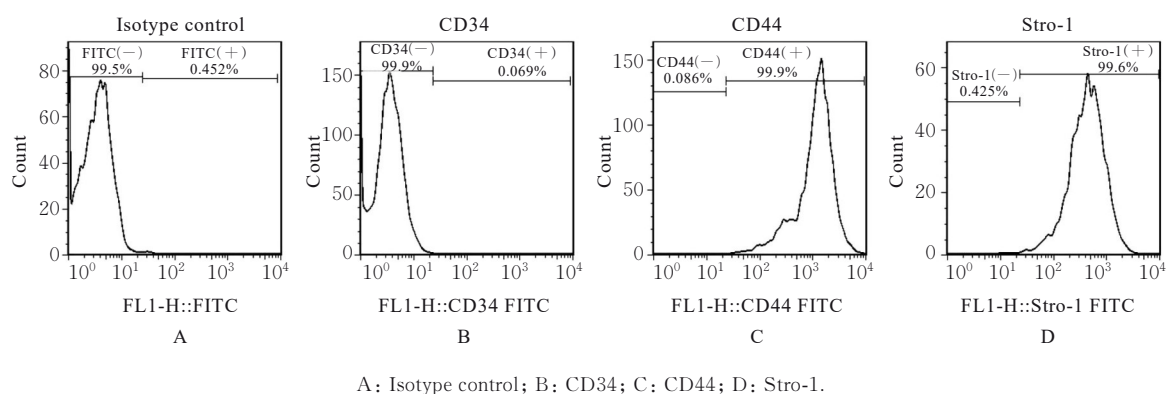
2 结果

2.1 3种原代DPSCs表面标志物蛋白阳性表达情况 大部分细胞表面标志物表达情况为CD44(+),

CD34(-)和Stro-1(+),鉴定为原代DPSCs。见图1。

2.2 3种共培养体系中HUVECs增殖活性 与乳牙源-原代DPSCs组(1.78 ± 0.18)比较,成人智齿源-原代DPSCs组(1.34 ± 0.15)和老年人恒牙源-原代DPSCs组共培养的HUVECs增殖活性(0.92 ± 0.11)明显降低($P < 0.01$)。与成人智齿源-原代DPSCs组比较,与老年人恒牙源-原代DPSCs组共培养的HUVECs增殖活性明显降低($P < 0.01$)。

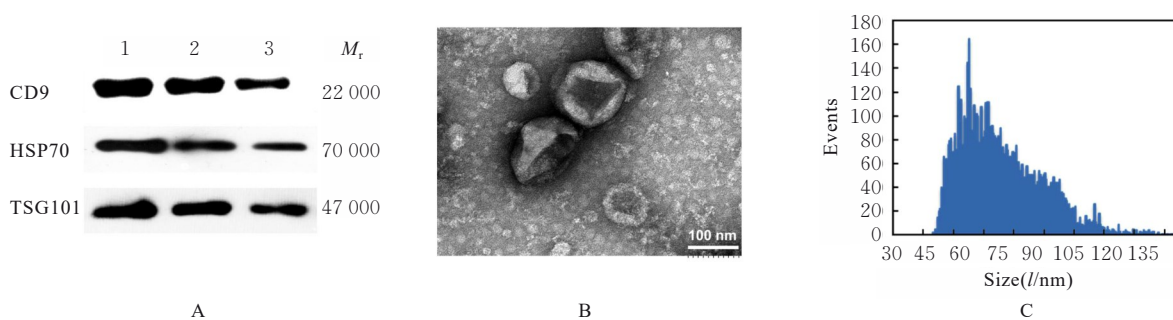
2.3 3种共培养体系细胞培养上清液中Exo的分离和鉴定 3种共培养体系细胞培养上清液Exo中CD9、HSP70和TSG101均表达阳性。3种共培养体系中细胞上清液Exo粒径为50~110 nm。见图2。



A: Isotype control; B: CD34; C: CD44; D: Stro-1.

图1 流式细胞术检测原代DPSCs表面标志物蛋白阳性表达率

Fig. 1 Positive expression rates of primary DPSCs surface markers protein detected by flow cytometry



Lane 1: Deciduous teeth derived-primary DPSCs group; Lane 2: Adult wisdom teeth derived-primary DPSCs group; Lane 3: Elderly permanent teeth derived-primary DPSCs group. A: Electrophoregram of expression of Exo markers in supernatants of cell culture; B: TEM images of Exo morphology; C: Exosomes particle size analysis results.

图2 3种共培养体系细胞上清液中Exo的鉴定

Fig.2 Identifications of Exo in cell supernatant in three kinds of co-culture systems

2.4 各组Exo中血管生成相关*circRNAs*表达水平 与乳牙源-原代DPSCs组比较,成人智齿源-原代DPSCs组和老年人恒牙源-原代DPSCs组Exo中

*circRNA 124534*和*circ_0026827* mRNA表达水平明显降低($P < 0.01$)。与成人智齿源-原代DPSCs组比较,老年人恒牙源-原代DPSCs组Exo中

circRNA124534 和 *circ_0026827* mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$)。 *circ_SIPA1L1* mRNA 表达水平组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.5 各组 HUVECs 中血管生成相关因子蛋白表达水平 与 Exo-OE vector 组比较, Exo-*circ_0026827* OE 组 HUVECs 中 p-p38 MAPK、VEGF-A、

VEGFR2、Ang-1、SDF-1 和 MMP-9 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与 Exo-OE vector 组比较, Exo-*circRNA124534* OE 组 HUVECs 中 p-p38 MAPK、VEGF-A、VEGFR2、Ang-1、SDF-1 和 MMP-9 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。见图 3、表 2 和表 3。

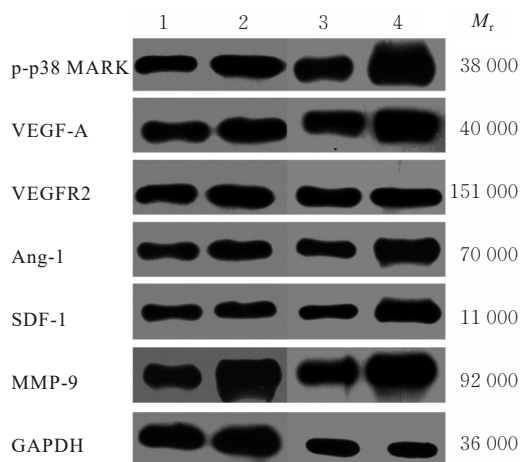
表 1 RT-qPCR 法检测各组 Exo 中血管生成相关 *circRNAs* 表达水平

Tab. 1 Expression levels of vasculogenesis-related *circRNAs* in Exo in various groups detected by RT-qPCR method

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	<i>CircRNA124534</i>	<i>Circ_SIPA1L1</i>	<i>Circ_0026827</i>
Deciduous teeth derived-primary DPSCs	1.00±0.22	1.00±0.17	1.00±0.18
Adult wisdom teeth derived-primary DPSCs	0.44±0.08*	1.17±0.24	0.57±0.05*
Elderly permanent teeth derived-primary DPSCs	0.15±0.04* [△]	1.11±0.13	0.26±0.03* [△]
<i>F</i>	59.590	1.294	69.440
<i>P</i>	<0.01	0.303	<0.01

* $P < 0.01$ compared with deciduous teeth derived-primary DPSCs group; [△] $P < 0.01$ compared with adult wisdom teeth derived-primary DPSCs group.



Lane 1: Exo-OE vector group; Lane 2: Exo-*circ_0026827* OE group; Lane 3: Exo-OE vector group; Lane 4: Exo-*circRNA124534* OE group.

图 3 各组 HUVECs 中血管生成相关蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of angiogenesis-related proteins in HUVECs in various groups

2.6 各组 HUVECs 对 Exo 摄取及 HUVECs 血管生成情况 各组 HUVECs 均成功摄取 Exo。Exo-OE vector 组 HUVECs 呈现较为平铺的生长状态。与 Exo-OE vector 组比较, Exo-*circ_0026827* OE 组和 Exo-*circRNA124534* OE 组 HUVECs 呈现网状排列的生长状态, 并有排列成管状的趋势。见图 4 和 5。

3 讨论

DPSCs 比骨髓间充质干细胞具有更高的克隆形成能力和增殖潜能。DPSCs 很容易从拔出的牙齿中分离出来, 包括乳牙或成人的智齿、恒牙等, 以一种微创的方式获得, 且无任何伦理问题。体内移植研究^[15]报道: DPSCs 的在体多向分化潜能、有益的旁分泌功能和形成牙髓样结构的潜在能力。然而, DPSCs 的存活、增殖和分化潜能受供体的年龄影响较大。从乳牙分离获得的 DPSCs 存活、增殖和分化潜能较强, 而从老年人的恒牙或智齿中分离获得的 DPSCs 则较弱。多种 *circRNAs* 参与调节 DPSCs 的多向分化。*circ_0026827* 作为 *miR-188-3p* 的海绵体上调苯氯素 1 (Beclin1) /Runt 相关转录因子 1 (Runt-related transcription factor 1, RUNX1) 信号通路促进 DPSCs 的成骨分化^[16]。*circRNA124534* 通过 *miR-496/β* 连环蛋白 (β -catenin) 信号轴促进 DPSCs 向成骨分化^[17]。*circ_SIPA1L1* 被报道通过 *miR-617/Smad* 家庭成员 3 (Smad family member 3, Smad3) 轴促进 DPSCs 的成骨分化^[18]。因此, 本研究中首先根据乳牙源、成人智齿源-和老年人恒牙源-原代 DPSCs 与 HUVECs 的共培养体系中促进 HUVECs 增殖能力的差异, 通过 RT-qPCR 法测定 *circ_0026827*、*circRNA124534* 和 *circ_SIPA1L1* 在上述 3 种来源原代 DPSCs Exo 中表达水平的差异, 结果显示: 与

表2 Western blotting法检测 Exo-OE vector 和 Exo-circ_002682 OE 组 HUVECs 中血管生成相关蛋白表达水平

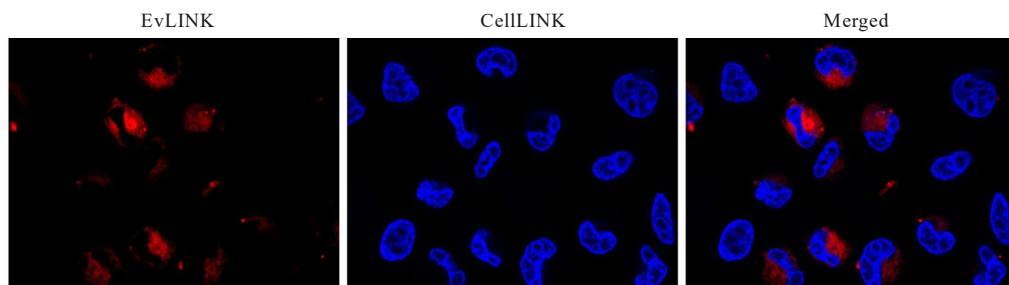
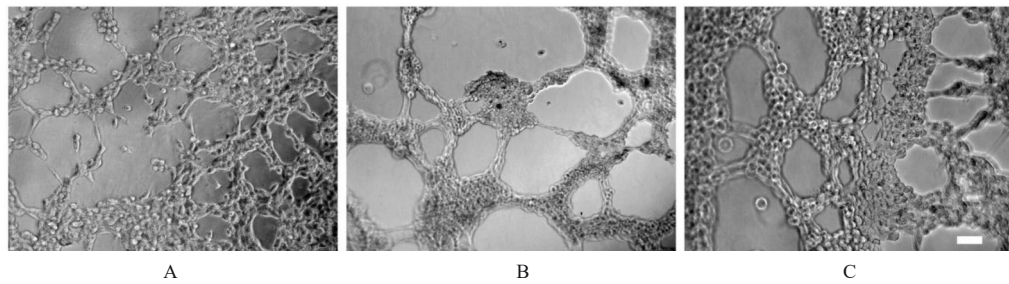
Tab. 2 Expression levels of angiogenesis related proteins in HUVECs in Exo-OE vector and Exo-circ_002682 OE groups detected by Western blotting method ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	p-p38 MAPK	VEGF-A	VEGFR2	Ang-1	SDF-1	MMP-9
Exo-OE vector	1.00±0.13	1.00±0.11	1.00±0.09	1.00±0.10	1.00±0.11	1.00±0.14
Exo-circ_002682 OE	2.11±0.19	1.64±0.16	1.82±0.15	1.57±0.12	1.33±0.08	3.24±0.27
<i>t</i>	11.81	8.07	11.48	8.94	5.94	18.04
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表3 Western blotting法检测 Exo-OE vector 和 Exo-circRNA124534 OE 组 HUVECs 中血管生成相关蛋白表达水平

Tab. 3 Expression levels of angiogenesis-related proteins in HUVECs in Exo-OE vector and Exo-circRNA124534 OE groups detected by Western blotting method ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	p-p38 MAPK	VEGF-A	VEGFR2	Ang-1	SDF-1	MMP-9
Exo-OE vector	1.00±0.11	1.00±0.16	1.00±0.10	1.00±0.14	1.00±0.13	1.00±0.15
Exo-circRNA124534 OE	2.84±0.25	1.81±0.17	1.37±0.14	1.78±0.12	1.87±0.18	2.26±0.21
<i>t</i>	16.50	8.50	5.27	10.36	9.60	11.96
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

图4 光学显微镜下观察各组 HUVECs 中 Exo 摄取情况($\times 400$)Fig. 4 Exo uptake of HUVECs in various groups observed by optical microscope($\times 400$)

A: Exo-OE vector group; B: Exo-circ_0026827 OE group; C: Exo-circRNA124534 OE group.

图5 血管生成-诱导实验检测各组细胞上清液中 Exo 分离情况($\times 200$)Fig. 5 Exo separation in cell supernatant in various groups detected by angiogenesis-induction assay($\times 200$)

乳牙源-原代 DPSCs 共培养的 HUVECs 的增殖能力最高, 且 *circ_0026827* 和 *circRNA124534* 在乳牙-源原代 DPSCs 中表达水平最高。因此, 研究可在乳牙-源原代 DPSCs 的基础上过表达 *circ_0026827* 或 *circRNA124534* 探讨 2 种 *circRNAs* 对 HUVECs 血管生成能力的影响。

p38 MAPK 被磷酸化激活后, 通过 p38 MAPK/VEGF-A/VEGFR2 信号轴促进血管生成^[19]。在椎间盘融合过程中 p38 MAPK 信号通路促进成骨分化和血管生成^[20]。p38 MAPK 信号通路促进人牙周韧带间充质干细胞的迁移和成骨细胞分化^[21]。在伤口愈合过程中叉头框蛋白 A1 (forkhead box protein

A1, FOXA1) /S100A8/p38 MAPK 促进肉芽组织处血管新生^[22]。因此, p38 MAPK 的活化是促进血管生成的重要信号通路之一。VEGFR2 通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路促进 HUVECs 的血管生成过程^[23]。Ang-1 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是血管生成的中枢调节因子^[24]。低温可通过上调 VEGF/Ang-1 信号通路促进血管生成和糖尿病患者创面愈合^[25]。SDF-1/趋化因子 CXC 受体 4 (chemokine CXC receptor 4, CXCR4) 轴在骨关节炎中介导软骨下骨异常成骨和血管生成^[26]。MMP-9 和基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 是重要的基质金属蛋白酶, 在血管生成过程中负责降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的原有成分, 参与血管生成过程中的 ECM 成分重构^[27]。在子宫内膜损伤小鼠模型中, 损伤的子宫内膜通过肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3) 增加 MMP-9 的表达和活化水平, 促进血管生成^[28]。因此, 本研究检测的 p-p38 MAPK、VEGF-A、VEGFR2、Ang-1、SDF-1 和 MMP-9 蛋白表达上调与促血管生成过程密切相关。本研究结果显示: 与 Exo-OE vector 组比较, Exo-circ_0026827 OE 组和 Exo-circRNA124534 OE 组 HUVECs 呈现网状排列的生长状态, 并有排列成管状的趋势, 提示过表达 *circ_0026827* 和 *circRNA124534* 修饰乳牙 DPSCs 来源的 Exo 对 HUVECs 血管生成有一定促进作用^[29]。且 Exo-circ_0026827 OE 组和 Exo-circRNA124534 OE 组 HUVECs 内 p-p38 MAPK、VEGF-A、VEGFR2、Ang-1、SDF-1 和 MMP-9 蛋白表达水平升高, 更加佐证了上述结论。

综上所述, *circ_0026827* 和 *circRNA124534* 可能具有促进血管生成的活性。过表达 *circ_0026827* 和 *circRNA124534* 修饰的乳牙 DPSCs 来源的 Exo 对 HUVECs 中血管生成有一定促进作用, 可能进一步用于增强 HUVECs 在促血管生成相关领域中的应用潜能。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

刘景参与研究设计、论文构思和论文撰写, 王艳参与数据采集和论文修改, 黄旭参与数据分析和论文审阅。

[参考文献]

- [1] DUNCAN H F, KIRKEVANG L L, PETERS O A, et al. Treatment of pulpal and apical disease: The European Society of Endodontology (ESE) S3-level clinical practice guideline [J]. *Int Endodontic J*, 2023, 56(S3): 238-295.
- [2] 吴加豪, 乔建瓯. 口腔常见微生物与哮喘患者肺功能及口腔免疫特征相关性研究 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2024, 45(1): 75-80.
- [3] TIBÚRCIO-MACHADO C S, MICHELON C, ZANATTA F B, et al. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int Endodontic J*, 2021, 54(5): 712-735.
- [4] SOLETE P. Comparative evaluation of various analgesics in irreversible pulpitis to reduce pain [J]. *Bioinformatics*, 2021, 17(2): 313-319.
- [5] KIM S G, MALEK M, SIGURDSSON A, et al. Regenerative endodontics: a comprehensive review [J]. *Int Endodontic J*, 2018, 51(12): 1367-1388.
- [6] MOUSSA D G, APARICIO C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018: term.2769.
- [7] TSUTSUI T. Dental pulp stem cells: advances to applications [J]. *Stem Cells Cloning Adv Appl*, 2020, 13: 33-42.
- [8] KIM J H, KIM G H, KIM J W, et al. *In vivo* angiogenic capacity of stem cells from human exfoliated deciduous teeth with human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(11): 790-796.
- [9] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-490.
- [10] 董惠贤, 钟嘉琳, 江千舟. 环状 RNA 在成骨分化中的作用 [J]. *医学新知*, 2021, 31(1): 23-32.
- [11] XIONG H C, CHEN K. Multipotent stem cells from apical pulp of human deciduous teeth with immature apex [J]. *Tissue Cell*, 2021, 71: 101556.
- [12] JI F, PAN J, SHEN Z C, et al. The circular RNA *circRNA124534* promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells through modulation of the miR-496/ β -catenin pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 230.
- [13] JI F, ZHU L Y, PAN J, et al. *hsa_circ_0026827*

- promotes osteoblast differentiation of human dental pulp stem cells through the Beclin1 and RUNX1 signaling pathways by sponging miR-188-3p[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 470.
- [14] QAZI R E M, SAJID Z, ZHAO C Q, et al. Lyophilization based isolation of exosomes[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10477.
- [15] MATSUI M, KOBAYASHI T, TSUTSUI T W. CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures [J]. *Hum Cell*, 2018, 31(2): 127-138.
- [16] JI F, ZHU L Y, PAN J, et al. hsa_circ_0026827 promotes osteoblast differentiation of human dental pulp stem cells through the Beclin1 and RUNX1 signaling pathways by sponging miR-188-3p[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 470.
- [17] 李东雨, 朱小苗, 赵继荣, 等. 组蛋白去乙酰化酶及其抑制剂在牙源性干细胞成骨和成牙本质分化中的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(4): 468-474.
- [18] GE X Y, LI Z H, ZHOU Z, et al. Circular RNA SIPA1L1 promotes osteogenesis *via* regulating the miR-617/Smad3 axis in dental pulp stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 364.
- [19] CHENG W, LIAO Y H, XIE Y, et al. Helicobacter pylori-induced fibroblast-derived Serpin E1 promotes gastric cancer growth and peritoneal dissemination through p38 MAPK/VEGFA-mediated angiogenesis[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 326.
- [20] WANG T Q, ZHAO H Q, JING S Z, et al. Magnetofection of miR-21 promoted by electromagnetic field and iron oxide nanoparticles *via* the p38 MAPK pathway contributes to osteogenesis and angiogenesis for intervertebral fusion[J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1): 27.
- [21] 李召宝, 李召静, 王 婧. 山柰酚激活p38MAPK信号通路促进人牙周韧带间充质干细胞的迁移和成骨细胞分化[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2023, 20(4): 18-25.
- [22] ZHOU Z Z, ZOU M L, CHEN H P, et al. Forkhead box A1 induces angiogenesis through activation of the S100A8/p38 MAPK axis in cutaneous wound healing [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023, 45(6): 742-753.
- [23] CHO H D, KIM J H, PARK J K, et al. *Kochia scopariaseed* extract suppresses VEGF-induced angiogenesis *via* modulating VEGF receptor 2 and PI3K/AKT/mTOR pathways[J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 684-693.
- [24] ZHAO Y Q, YU B, WANG Y X, et al. Ang-1 and VEGF: central regulators of angiogenesis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2025, 480(2): 621-637.
- [25] BADR G, EL-HOSSARY F M, LASHEEN F E M, et al. Cold atmospheric plasma induces the curing mechanism of diabetic wounds by regulating the oxidative stress mediators iNOS and NO, the pyroptotic mediators NLRP-3, Caspase-1 and IL-1 β and the angiogenesis mediators VEGF and Ang-1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115934.
- [26] QIN H J, ZHAO X Q, HU Y J, et al. Inhibition of SDF-1/CXCR4 axis to alleviate abnormal bone formation and angiogenesis could improve the subchondral bone microenvironment in osteoarthritis[J]. *BioMed Res Int*, 2021, 2021: 8852574.
- [27] LIU Y, ZHANG H Y, YAN L X, et al. MMP-2 and MMP-9 contribute to the angiogenic effect produced by hypoxia/15-HETE in pulmonary endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 36-50.
- [28] TU Y-A, CHOU C H, YANG P-K, et al. Intentional endometrial injury enhances angiogenesis through increased production and activation of MMP-9 by TNF- α and MMP-3 in a mouse model[J]. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(10): gaab055.
- [29] NESSBACH P, SCHWARZ S, BECKE T D, et al. Angiogenic potential of co-cultured human umbilical vein endothelial cells and adipose stromal cells in customizable 3D engineered collagen sheets[J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(3): 107.