

神经肽P物质对人牙髓干细胞生物学行为的影响

陈孟竺¹ 韦小浪^{1,2} 陈文霞^{1,2}

¹广西医科大学口腔医学院/附属口腔医院, 广西口腔感染性疾病防治重点实验室, 南宁 530021; ²广西医科大学附属口腔医院牙体牙髓科, 南宁 530021

通信作者: 陈文霞, Email: angelaxiacw@163.com

【摘要】 目的 探讨神经肽P物质对人牙髓干细胞(hDPSC)生物学行为的影响。**方法** 组织块法分离、培养hDPSC, 通过流式细胞术和茜素红染色鉴定hDPSC。用不同浓度的神经肽P物质[0(对照组)、0.1 nmol/L、10 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L]干预hDPSC, 在第24、48、72和96 h通过细胞计数试剂盒8(CCK-8)法检测细胞增殖能力; 在48 h时通过Transwell实验检测细胞迁移能力。成血管诱导条件下干预14 d后通过小管形成实验检测细胞成管情况; 通过实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测成管相关基因血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达情况。采用GraphPad Prism 8软件对数据进行统计学分析。**结果** 成功分离、培养hDPSC。流式细胞术结果显示, 细胞表面标记物CD29、CD90、CD34和CD45表达率分别为99.90%、99.90%、0.40%和0.04%; 茜素红结果显示, 成骨诱导组形成较明显的矿化结节。CCK-8结果显示, 对照组在48、72、96 h的相对增值率分别为(100.0 $\pm$ 0.4)%、(100.0 $\pm$ 0.7)%和(100.0 $\pm$ 1.9)%, 实验组在48 h时开始促进细胞增殖, 72、96 h各浓度实验组均显著促进hDPSC的增殖, 差异具有统计学意义($F_{48h}=50.1, P_{48h}<0.001$; $F_{72h}=323.5, P_{72h}<0.001$; $F_{96h}=253.6, P_{96h}<0.001$), 最佳浓度10 μ mol/L时, 48、72和96 h的细胞增殖率分别为(119.0 $\pm$ 1.0)%、(148.4 $\pm$ 3.5)%和(140.8 $\pm$ 1.0)%; Transwell结果显示, 与对照组穿膜数量(5.0 $\pm$ 1.4)相比, 实验组均对hDPSC的迁移具有促进作用($F=310.3, P<0.001$), 最佳效应浓度为10 nmol/L, 穿膜数量为(87.6 $\pm$ 8.3); 成血管诱导14 d后, 小管形成实验结果显示, 各浓度的P物质实验组与对照组相比均可促进hDPSC小管形成情况($F_{\text{小管分支点数}}=43.7, P_{\text{小管分支点数}}<0.001$; $F_{\text{相对小管长度}}=19.4, P_{\text{相对小管长度}}=0.0001$); RT-PCR结果显示, 0、0.1 nmol/L、10 nmol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L实验组VEGFR2的相对表达量分别为(1.000 $\pm$ 0.023)、(1.129 $\pm$ 0.076)、(1.474 $\pm$ 0.101)、(1.285 $\pm$ 0.055)和(1.213 $\pm$ 0.160); VEGF的相对表达量分别为(1.000 $\pm$ 0.026)、(1.211 $\pm$ 0.023)、(1.242 $\pm$ 0.070)、(1.679 $\pm$ 0.043)和(1.138 $\pm$ 0.156), P物质组与对照组相比, 差异均有统计学意义($F_{\text{VEGFR2}}=10.43, P_{\text{VEGFR2}}=0.0014$; $F_{\text{VEGF}}=29.87, P_{\text{VEGF}}<0.001$)。 **结论** P物质对hDPSC的增殖、迁移和成血管能力具有一定促进作用。

【关键词】 神经肽; P物质; 牙髓干细胞; 生物学行为; 牙髓再生

基金项目: 广西研究生教育创新计划项目(YCBZ2020055)

引用著录格式: 陈孟竺, 韦小浪, 陈文霞. 神经肽P物质对人牙髓干细胞生物学行为的影响[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2022, 16(6): 343-351.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2022.06.002

Biological effects of neuropeptide substance P on human dental pulp stem cells

Chen Mengzhu¹, Wei Xiaolang^{1,2}, Chen Wenxia^{1,2}

¹College of Stomatology, Hospital of Stomatology, Guangxi Medical University, Guangxi Key Laboratory of Oral Infectious Diseases Prevention and Treatment, Nanning 530021, China; ²Department of Operative Dentistry and Endodontology, College of Stomatology, Hospital of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: Chen Wenxia, Email: angelaxiacw@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of neuropeptide substance P on the biological behavior of human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Methods** hDPSCs were isolated and cultured by

tissue block method, and then identified by flow cytometry and alizarin red staining. hDPSCs were treated with different concentrations of neuropeptide substance P [0 (control group), 0.1 nmol/L, 10 nmol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L]. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method at 24, 48, 72 and 96 h. At 48 h, while cell migration was detected by Transwell assay. After 14 days of intervention under angiogenic induction conditions, the tubule formation was detected by tubule formation assay. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) which are associated with tubule formation, were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). GraphPad Prism (v.8) was used to analyze the data. **Results** hDPSCs were successfully isolated and cultured, and the expression rates of cell surface markers CD29, CD90, CD34 and CD45 were 99.90%, 99.90%, 0.40% and 0.04%, respectively. Alizarin red staining results showed that the osteogenic induction group formed more mineralized nodules. The results of CCK-8 showed that the relative proliferation rates of the control group at 48, 72 and 96 h were $(100.0 \pm 0.4)\%$, $(100.0 \pm 0.7)\%$ and $(100.0 \pm 1.9)\%$, respectively. The promotion of cell proliferation was observed at 48, 72 and 96 h for the experimental groups, which was statistically significant between groups ($F_{48\text{ h}} = 50.1$, $P_{48\text{ h}} < 0.001$; $F_{72\text{ h}} = 323.5$, $P_{72\text{ h}} < 0.001$; $F_{96\text{ h}} = 253.6$, $P_{96\text{ h}} < 0.001$). The optimal effect concentration of substance P was 10 μ mol/L, and with its presence at this concentration, the cell proliferation rates at 48, 72 and 96 h were $(119.0 \pm 1.0)\%$, $(148.4 \pm 3.5)\%$ and $(140.8 \pm 1.0)\%$. Transwell results showed that all the experimental groups had stronger promoting effect on the migration of hDPSCs than the control group ($F = 310.3$, $P < 0.001$), since the number of membrane penetration in the control group (5.0 ± 1.4) was less than that of the experimental group with 10 nmol/L substance P (87.6 ± 8.3). After 14 days of angiogenesis induction, the results of tubule formation assay showed that, compared with the control group, each substance P group could promote the tubule formation of hDPSCs ($F_{\text{branch nodes}} = 43.7$, $P_{\text{branch nodes}} < 0.001$, $F_{\text{tubule length}} = 19.4$, $P_{\text{tubule length}} = 0.0001$). The results of RT-PCR showed that the expression of VEGFR2 in 0, 0.1 nmol/L, 10 nmol/L, 1 μ mol/L, 10 μ mol/L groups were (1.000 ± 0.023) , (1.129 ± 0.076) , (1.474 ± 0.101) , (1.285 ± 0.055) and (1.213 ± 0.160) , respectively. The expression levels of VEGF were (1.000 ± 0.026) , (1.211 ± 0.023) , (1.242 ± 0.070) , (1.679 ± 0.043) and (1.138 ± 0.156) , respectively. Compared with the control group, the difference was statistically significant ($F_{\text{VEGFR2}} = 10.43$, $P_{\text{VEGFR2}} = 0.0014$, $F_{\text{VEGF}} = 29.87$, $P_{\text{VEGF}} < 0.001$). **Conclusion** Substance P may have certain promoting effect on the proliferation, migration and angiogenesis of hDPSCs.

【Key words】 Neuropeptide; Substance P; Dental pulp stem cells; Biological behavior; Dental pulp regeneration

Fund program: Innovation Project of Guangxi Graduate Education(YCBZ2020055)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2022.06.002

当牙髓因龋病、外伤等因素受到损伤时,对应病损部位牙髓组织的成牙本质细胞出现变性坏死,牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)受多种因子的调控,向病损部位迁移、成牙本质细胞向分化,成为类成牙本质细胞,并分泌细胞外基质,形成修复性牙本质^[1]。Nakashima 等^[2]将人牙髓干细胞(human dental pulp stem cell, hDPSC)用于临床治疗中,发现植入 hDPSC 能促进部分牙髓切除术后残存牙髓组织的再生修复,并形成修复性牙本质。迄今为止,已有多个研究结果证明 hDPSC 在牙髓再生修复中的重要价值。然而,牙髓损伤后内源性 DPSC 的激活能力是有限的,即使在新型盖髓剂的诱导

下,DPSC 介导形成的修复组织也只是牙本质钙化桥,而不是结构完整的牙髓-牙本质复合体。因此,优化以 DPSC 为主的牙髓-牙本质复合体的再生修复具有重要的临床意义。

近年来,生长因子、激素和药物等对细胞具有调节作用的生物活性分子受到越来越多的关注。这些生物活性分子将内源性细胞募集至损伤部位,调节细胞生物学行为,有效促进组织再生^[3]。神经肽 P 物质(neuropeptide substance P)是牙髓组织中最早被发现的神经肽,牙髓组织中 20% 的血管都有神经伴行,其中 87% 的神经纤维为 P 物质阳性。P 物质阳性纤维伴随血管经根尖孔成束地进入牙髓,在

进入冠部髓腔后逐渐分枝^[4]。当牙齿受到各种物理、化学或生物性刺激时,包括龋病进展^[5]、牙齿漂白^[6]、咬合创伤^[7]和窝洞制备^[8]等,P物质由神经纤维末梢释放到牙髓组织中,通过与其相应受体结合后发挥调节作用,从而修复和维持受损部位的结构和机能。此外,有研究证实P物质可以促进牙髓细胞的增殖能力并改变其超微结构^[9]。但不同浓度P物质对细胞生物学行为的影响不同,如,0.1 nmol/L浓度的P物质可以诱导肌腱源性干细胞相关基因的表达,而1 nmol/L浓度时则可以诱导其非腱相关基因的表达^[10];在0.1 nmol/L和10 nmol/L的P物质浓度干预下,内皮细胞增殖达到峰值,而100 nmol/L和1 μ mol/L浓度时则增殖能力下降^[11]。牙髓组织中也存在P物质,这些存在于牙髓中的神经肽P物质是否参与牙髓损伤的修复再生过程,其效应是否通过影响hDPSC的生物学特性获得目前尚不清楚。本研究拟探讨P物质对hDPSC增殖、迁移和成血管能力的影响,为进一步阐明神经肽P物质在牙髓损伤修复中的作用提供科学依据。

材料与方法

一、主要材料和仪器

1. 试剂:神经肽P物质(MCE,美国);DMEM培养基[维森特生物技术(南京)有限公司];胎牛血清(fetal bovine serum, FBS; ZETA LIFE, 美国);磷酸盐缓冲液(PBS)、青链霉素混合液、 $w=0.1\%$ 结晶紫染液、 $w=0.25\%$ 胰酶-乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、茜素红染液(北京索莱宝科技有限公司);EGM-2培养基(LONZA, 瑞士);细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8; 北京兰杰柯科技有限公司);逆转录试剂盒(TaKaRa, 日本);Matrigel基质胶(CORNING, 美国);成骨诱导培养基[赛业(苏州)生物科技有限公司];PE-CD34、FITC-CD45、APC-CD29和PerCP-Cy5-5-CD90抗体(BD-FACS Aria, 美国)。

2. 仪器:流式细胞仪(BD-FACS Aria, 美国);酶标仪(TECAN, 瑞士);倒置显微镜(Thermo, 美国);紫外分光光度计(Thermo, 美国);实时荧光定量PCR仪(Thermo, 美国)。

二、实验方法

1. 人牙髓干细胞分离与培养:本实验所有人牙齿样本均来源于广西医科大学附属口腔医院2020年11月至2022年8月就诊的18~30岁患者,告知

患者或家属并签署知情同意后采集样本。牙齿样本纳入标准为因正畸治疗需要拔除的健康前磨牙或阻生牙、牙冠完好、无龋坏、无缺损。采集后即刻放入含 $w=2\%$ 双抗的DMEM培养基中,低温保存并于2 h内转运至实验室备用。将样本转移至超净工作台内,含 $w=2\%$ 双抗的PBS冲洗,无菌纱布包裹牙齿后砸开,无菌条件下取出牙髓,剪去根尖2 mm的牙髓,依次在含有双抗的PBS缓冲液中清洗3次,在DMEM培养液中将牙髓剪碎为约1 mm²大小组织块,贴于培养瓶底,加入含 $\varphi=20\%$ FBS的DMEM培养基,于 $\varphi=5\%$ CO₂、37℃培养箱中培养hDPSC,待细胞从组织块中爬出,达到80%以上融合后,传代,取第3~4代细胞进行后续研究。

2. hDPSC表面标记物的鉴定:取第3代hDPSC,消化,1 000 r/min离心5 min(离心半径13.7 cm),弃上清,PBS重悬,离心后弃上清,PBS洗涤,重复2次,调整细胞密度至10⁷个/mL后分装成两管。(1)对照管:100 μ L细胞重悬液;(2)实验管:在100 μ L细胞重悬液中根据说明书配比,加入20 μ L CD45-FITC、CD29-APC、CD34-PE和5 μ L CD90-PERCP-CY5.5抗体。4℃避光环境孵育30 min后PBS清洗,离心(参数同上),弃上清,PBS重悬后上机检测细胞表面标记物表达情况。

3. hDPSC成骨向分化能力鉴定:取第3~4代hDPSC以2 $\times$ 10⁵个/孔的密度接种于六孔板中,待细胞完全贴壁并融合至80%时进行干预,对照组加入含 $\varphi=10\%$ FBS的完全培养基,诱导组加入成骨诱导培养基,每隔3 d更换1次培养基,诱导后第21天,移除培养基,PBS清洗3次,4%多聚甲醛溶液固定30 min,去除固定液,PBS清洗3次,将PBS完全吸取干净后每孔加入2 mL茜素红染液染色,室温孵育5~10 min,PBS清洗3次,倒置显微镜下观察拍照。

4. P物质对hDPSC增殖能力的影响:取第3~4代hDPSC,以3 $\times$ 10³个/孔的密度接种于96孔板,培养24 h,待细胞完全贴壁后,根据分组使用含P物质终浓度分别为[0(对照组)、0.1 nmol/L、10 nmol/L、1 μ mol/L和10 μ mol/L]的DMEM完全培养基培养hDPSC,期间每隔3 d更换1次培养基。分别于培养后的第24、48、72和96 h将培养基吸出,每孔加入含10% CCK-8溶液的DMEM培养基100 μ L,避光条件下于培养箱内孵育2 h,酶标仪测波长450 nm处检测吸光度(A)值,每组5个平行孔。

5. P物质对hDPSC迁移能力的影响:取第3~4

代hDPSC,常规消化,1 000 r/min转速离心5 min(离心半径13.7 cm),弃上清,使用不含血清的培养基进行重悬。将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL,取200 μ L接种于Transwell板的上室中。实验组在下室中分别加入含不同浓度P物质(0.1 nmol/L、10 nmol/L、1 μ mol/L和10 μ mol/L)的不含血清培养基500 μ L,对照组则在下室加入等体积的不含血清培养基,每组5个平行孔。48 h后弃培养基,PBS清洗,将小室浸泡在4%多聚甲醛溶液中固定30 min,弃多聚甲醛,PBS清洗后浸泡在0.1%结晶紫染液中1 h。轻柔荡洗,用棉球轻轻擦拭上室表面细胞,清洗后从每组PC膜中央随机选取5个视野拍照($\times 100$),计数细胞数量用于统计学分析。

6. 小管形成实验检测P物质对hDPSC成血管能力的影响:取第3~4代hDPSC以 2×10^5 个/孔的密度接种于六孔板中培养24 h,待细胞完全贴壁后用于研究。(1)实验组:含有不同浓度P物质(0.1 nmol/L、10 nmol/L、1 μ mol/L和10 μ mol/L)的EGM-2培养基;(2)对照组:不含P物质的EGM-2培养基。每隔3 d更换1次培养基。各组细胞分别在上述条件下培养14 d,然后进行小管形成实验。实验前一天将成血管载玻片、Matrigel胶、无菌枪头在4 $^{\circ}$ C冰箱内预冷。实验时在冰盒上以10 μ L/孔的体积加入Matrigel胶于成血管载玻片中,37 $^{\circ}$ C培养箱放置1 h后,将培养14 d各组细胞以 2×10^4 个/孔的细胞密度按分组接种于载玻片中,37 $^{\circ}$ C, $\varphi=5\%$ CO₂培养箱培养6 h,镜下观察拍照($\times 40$),分析形成小管的长度和分支点数。

7. 实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测成血管相关基因的表达:参照实验方法6中的操作步骤和分组进行细胞种板及成血管诱导,于干预后的第14天使用TRIzol裂解细胞,提取总RNA。按照逆转录试剂盒和SYBR-Green染料试剂盒操作流程检测血管内皮生长因子(vascular

endothelial growth factor, VEGF)和血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)mRNA的表达情况,以GAPDH作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析各基因的相对表达量。目的基因引物序列见表1。

表1 实时荧光定量聚合酶链反应引物序列

基因名称	引物序列
VEGF	正向:5'-AGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCAC-3' 反向:5'-GGGCACACAGGATGGCTTGAAG-3'
VEGFR2	正向:5'-AGGGAGTCTGTGGCATCTGAAGG-3' 反向:5'-GTGGTGTCTGTGTCATCGGAGT-3'
GAPDH	正向:5'-CAGCAAGGATACTGAGAGCAAGAG-3' 反向:5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGATG-3'

三、统计学处理方法

采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析。用Shapiro-Wilk检验各组数据的正态分布,Levene检验数据的方差齐性,定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。CCK-8实验每个时间点的数据;Transwell、小管形成、RT-PCR实验的各不同检测指标,若方差齐,则进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用Dunnett法进行实验组与对照组的比较;若方差不齐,则采用Brown-Forsythe检验,Dunnett's T3法进行实验组与对照组的比较。组内两两比较,采用独立样本 t 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、牙髓细胞的分离、培养与鉴定

1. hDPSC的形态:采用组织块贴壁法培养hDPSC,在组织块贴壁后大约1~2周可见细胞从组织块周围爬出,以组织块为中心,呈梭形,放射状生长(图1A)。培养至融合达80%时传代,取第3代细胞镜下观察,可见细胞形态较一致,呈长梭形,体积较大(图1B)。

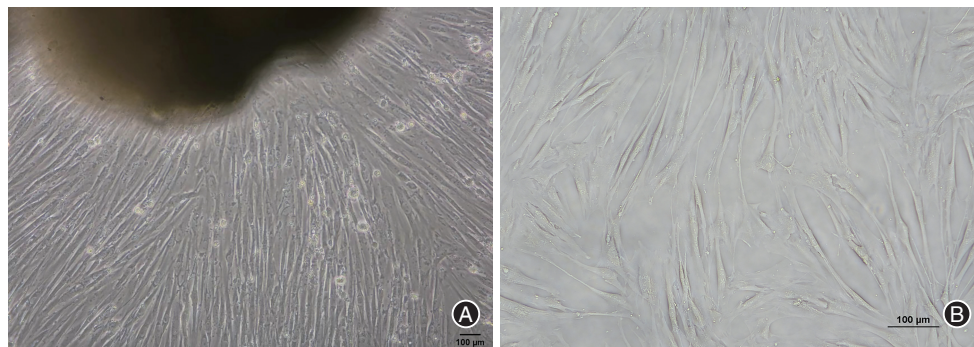


图1 分离培养的人牙髓干细胞(hDPSC)的形态 A:原代hDPSC的组织细胞形态;B:第3代hDPSC的细胞形态。

2. hDPSC 细胞表面标记物的表达情况:干细胞表面标记物 CD29 和 CD90 呈阳性表达,其表达率分别为 99.90% 和 99.90%,造血谱系标记物 CD34 和 CD45 呈阴性表达,其表达率分别为 0.40% 和 0.04% (图 2)。

3. 成骨向分化茜素红染色:对照组细胞表面未见任何矿化结节形成(图 3A),而 hDPSC 经成骨诱导 21 d 后茜素红染色,显微镜下观察可见大量大小不一、形态不规则的红色钙化结节附着于细胞表面(图 3B)。

镜下观细胞呈梭形,形态较一致;流式细胞术结果显示,间充质特异性细胞标记物 CD29 和 CD90

呈表达阳性,造血细胞标记物 CD34 和 CD45 呈表达阴性,证明培养细胞为间充质来源;茜素红染色可见红色矿化结节,证明细胞具有成骨向分化的能力。以上结果都表明分离培养的细胞符合间充质干细胞特性。

二、P 物质对人牙髓干细胞增殖能力的影响

使用含不同浓度 P 物质的 DMEM 完全培养基培养 hDPSC,结果显示与对照组相比较,在 24 h 时, P 物质对 hDPSC 的增殖没有明显影响;在 48、72 和 96 h 时, P 物质均能促进 hDPSC 的增殖,与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2、图 4),最佳效应浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,与同时间其他各组相比,差异均有

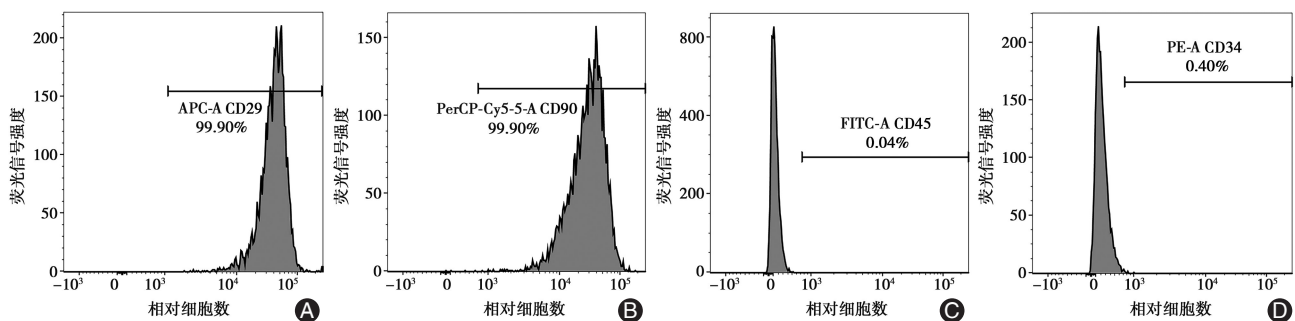


图 2 流式细胞术检测人牙髓干细胞(hDPSC)细胞表面标记物的表达 A:hDPSC 阳性表达 CD29;B:hDPSC 阳性表达 CD90;C:hDPSC 阴性表达 CD45;D:hDPSC 阴性表达 CD34。

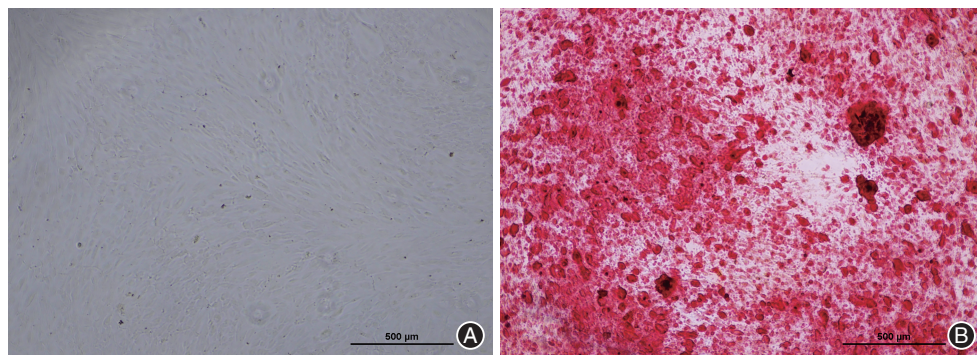


图 3 人牙髓干细胞(hDPSC)成骨向诱导 21 d 后茜素红染色 A:对照组;B:成骨诱导组。

表 2 各组在不同时间点人牙髓干细胞(hDPSC)增值率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	3	100.0 $\pm$ 2.3	100.0 $\pm$ 0.4	100.0 $\pm$ 0.7	100.0 $\pm$ 1.9
0.1 nmol/L 实验组	3	102.2 $\pm$ 3.7	105.9 $\pm$ 0.9 ^a	111.0 $\pm$ 1.0 ^a	111.9 $\pm$ 0.2 ^a
10 nmol/L 实验组	3	94.5 $\pm$ 1.5 ^{ab}	99.3 $\pm$ 1.4 ^b	104.5 $\pm$ 0.7 ^{ab}	105.5 $\pm$ 2.5 ^{ab}
1 $\mu\text{mol/L}$ 实验组	3	104.2 $\pm$ 1.5 ^c	105.8 $\pm$ 3.8 ^{ac}	111.2 $\pm$ 1.7 ^{ac}	113.6 $\pm$ 2.0 ^{ac}
10 $\mu\text{mol/L}$ 实验组	3	99.9 $\pm$ 1.5 ^{cd}	119.0 $\pm$ 1.0 ^{abcd}	148.4 $\pm$ 3.5 ^{abcd}	140.8 $\pm$ 1.0 ^{abcd}
F 值		7.6	50.1	323.5	253.6
P 值		0.004 2	<0.001	<0.001	<0.001

注:与相同时间点对照组进行比较,^a $P < 0.05$;浓度高于 0.1 nmol/L 各组与相同时间点 0.1 nmol/L 组比较,^b $P < 0.05$;浓度高于 10 nmol/L 各组与相同时间点 10 nmol/L 组比较,^c $P < 0.05$;相同时间点 1 $\mu\text{mol/L}$ 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 比较,^d $P < 0.05$ 。

统计学意义($P < 0.05$, 表2、图4)。72 h时, 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度培养的hDPSC增值率达到峰值; 96 h时, P物质对hDPSC增殖的促进作用进入平台期或呈下降趋势。提示, 48 h后P物质促进hDPSC增殖, 最佳效应浓度为10 $\mu\text{mol/L}$, 最佳作用时间为72 h。

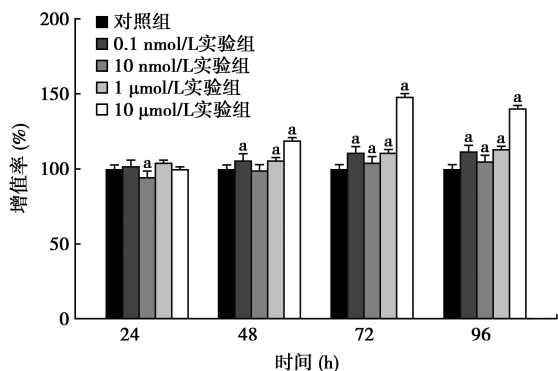


图4 不同浓度P物质在不同时间点对人牙髓干细胞(hDPSC)增值率的影响(* $P < 0.05$)

三、P物质对人牙髓干细胞迁移能力的影响

细胞接种于Transwell小室48 h后, 与对照组的细胞穿膜数量(5.0 ± 1.4)相比, 各浓度实验组细胞穿膜数量均明显增多, hDPSC迁移能力增强, 0.1 nmol/L、10 nmol/L、1 $\mu\text{mol/L}$ 和10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞穿膜数量分别为(65.2 ± 2.6)、(87.6 ± 8.3)、(45.6 ± 1.5)和(13.6 ± 4.0), 差异均有统计学意义($F = 310.3$, $P < 0.001$)。其中, hDPSC在10 nmol/L浓度的P物质作用下穿膜数量增高最显著(图5)。

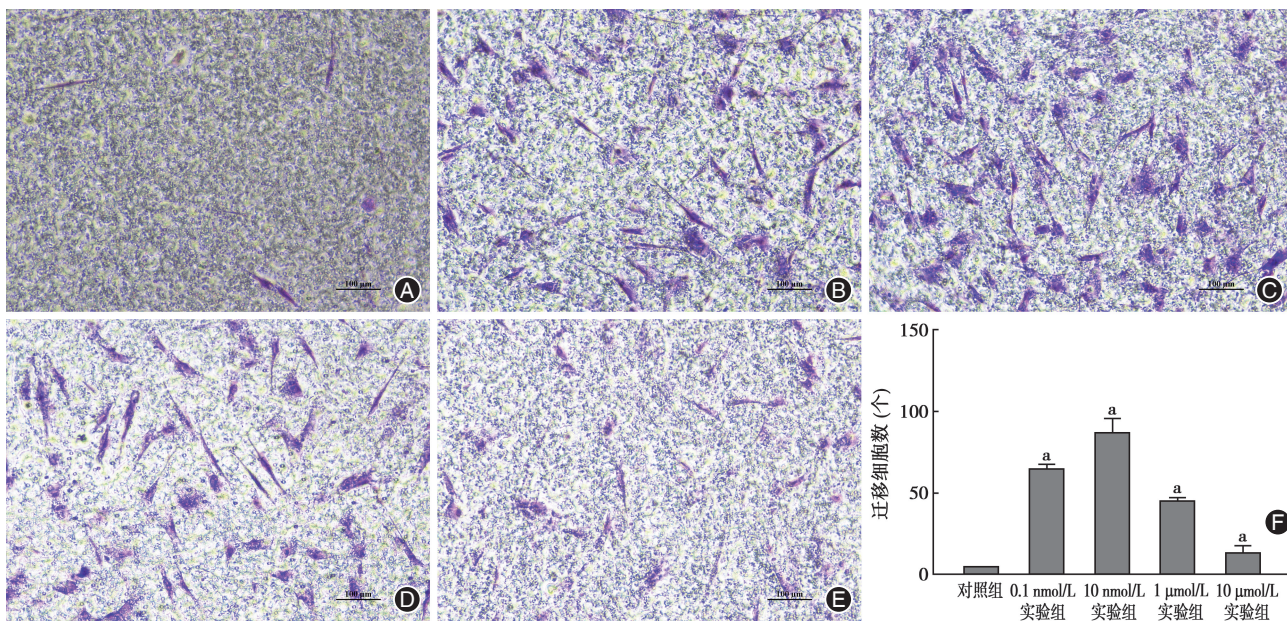


图5 不同浓度P物质对人牙髓干细胞(hDPSC)迁移能力的影响 A~E: 结晶紫染色结果, A为对照组, B为0.1 nmol/L实验组, C为10 nmol/L实验组, D为1 $\mu\text{mol/L}$ 实验组, E为10 $\mu\text{mol/L}$ 实验组; F: Transwell小室中迁移细胞数量分析结果, * $P < 0.05$ 。

四、P物质对人牙髓干细胞成血管向分化能力的影响

1. 小管形成实验: 含不同浓度P物质的成管培养基干预14 d后, 与对照组相比, 各浓度P物质实验组相对小管形成长度均更长, 相对分支数也均显著增加, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 表3、图6)。但10 nmol/L组、1 $\mu\text{mol/L}$ 组和10 $\mu\text{mol/L}$ 组的组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表3)。

表3 各组分支点数与相对小管形成长度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	小管分支点数(个)	相对小管长度(μm)
对照组	3	11 ± 3	1751 ± 1061
0.1 nmol/L 实验组	3	32 ± 3^a	3656 ± 193^a
10 nmol/L 实验组	3	48 ± 3^{ab}	5348 ± 471^{ab}
1 $\mu\text{mol/L}$ 实验组	3	40 ± 4^{ab}	5061 ± 709^{ab}
10 $\mu\text{mol/L}$ 实验组	3	55 ± 7^{ab}	6440 ± 794^{ab}
F值		43.7	19.4
P值		< 0.001	0.0001

注: 与对照组进行比较, $^a P < 0.05$; 浓度高于0.1 nmol/L各组与0.1 nmol/L组比较, $^b P < 0.05$; 浓度高于10 nmol/L各组与10 nmol/L组比较, $^c P < 0.05$; 1 $\mu\text{mol/L}$ 与10 $\mu\text{mol/L}$ 比较, $^d P < 0.05$ 。

2. 血管向分化相关基因mRNA的表达: 干预14 d后提取细胞总RNA, 实时荧光定量RT-PCR检测结果显示P物质作用下hDPSC的VEGFR2和VEGF的相对表达量均高于对照组, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表4、图7)。VEGFR2相对表达最大效应浓度为10 nmol/L, 但0.1 nmol/L与10 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$

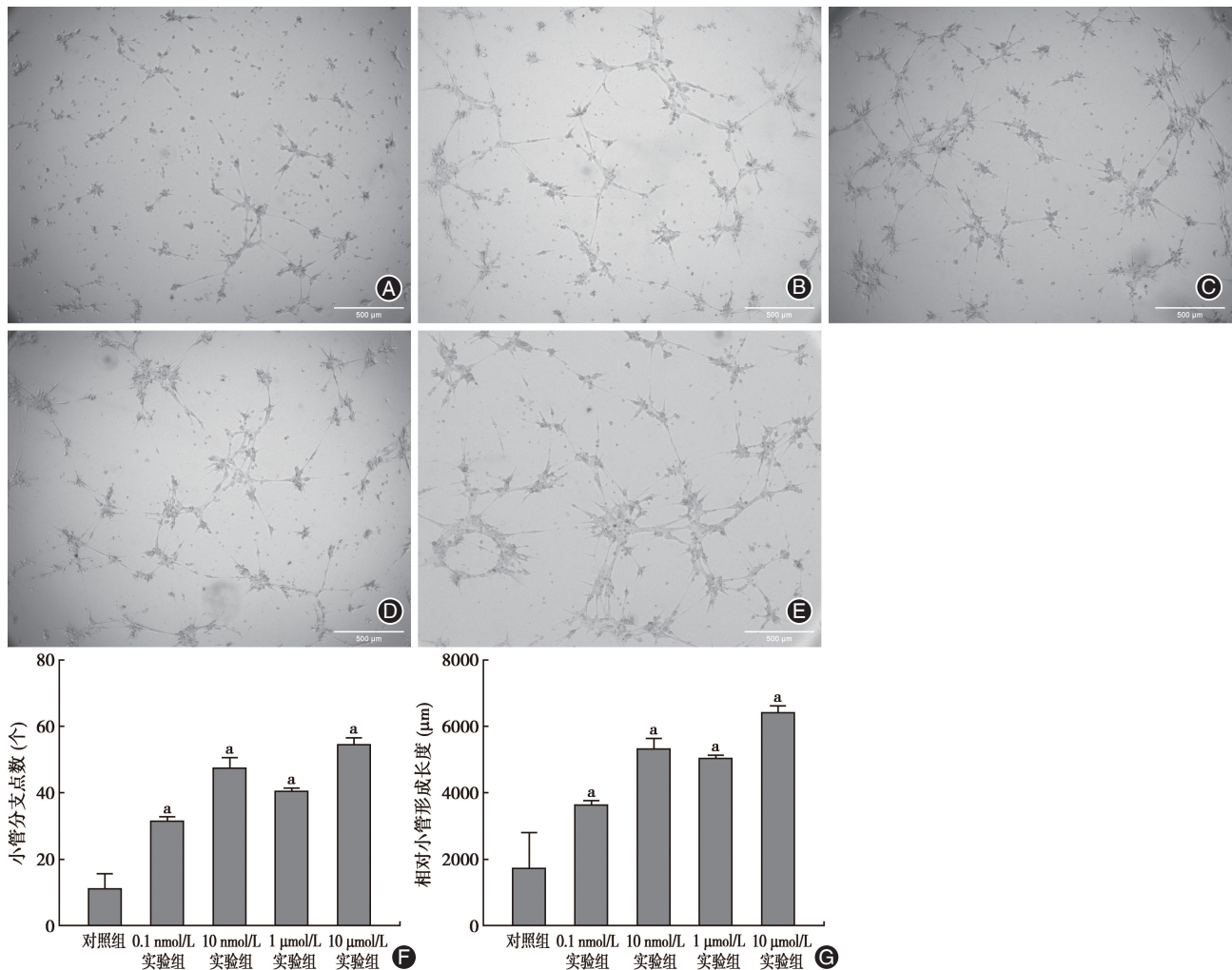


图6 不同浓度P物质对人牙髓干细胞(hDPSC)成血管向分化能力的影响 A~E:镜下小管形成情况,A为对照组,B为0.1 nmol/L实验组,C为10 nmol/L实验组,D为1 μmol/L实验组,E为10 μmol/L实验组;F:小管分支点数统计分析结果,^a $P < 0.05$;G:对相对小管形成长度统计分析结果,^a $P < 0.05$ 。

与1 μmol/L组间差异均无统计学意义($P > 0.05$,表4); *VEGF* 相对表达量10 nmol/L与0.1 nmol/L、10 nmol/L与10 μmol/L组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表4)。

小管形成实验和RT-PCR实验结果提示:各浓度P物质均对hDPSC成血管能力具有促进作用,效应浓度应大于或等于10 nmol/L。

讨 论

随着神经免疫学的发展,人们逐渐认识到创伤后由周围神经末梢释放的感觉神经肽参与了伤口愈合的调控,其中神经肽P物质在伤口愈合过程中发挥了重要的作用^[12]。P物质不仅参与了创伤后的神经源性炎症反应,引起毛细血管扩张、血管通透性增加,而且直接促进修复细胞,尤其是间充质干细胞的迁移、增殖和分化^[13],并且通过与炎性细胞

表4 各组血管向分化相关基因相对表达量对比($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	<i>VEGFR2</i>	<i>VEGF</i>
对照组	3	1.000±0.023	1.000±0.026
0.1 nmol/L实验组	3	1.129±0.076 ^a	1.211±0.023 ^a
10 nmol/L实验组	3	1.474±0.101 ^{ab}	1.242±0.070 ^a
1 μmol/L实验组	3	1.285±0.055 ^{abc}	1.679±0.043 ^{abc}
10 μmol/L实验组	3	1.213±0.160	1.138±0.156 ^d
<i>F</i> 值		10.43	29.87
<i>P</i> 值		0.001 4	<0.001

注:*VEGFR2*为血管内皮生长因子受体2;*VEGF*为血管内皮生长因子;与对照组进行比较,^a $P < 0.05$;浓度高于0.1 nmol/L各组与0.1 nmol/L组比较,^b $P < 0.05$;浓度高于10 nmol/L各组与10 nmol/L组比较,^c $P < 0.05$;1 μmol/L与10 μmol/L比较,^d $P < 0.05$ 。

的相互作用,调节这些细胞的功能,诱导细胞因子和生长因子的释放^[14],从而从多个方面参与伤口愈合的调控。多项研究表明,在组织的再生和修复过

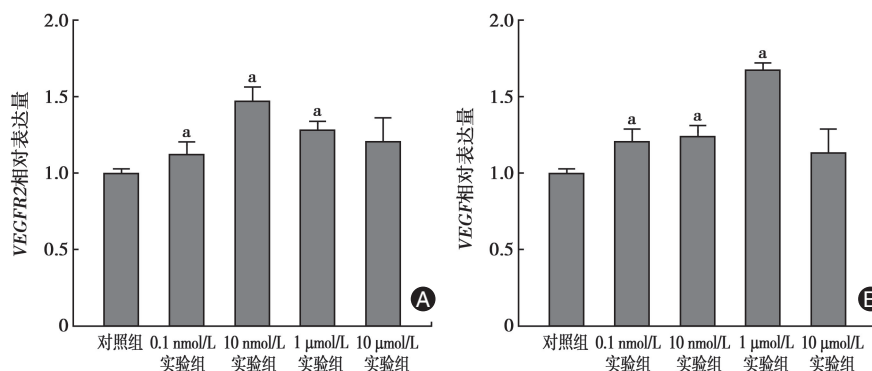


图7 实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测成血管分化相关基因mRNA的表达 A:血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)相对基因表达量;B:血管内皮生长因子(VEGF)相对基因表达量; $^*P < 0.05$ 。

程中,P物质通过调控干/祖细胞的生物学行为参与血管^[15]、神经^[16]和骨^[17]的形成。然而,在牙髓损伤修复过程中P物质对牙髓干细胞生物学行为的调控作用仍然不明。

P物质作为一种神经递质,参与多种生物学行为。研究表明,较高浓度的P物质(10 nmol/L)在干预后的最初72 h内刺激了小鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)的增殖,但在干预21 d后P物质对BMSC的细胞增殖活性没有影响^[18]。惠婷等^[19]研究证实,1 μmol/L P物质可促进BMSC的增殖和成骨向分化。Tao等^[13]发现,100 nmol/L P物质可通过上调趋化因子C-X-C-基元受体4(chemokine C-X-C motif receptor 4, CXCR4)和磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)促进BMSC的迁移而参与组织修复。上述研究结果提示,P物质发挥不同生物学效应具有浓度和时间特异性。

牙髓损伤的修复过程与骨组织相似,是一个复杂的过程,有多种因素的生物学效应和调控机制参与其中。因此,本实验设置了不同浓度的P物质,观察P物质对hDPSC生物学行为的影响。结果表明,本研究设置的4种浓度的P物质对hDPSC干预48 h后,开始对hDPSC的增殖有促进作用,其中以72 h时10 μmol/L组效果最佳;96 h时P物质对hDPSC的增殖作用进入平台期或呈下降趋势。这与田丽华^[9]研究中P物质对hDPSC增殖的影响趋势一致。96 h后细胞增殖率进入平台期或下降,推测原因与孔板内细胞发生接触性抑制,或是因为P物质半衰期较短而失活导致。与增殖效应结果不同的是,Transwell迁移实验表明,各浓度P物质均可促进hDPSC的垂直向迁移能力,但以10 nmol/L浓度组促进作用最为

显著。小管形成实验和RT-PCR结果提示,不同浓度P物质均可促进hDPSC成血管向分化。内皮细胞在血管生成过程中具有重要作用,是血管形成的必要条件,VEGFR2主要表达于血管内皮细胞和胚胎前体细胞^[20],RT-PCR结果提示10 nmol/L浓度下P物质促进hDPSC向内皮细胞分化作用最显著;VEGF可以促进血管内皮细胞的增殖和存活,在VEGF与内皮细胞的表面受体结合后促进内皮细胞的迁移,是血管生成过程中重要的调控因子,RT-PCR结果提示1 μmol/L浓度的P物质培养下VEGF的相对表达效应最高。因此,虽然基因层面VEGFR2与VEGF相对表达量的最大效用浓度不同,但最终在小管形成结果上10 nmol/L、1 μmol/L和10 μmol/L浓度实验组组间差异无统计学意义。推测,可能是当P物质达到一定浓度后,其对hDPSC成血管向分化的影响达到平台期,因此不同浓度组间无明显差异。综上所述,P物质可以促进hDPSC的增殖、迁移和成血管的能力,最佳效应浓度分别为10 μmol/L、10 nmol/L和10 nmol/L。

虽然,本研究结果显示P物质在多个方面均可影响hDPSC的生物学行为,但hDPSC作为具有多向分化潜能的间充质干细胞,在组织的修复和再生过程中所发挥的生物学效应是极为复杂的过程,P物质在其复杂的效应网络中所发挥的作用仍然需要进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈孟竺:实验操作、论文撰写、数据整理、统计分析;韦小浪:实验操作、论文撰写、经费支持;陈文霞:研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

- [1] Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. Reactionary

- dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries [J]. J Dent Res, 2014, 93(8): 788-793. DOI: 10.1177/0022034514539507.
- [2] Nakashima M, Iohara K, Murakami M, et al. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: A pilot clinical study [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 61. DOI: 10.1186/s13287-017-0506-5.
- [3] Sismanoglu S, Ercal P. Dentin - pulp tissue regeneration approaches in dentistry: An overview and current trends [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1298: 79-103. DOI: 10.1007/5584_2020_578.
- [4] Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp [J]. J Anat, 2003, 202(2): 195-203. DOI: 10.1046/j.1469-7580.2003.00153.x.
- [5] Rodd HD, Boissonade FM. Substance P expression in human tooth pulp in relation to caries and pain experience [J]. Eur J Oral Sci, 2000, 108(6): 467-474. DOI: 10.1034/j.1600-0722.2000.00924.x.
- [6] Gallinari MO, Cintra L, Benetti F, et al. Pulp response of rats submitted to bleaching and the use of different anti-inflammatory drugs [J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0210338. DOI: 10.1371/journal.pone.0210338.
- [7] Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Correa-Ortiz JA, et al. Effect of experimentally induced occlusal trauma on substance P expression in human dental pulp and periodontal ligament [J]. J Endod, 2011, 37(5): 627-630. DOI: 10.1016/j.joen.2011.02.013.
- [8] Caviedes - Bucheli J, Correa - Ortíz JA, García LV, et al. The effect of cavity preparation on substance P expression in human dental pulp [J]. J Endod, 2005, 31(12): 857-859. DOI: 10.1097/01.don.0000158237.63383.d8.
- [9] 田丽华. P物质对体外培养人牙髓细胞生物学特性的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2014.
- [10] Zhou Y, Zhou B, Tang K. The effects of substance P on tendinopathy are dose-dependent: An *in vitro* and *in vivo* model study [J]. J Nutr Health Aging, 2015, 19(5): 555-561. DOI: 10.1007/s12603-014-0576-3.
- [11] Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, et al. Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells [J]. Microvasc Res, 1990, 40(2): 264-278. DOI: 10.1016/0026-2862(90)90024-l.
- [12] Kant V, Mahapatra PS, Gupta V, et al. Substance P, a neuropeptide, promotes wound healing via neurokinin-1 receptor [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2021: 15347346211004060. DOI: 10.1177/15347346211004060.
- [13] Tao R, Qu Z, Zhang K, et al. Substance P modulates BMSCs migration for tissue repair through NK-1R/CXCR4/p-Akt signal activation [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(3): 2227-2236. DOI: 10.1007/s11033-021-07044-y.
- [14] Hong HS, Kim S, Jin Y, et al. Substance P enhances the therapeutic effect of MSCs by modulating their angiogenic potential [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(21): 12560-12571. DOI: 10.1111/jcmm.15804.
- [15] Lee J, Song M, Kim J, et al. Comparison of angiogenic activities of three neuropeptides, Substance P, secretoneurin, and neuropeptide Y using myocardial infarction [J]. Tissue Eng Regen Med, 2018, 15(4): 493-502. DOI: 10.1007/s13770-018-0134-x.
- [16] Yang L, Li G, Ye J, et al. Substance P enhances endogenous neurogenesis to improve functional recovery after spinal cord injury [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 89: 110-119. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.05.030.
- [17] Li FX, Xu F, Lin X, et al. The role of Substance P in the regulation of bone and cartilage metabolic activity [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 77. DOI: 10.3389/fendo.2020.00077.
- [18] Wang L, Zhao R, Shi X, et al. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity *in vitro* [J]. Bone, 2009, 45(2): 309-320. DOI: 10.1016/j.bone.2009.04.203.
- [19] 惠婷, 张广灿, 冯丹丹, 等. 神经肽P物质及骨形态发生蛋白信号通路在ST2细胞成骨分化过程中的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2018, 36(4): 378-383. DOI: 10.7518/hxkq.2018.04.006.
- [20] Lamalice L, Houle F, Jourdan G, et al. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF - induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38 [J]. Oncogene, 2004, 23(2): 434-445. DOI: 10.1038/sj.onc.1207034.
- (收稿日期: 2022-10-18)
(本文编辑: 王嫚)