

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.005

三维联合培养牙髓细胞和血管内皮祖细胞促进成牙本质向 / 成骨向分化*

陈 婷^{1,2,3} 侯 晋³ 李心竹^{1,3} 宋 词^{1,3} 张雪洋² 吴补领^{1,3Δ}

(1 南方医科大学南方医院口腔科 广东 广州 510515;

2 南方医科大学顺德医院(佛山市顺德区第一人民医院) 广东 佛山 528300;3 南方医科大学口腔医学院 广东 广州 510515)

摘要 目的:探讨三维联合培养牙髓细胞(dental pulp cells, DPCs)和血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)对成牙本质向 / 成骨向分化的影响。**方法:**取单独培养 DPCs 及联合培养的 DPCs 和 EPCs 进行三维培养后成牙本质向 / 成骨向诱导,使用茜素红染色及半定量分析、RT-PCR 和细胞免疫荧光检测成牙本质向 / 成骨向分化能力。采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行统计学分析。**结果:**茜素红染色显示联合培养组和单独培养组之间未见显著差异。RT-PCR 和细胞免疫荧光显示成牙本质向 / 成骨向相关基因 mRNAs 和蛋白表达水平联合培养组显著高于单独培养组。**结论:**三维联合培养的 DPCs 和 EPCs 促进成牙本质向 / 成骨向分化,为牙髓再生提供可能实验依据。

关键词:牙髓细胞;血管内皮祖细胞;三维联合培养;成牙本质向 / 成骨向分化

中图分类号:R-33;Q813;R78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3028-05

Three-dimensional Coculture of Dental Pulp Cells and Endothelial Progenitor Cells Enhances Osteo/odontogenic Differentiation*

CHEN Ting^{1,2,3}, HOU Jin³, LI Xin-zhu^{1,3}, SONG Ci^{1,3}, ZHANG Xue-yang², WU Bu-ling^{1,3Δ}

(1 Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China;

2 Shunde Hospital, Southern Medical University (The First People's Hospital of Shunde Foshan), Foshan, Guangdong, 528300, China;

3 School of Stomatology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510515, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of three-dimensional coculture of dental pulp cells (DPCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) on the osteo/odontogenic differentiation. **Methods:** After osteo/odontogenic induced of three-dimensional culture of the coculture of DPCs and EPCs and the culture of DPCs, Alizarin red stain, RT-PCR and immunofluorescence were used to detect the osteo/odontogenic differentiation. The data was analyzed using SPSS 23.0 software package. **Results:** Alizarin red stain showed that it is no significant differences between the coculture group and the culture group. RT-PCR and immunofluorescence showed that the coculture group is significant higher than the culture group on the mRNA and protein level of osteo/odontogenic differentiation. **Conclusions:** Three-dimensional coculture of dental pulp cells and endothelial progenitor cells enhances osteo/odontogenic differentiation.

Key words: Dental pulp cells; Endothelial progenitor cells; Three-dimensional coculture; Osteo/odontogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813; R78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)16-3028-05

前言

目前口腔临床上最常见的疾病是牙髓炎和根尖周炎,而牙髓由于其自身的特点,一旦受损就很难恢复,目前针对其最有效的治疗方法是根管治疗^[1]。牙齿在缺乏血管滋养且失去神经系统及免疫系统的保护的情况下,脆性增强,从而导致患牙的抗性下降,容易出现牙折和根裂等情况^[2]。因此,对于感染牙髓的理想治疗方法为再生性牙髓治疗^[3]。近年来,研究人员^[4,5]对不同种类的细胞联合培养体系进行研究,发现促进或抑制细胞的功能,同时还发现共培养体系中多种因子的变化与机体中生理状态下的改变一致,因此认为多种细胞共培养是构建生理微环

境的有效技术。我们的前期实验证实:三维联合培养牙髓细胞(dental pulp cells, DPCs)和血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)可促进组织的血管形成。本实验通过三维联合培养 DPCs 和 EPCs,以促进组织的成牙本质向 / 成骨向分化。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清、DMEM 培养液、细胞培养瓶购自 Corning 公司;I 型胶原酶、胰酶、青霉素 / 链霉素、地塞米松购自 Sigma 公司;EBM-2-MV 购自 Lonza 公司;细胞培养皿购自 Costar 公司;Perfecta3D Hanging Drop Plates 3D 培养板购自 3D Biomatrix

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81800950;81870755;81670986)

作者简介:陈婷(1986-),女,博士研究生,博士后,主要研究方向:牙发育学,E-mail: 252199453@qq.com

Δ 通讯作者:吴补领(1958-),男,博士生导师,教授,主要研究方向:牙发育学,E-mail: bulingwu@smu.edu.cn,电话:020-61642021

(收稿日期:2019-05-06 接受日期:2019-05-30)

公司;Ficol 购自 GE 公司;Fibronectin、抗体、MD5 多功能酶标仪、流式细胞仪购自 BD 公司;细胞培养箱购自 Heraeus;离心机购自 Eppendorf 公司;细胞超净工作台购自 Baker 公司;倒置显微镜购自 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取 16-25 岁志愿者(签订知情同意书)因正畸减数或阻生而拔除的健康完整恒牙,用组织块预消化培养法培养 DPCs^[6]。待细胞长满瓶底约 80%时,常规传代并扩大培养。用采血袋收集健康志愿者(签订知情同意书)脐带血,用密度梯度离心法培养 EPCs^[7]。待细胞出现克隆化生长时,常规传代并扩大培养。分别取第 3 代 DPCs 及第 5 代 EPCs,通过流式细胞检测分析细胞表面标记物(CD71、CD90、CD31、KDR 和 CD105 等)^[8-10],对 DPCs 和 EPCs 进行鉴定。

1.2.2 实验分组 取第 2-5 代的 DPCs 与第 5-10 代的 EPCs 按照细胞数 1:1 和 2:0 的比例,以 1×10^5 cell/孔的接种细胞密度接种至三维培养板中,分为联合培养组和单独培养组,每天换液,于第 3 天收集细胞。换用矿化诱导液进行成牙本质/成骨方向诱导 21 天。

1.2.3 茜素红染色及半定量实验 收集细胞后,去除培养基,用 PBS 轻轻漂洗数次;4%多聚甲醛固定 30 min;PBS 清洗,加入 1%的茜素红染色液,染色 6-30 min;PBS 漂洗直至无颜色为止;镜下观察拍照。拍照后 PBS 室温孵育 15 min;PBS 漂洗,弃上清;加入适量氯化十六烷基基置,室温孵育 30 min;吸取上清,使用酶标仪测定 562 nm 波长处吸光度 OD 值,用氯化十六烷基基溶液调零,并同时测定未加茜素红的细胞的上清液为阴性对照,每个样本重复 3 次;计算公式:样本测定值 OD=样本吸光值 OD-阴性对照组吸光值 OD。

1.2.4 RT-PCR 检测 ALP、DSPP、OPN 和 DMP-1 mRNA 水平 收集联合培养组和单独培养组细胞后,提取 RNA,测定 RNA 浓度,逆转录 RNA 至 cDNA 后,使用表 1 中的引物序列进行定量 PCR。记录每个样本的 Ct 值(循环阈值),平行重复测量 3 次,求 Ct 平均值作为每个样本的 Ct 值。每组基因均以单独培养组为对照, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因的相对表达量。

1.2.5 细胞免疫荧光检测 DMP-1 蛋白表达 收集联合培养组和单独培养组细胞后,消化制备成密度为 1×10^4 cell/mL 的

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 The primer sequence for RT-PCR

ID	seq
ALP- homo-F	CCAAAGGCTTCTTCTTGCTG
ALP- homo-R	CCACCAAATGTGAAGACGTG
DSPP- homo-F	TCACAAGGGAGAAGGGAATG
DSPP- homo-R	TGCCATTGCTGTGATGTTT
OPN- homo-F	TGAAACGAGTCAGCTGGATG
OPN- homo-R	TGAAATTCATGGCTGTGGAA
DMP-1-homo-F	AGTGCCCAAGATACCACCAG
DMP-1-homo-R	CATTCCCTCATCGTCCAAC
GAPDH-F	TCACCAGGCTGCTTTTAAC
GAPDH-R	GACAAGCTTCCCGTCTCAG

细胞悬液;将 2 mL 的细胞悬液接种于六孔板中的玻片上,37℃、5% CO₂ 培养箱内培养;观察细胞状态,待细胞在盖玻片上生长融合到 80%-90%;去除各孔培养基,PBS 清洗;4%多聚甲醛常温固定 30 min;0.2%的 Triton X-100 通透 10 min;5%的 BSA 封闭 30 min;加一抗,4℃孵育过夜;荧光二抗于 37℃孵育 1h(此步开始避光操作);DAPI 染核,95%甘油封片,镜下观察拍照即可。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,统计数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数的比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养及鉴定

从牙髓组织中分离得到的细胞贴壁生长,呈长梭形、成纤维样细胞形态,3-5d 传代一次,随着生长密度增加,细胞呈现放射状或涡旋状排列(见图 1A)。流式细胞分析结果显示间充质组织的干细胞表面标记物 CD71 和 CD90 呈(+)表达,表达率分别为 99.51%和 99.79%(见图 1B)。可认为所培养的细胞为牙髓组织来源的间充质干细胞牙髓细胞。

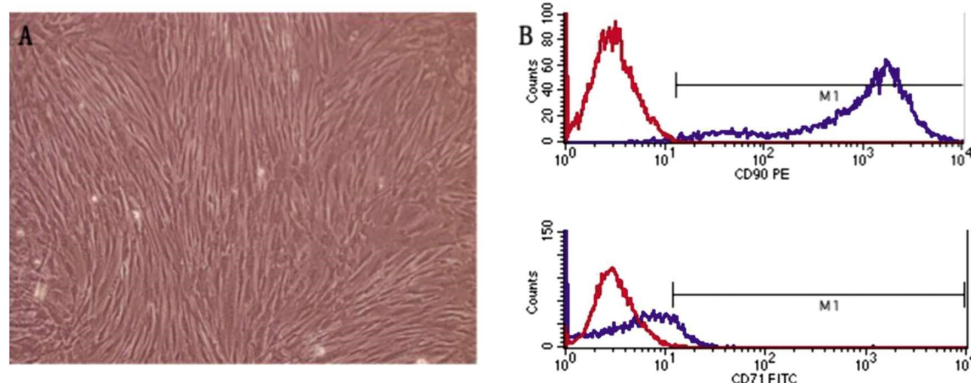


图 1 牙髓细胞的鉴定

A 形态学鉴定($\times 100$) B 流式检测细胞表面标记物

Fig.1 Identification of dental pulp cells

A cell morphology($\times 100$) B Cell surface markers by flow cytometry

从脐带血中分离得到的细胞原代培养第 5d 呈长梭状, 2w 后呈克隆生长, 平均 2-3d 传代一次, 随着生长密度增加, 细胞呈现铺路石状排列(见图 2)。流式细胞分析结果显示造血细胞表面标记物 CD14 和 CD45 呈阴性表达, 表达率分别为 1.1% 和 0.06%; 内皮细胞表面标记物 CD105、CD31 和 KDR⁺CD105⁺呈

阳性表达, 表达率分别为 98.91%、99.82% 和 92.11%; 干细胞表面标记物 CD133 和 CD34 呈阴性表达, 表达率分别为 0% 和 7.51%(见图 3)。可认为所培养的细胞为脐带血组织来源的内皮祖细胞。

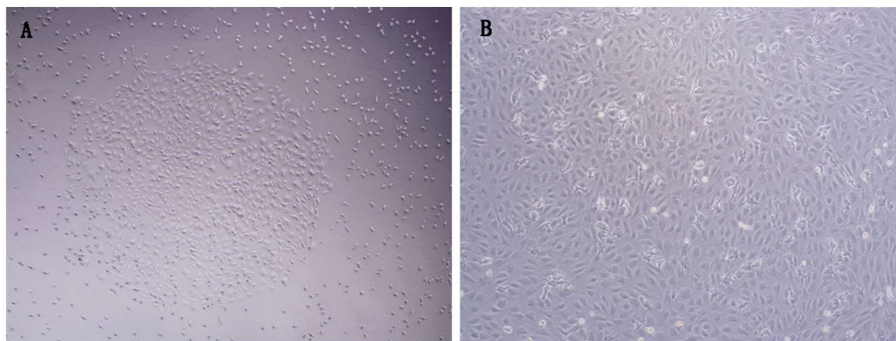


图 2 内皮祖细胞形态学

A: 原代培养第 2 周(× 40); B: 传代第 3 代第 3 天(× 100)

Fig. 2 Cell morphology of Endothelial progenitor cells

A: Primary cultivation on week 2(× 40); B: Passage 3 on day 3(× 100)

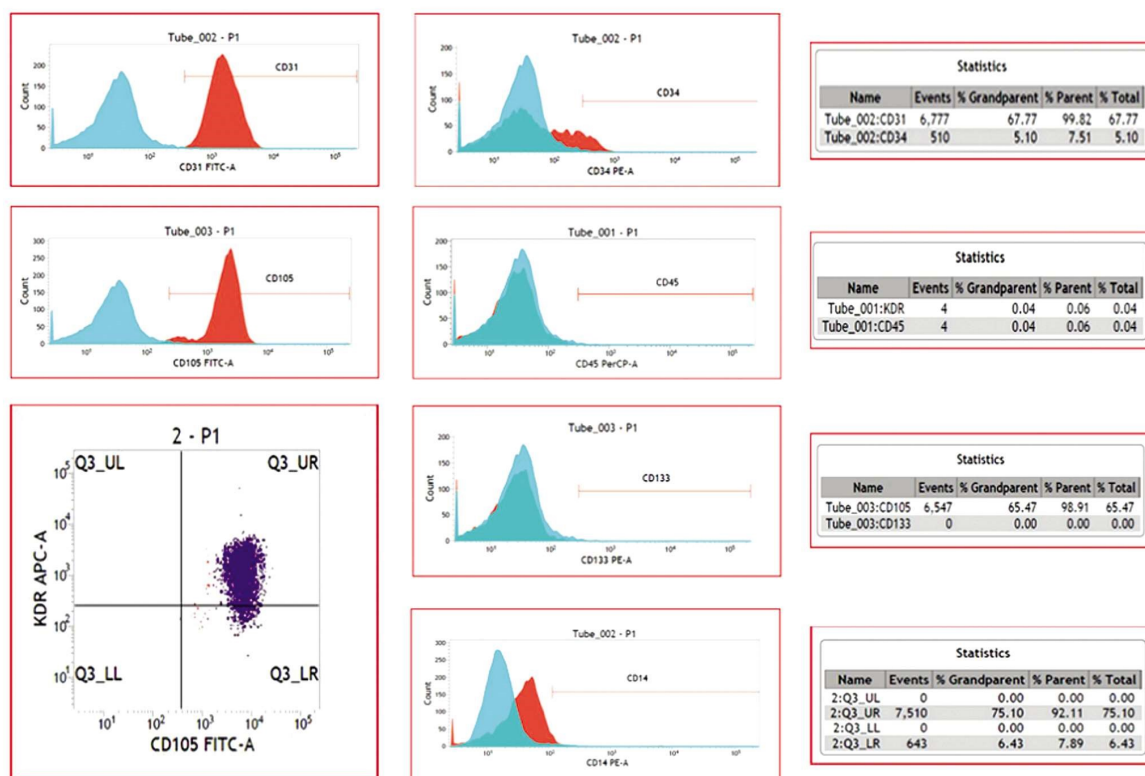


图 3 内皮祖细胞细胞表面标记流式检测

Fig. 3 Cell surface markers of Endothelial progenitor cells by flow cytometry

2.2 茜素红染色及半定量情况的比较

联合培养组和单独培养组茜素红染色均可见大小不等的红褐色矿化结节, 两组颜色未见显著差异(见图 4)。半定量试验结果(表 2)与大体染色结果趋势一致, 两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 ALP、DSPP、OPN 和 DMP-1 的 mRNA 表达水平

RT-PCR 结果(见图 5)显示, 在 mRNA 水平上两组细胞中 ALP、DSPP、OPN 和 DMP-1 的表达量之间均存在显著差异, 联

合培养组的表达量均较单独培养组高。联合培养组的 ALP 是单独培养组的 1.58 倍, 具有统计学意义($P=0.022$)。联合培养组的 DSPP 是单独培养组的 2.10 倍, 具有统计学意义($P=0.028$)。联合培养组的 OPN 是单独培养组的 1.81 倍, 具有统计学意义($P=0.026$)。联合培养组的 DMP-1 是单独培养组的 1.82 倍, 具有统计学意义($P=0.003$)。

2.4 DMP-1 的蛋白表达水平

细胞免疫荧光(见图 6)显示, 两组细胞在胞浆部位均可见

明显的绿色荧光,说明 DMP-1 表达在联合培养组中较强一些。

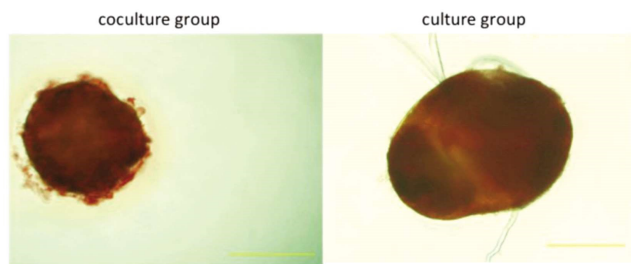


图 4 两组细胞茜素红染色的比较($\times 40$)

Fig.4 Comparison of the Alizarin red stain of cells between two different groups ($\times 40$)

表 2 两组细胞茜素红染色半定量数据

Table 2 The alizarin stain OD values of two different groups

Groups	N	$\bar{x} \pm s$	P
Coculture group	3	0.50 ± 0.04	>0.05
Culture group	3	0.53 ± 0.03	

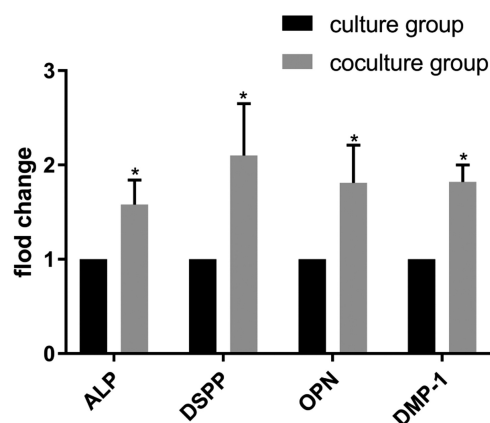


图 5 RT-PCR 检测两组细胞 ALP、DSPP、OPN 和 DMP-1 mRNA 水平
Fig.5 The mRNA expression level of ALP, DSPP, OPN 和 DMP-1 in two different groups by RT-PCR

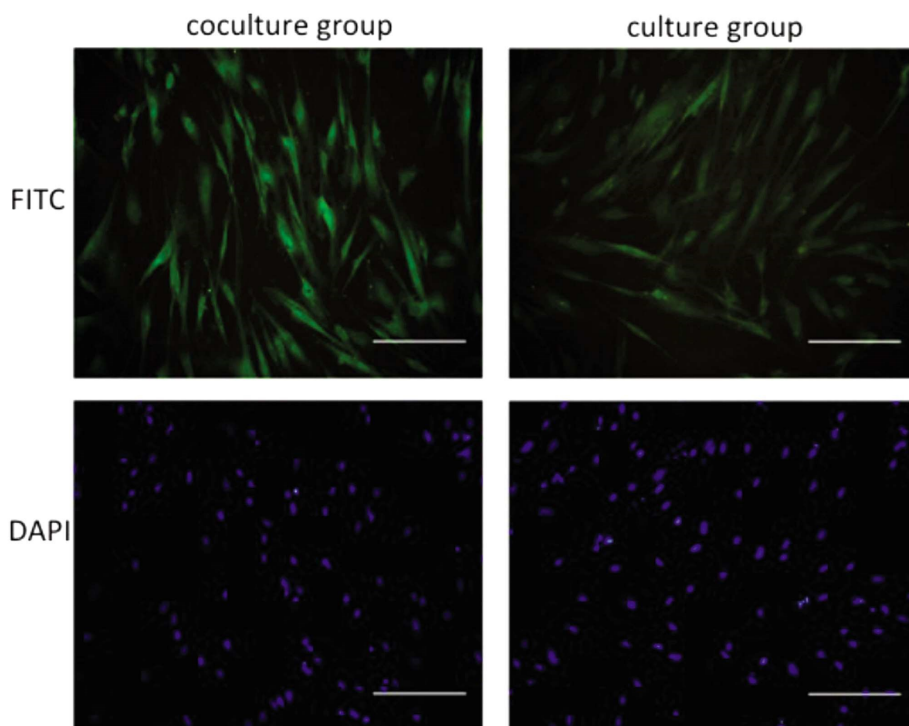


图 6 细胞免疫荧光检测两组细胞 DMP-1 的表达($\times 100$)

Fig.6 The expression of DMP-1 in two different groups by immunofluorescence ($\times 100$)

3 讨论

牙髓再生即通过体外在诱导细胞成牙本质向分化后,整合入血管、神经等形成三维结构,移植到消毒的根管内并为其提供血管和神经再生的微环境,使移植的组织生存并形成牙髓组织,发挥牙髓该有的功能^[11]。组织再生时往往是由多种细胞及因子共同参与完成。因此在构建再生性组织时,应充分考虑与生理状态的贴合^[12]。用于牙髓再生的种子细胞很多,目前关注最多的就是牙髓细胞/牙髓干细胞^[13]。本研究对牙髓细胞进行三维培养,可观察到三维培养后的牙髓细胞具有成牙本质向/

成骨向分化的能力,这与 2014 年 Yamamoto 等^[14]对牙髓细胞三维培养后促进成牙本质向/成骨向分化的研究结果一致。2018 年 Itoh Y 等^[15]直接将无支架三维培养牙髓干细胞运用于牙髓再生研究领域。

解决了牙髓再生过程中的三维结构及成牙本质向分化的问题,接踵而至的问题就是血管及神经的再生。因此有学者提出在细胞培养体系中引入血管内皮细胞^[16],大量的研究关注了^[17,18]三维联合培养体系中促进血管形成。2019 年 de Cara SPHM 等^[19]将根尖牙乳头干细胞和人脐静脉血管内皮细胞进行联合培养,观察到血管新生。我们的前期实验也证实了三

联合培养 DPCs 和 EPCs 可观察到血管的新生。但是不同种类的细胞联合培养体系也可能发现抑制细胞功能的作用。因此我们提出了一个疑问:血管内皮细胞的加入是否会影响牙髓细胞的成牙本质向 / 成骨向分化能力?

本研究结果显示血管内皮细胞的加入将促进牙髓细胞的成牙本质向 / 成骨向分化能力。我们选用更适合牙髓再生的 DPCs 与更适合血管再生的 EPCs 进行三维联合培养对其成牙本质能力从基因水平到细胞水平进行检测。结果发现联合培养组和单独培养组茜素红染色均显示两者均可见矿化结节的产生,说明两组均能向成牙本质方向分化。在基因水平检测了成牙本质向 / 成骨向分化相关基因 ALP、DSPP、OPN 和 DMP-1 的表达。ALP^[20]是成熟成骨细胞的标志性酶之一。有学者^[21]认为 ALP 的活性是体外培养的牙髓细胞分化的一个重要标志。DSPP^[22]被认为是成牙本质细胞的特异性标志物。OPN^[23]可以沉积到基质中促进牙本质矿化,在黏附、重塑和骨整合等方面发挥重要作用。DMP-1^[24]参与调控成骨细胞和成牙本质细胞分化并参与骨骼和牙本质的矿化。细胞免疫荧光结果和 RT-PCR 结果表明在联合培养的情况下,EPCs 能通过直接接触 DPCs,促进成牙本质向 / 成骨向分化的相关基因的表达,达到促进 DPCs 成牙本质向 / 成骨向分化的能力。这与 2017 年 Jin GZ 等^[25]研究结果一致,Jin GZ 等观察到内皮细胞与牙髓干细胞的三维联合培养体系中内皮细胞对牙髓干细胞的体外成骨能力具有促进作用。与 2018 年 Fan X 等^[26]研究结果一致,Fan X 等观察到人脐静脉内皮细胞与骨髓间充质干细胞的联合培养体系中人脐静脉内皮细胞明显促进骨髓间充质干细胞的成骨分化能力。而本研究区别于这两个研究的是,本研究使用的 EPCs 是一种更具有干性的血管内皮细胞,其细胞增殖率和细胞活性均优于内皮细胞,且可分化成为成熟的内皮细胞^[27,28]。并且本实验三维联合培养体系使用的是无支架系统,能使得细胞与细胞之间的接触更紧密^[29,30]。

总而言之,本实验成功构建了 DPCs 和 EPCs 的三维联合培养体系,且观察到该体系对成牙本质向 / 成骨向分化能力具有促进作用,但具体的机制有待进行进一步研究。结合前期研究发现本研究构建三维联合培养体系也能促进血管形成。因此可以认为,牙髓再生过程中,DPCs 与 EPCs 的三维联合培养体系更接近牙髓组织的生理状态下细胞间相互作用,提示该体系在牙髓再生的可能应用前景。

参考文献(References)

- [1] Mohammadi Z, Abbott PV, Shalavi S, et al. Postoperative Pain Following Treatment of Teeth with Irreversible Pulpitis: A Review[J]. N Y State Dent J, 2017, 83(1): 44-53
- [2] McGuigan MB, Louca C, Duncan HF. Clinical decision-making after endodontic instrument fracture[J]. Br Dent J, 2013, 214(8): 395-400
- [3] 雷港,张光东,于金华. 牙髓再生的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2011, 38(3): 292-2926
- [4] Snyder-Talkington BN, Dong C, Castranova V, et al. Differential gene regulation in human small airway epithelial cells grown in monoculture versus coculture with human microvascular endothelial cells following multiwalled carbon nanotube exposure [J]. Toxicol Rep, 2019, 28(6): 482-488
- [5] Liu J, Chuah YJ, Fu J, et al. Co-culture of human umbilical vein endothelial cells and human bone marrow stromal cells into a micro-cavitory gelatin-methacrylate hydrogel system to enhance angiogenesis [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 102(9): 906-916
- [6] Shiliang Guo, Dandrich Lim, Zhihong Dong, et al. Dentin Sialophosphoprotein: A Regulatory Protein for Dental Pulp Stem Cell Identity and Fate[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(23): 2883-2894
- [7] Shizu Tsukada, Sang-Mo Kwon, Takenori Matsuda, et al. Identification of mouse colony-forming endothelial progenitor cells for postnatal neovascularization: a novel insight highlighted by new mouse colony-forming assay[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(1): 20
- [8] Suchanek J, Soukup T, Visek B, et al. Dental pulp stem cells and their characterization [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2009, 153(1): 31-35
- [9] Fatima N, Khan AA, Vishwakarma SK. Immunophenotypic and Molecular Analysis of Human Dental Pulp Stem Cells Potential for Neurogenic Differentiation[J]. Contemp Clin Dent., 2017, 8(1): 81-89
- [10] Rapp BM, Saadatzedeh MR, Ofstein RH, et al. Resident Endothelial Progenitor Cells From Human Placenta Have Greater Vasculogenic Potential Than Circulating Endothelial Progenitor Cells From Umbilical Cord Blood[J]. Cell Med, 2011, 2(3): 85-96
- [11] Morsczeck C, Reichert TE. Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future[J]. Expert Opin Biol Ther, 2018, 18(2): 187-196
- [12] Hashemi-Beni B, Khoroushi M, Foroughi MR, et al. Tissue engineering: Dentin-pulp complex regeneration approaches (A review)[J]. Tissue Cell, 2017, 49(5): 552-564
- [13] Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration[J]. Oral Dis, 2018, 24(5): 696-705
- [14] Yamamoto M, Kawashima N, Takashino N, et al. Three-dimensional spheroid culture promotes odonto/osteoblastic differentiation of dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 2014, 59(3): 310-317
- [15] Itoh Y, Sasaki JI, Hashimoto M, et al. Pulp Regeneration by 3-dimensional Dental Pulp Stem Cell Constructs[J]. J Dent Res, 2018, 97(10): 1137-1143
- [16] Dissanayaka WL, Zhang C. The Role of Vasculature Engineering in Dental Pulp Regeneration[J]. J Endod, 2017, 43(9S): S102-S106
- [17] Luzuriaga J, Pastor-Alonso O, Encinas JM, et al. Human Dental Pulp Stem Cells Grown in Neurogenic Media Differentiate Into Endothelial Cells and Promote Neovascularogenesis in the Mouse Brain [J]. Front Physiol, 2019, 10(3): 347
- [18] Aksel H, Huang GT. Human and Swine Dental Pulp Stem Cells Form a Vascularlike Network after Angiogenic Differentiation in Comparison with Endothelial Cells: A Quantitative Analysis [J]. J Endod, 2017, 43(4): 588-595
- [19] de Cara SPHM, Origassa CST, de Sá Silva F, et al. Angiogenic properties of dental pulp stem cells conditioned medium on endothelial cells in vitro and in rodent orthotopic dental pulp regeneration[J]. Heliyon, 2019, 5(4): e01560
- [20] Hu X, Zhong Y, Kong Y, et al. Lineage-specific exosomes promote the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (DPSCs) through TGFβ1/smads signaling pathway via transfer of microRNAs[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 170

- [11] Zhang J, Cai H, Sun L, et al. LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/beta-catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 225
- [12] Li K, Wei L, Huang Y, et al. Leptin promotes breast cancer cell migration and invasion via IL-18 expression and secretion [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6): 2479-2487
- [13] 罗敏, 吴爱祥, 郑林龙, 等. 自噬在熊果酸抑制人肺癌 PC9 细胞增殖中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, (03): 464-468
- [14] 陈亚楠, 杨如, 许芝山, 等. 过表达 IL-18 抑制人结肠癌细胞 HCT-116 的增殖[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, (02): 142-147
- [15] Xiao Q, Zheng F, Tang Q, et al. Repression of PDK1- and LncRNA HOTAIR-Mediated EZH2 Gene Expression Contributes to the Enhancement of Atractylenolide 1 and Erlotinib in the Inhibition of Human Lung Cancer Cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(4): 1615-1632
- [16] Pawar V K, Singh Y, Sharma K, et al. Improved chemotherapy against breast cancer through immunotherapeutic activity of fucoidan decorated electrostatically assembled nanoparticles bearing doxorubicin[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018[Epub ahead of print]
- [17] Shen Z, Seppanen H, Vainionpaa S, et al. IL10, IL11, IL18 are differently expressed in CD14⁺ TAMs and play different role in regulating the invasion of gastric cancer cells under hypoxia [J]. *Cytokine*, 2012, 59(2): 352-357
- [18] Krishnaswamy S, Bukhari I, Mohammed A K, et al. Identification of the splice variants of Recepteur d'Origine nantais (RON) in lung cancer cell lines[J]. *Gene*, 2018[Epub ahead of print]
- [19] Zhao X, Qu J, Liu X, et al. Baicalein suppress EMT of breast cancer by mediating tumor-associated macrophages polarization [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(8): 1528-1540
- [20] Weimbs T. Are Cyst-Associated Macrophages in Polycystic Kidney Disease the Equivalent to TAMs in Cancer? [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018[Epub ahead of print]
- [21] van Rooijen J M, Qiu S Q, Timmer-Bosscha H, et al. Androgen receptor expression inversely correlates with immune cell infiltration in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 103: 52-60
- [22] 李程豪, 骆亚莉, 刘永琦, 等. 肿瘤微环境与中性粒细胞相互作用关系的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2018, (11): 847-850
- [23] 蔡莉, 胡金晨, 姜蕾, 等. 成纤维细胞活化蛋白和成纤维细胞特异性蛋白 -1 在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义[J]. *滨州医学院学报*, 2018, (05): 339-342
- [24] 马博昭, 王小东, 王金森, 等. 吡非尼酮抑制肿瘤相关成纤维细胞促进结肠癌细胞系 HT29 上皮间质转化的作用及机制 [J]. *天津医科大学学报*, 2018, (05): 399-403
- [25] 李莹歌, 姚颀, 宋启斌, 等. 肿瘤免疫治疗不容忽视的微环境: 癌相关成纤维细胞[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, (11): 1060-1064
- [26] 孙祖刚, 刘硕, 王哲, 等. 炎症细胞和促炎性细胞因子在膀胱肿瘤炎症微环境中的作用概述 [J]. *湖北科技学院学报 (医学版)*, 2018, (05): 451-454
- [27] 彭娜, 康马飞. 上皮细胞 - 间充质转化与非小细胞肺癌预后和耐药关系研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2018, (21): 3327-3330
- [28] 修秉波, 吴刚, 孙培春, 等. 肿瘤相关成纤维细胞激活 Thy-1 调控胃癌细胞发生间质转化及迁移能力的研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, (07): 996-1000
- [29] 周丹, 许鹏程, 张敏, 等. 色素上皮衍生因子通过调控上皮间质转化抑制乳腺癌细胞侵袭和转移[J]. *南方医科大学学报*, 2018, (01): 1-7
- [30] 学峰, 乌新林. 癌相关成纤维细胞与 EMT 关系的研究进展 [J]. *内蒙古医科大学学报*, 2018, (04): 417-422

(上接第 3032 页)

- [21] Wang X, Jin T, Chang S, et al. In vitro differentiation and mineralization of dental pulp stem cells on enamel-like fluorapatite surfaces[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(11): 821-830
- [22] Wang YY, Zhu NX, Zhao YM, et al. Mineralisation Influence of Betamethasone on Lipopolysaccharide-Stimulated Dental Pulp Cells [J]. *Chin J Dent Res*, 2019, 22(2): 123-129
- [23] Di Benedetto A, Brunetti G, Posa F, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from dental bud: Role of integrins and cadherins[J]. *Stem Cell Res*, 2015, 15(3): 618-628
- [24] Xiao J, Cao P, Wang C, et al. The Forkhead Box C1, a Novel Negative Regulator of Osteogenesis, Plays a Crucial Role in Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells [J]. *Cell Reprogram*, 2018, 20(5): 312-319
- [25] Jin GZ, Kim HW. Co-culture of Human Dental Pulp Stem Cells and Endothelial Cells Using Porous Biopolymer Microcarriers: A Feasibility Study for Bone Tissue Engineering [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2017, 14(4): 393-401
- [26] Fan X, Teng Y, Ye Z, et al. The effect of gap junction-mediated transfer of miR-200b on osteogenesis and angiogenesis in a co-culture of MSCs and HUVECs[J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(13): 216135
- [27] Peters EB. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2018, 24(1): 1-24
- [28] H. Chopra, M. K. Hung, D. L. Kwong, et al. Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and Prospects[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 9847015
- [29] Yadav M, Agrawal H, Pandey M, et al. Three-dimensional culture of buffalo granulosa cells in hanging drop mimics the preovulatory follicle stage[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(3): 1959-1970
- [30] Sueyama Y, Kaneko T, Ito T, et al. Implantation of Endothelial Cells with Mesenchymal Stem Cells Accelerates Dental Pulp Tissue Regeneration/Healing in Pulpotomized Rat Molars[J]. *J Endod*, 2017, 43(6): 943-948