

MIP-3 α 联合成骨诱导因子诱导大鼠脂肪干细胞向成牙本质样细胞分化 *陈 晞 吴国锋 白石柱 赵钦民 Δ

(第四军医大学口腔医院修复科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察巨噬细胞炎性蛋白-3 α (MIP-3 α)对大鼠脂肪干细胞(Adipose derived stem cells, ASCs)向成牙本质样细胞体外分化作用的影响。方法:分离、培养并鉴定大鼠 ASCs;以 MIP-3 α 联合成骨诱导因子(地塞米松、 β -甘油磷酸钠,以及抗坏血酸)诱导第3代大鼠 ASCs 向成牙本质样细胞定向分化。诱导培养 1、4、7d 后,分别测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,并用 RT-PCR 及 Western Blot 检测成牙本质细胞的标志基因 dspp 及标志物牙本质涎蛋白(DSP)。结果:与单独加入成骨诱导因子相比, MIP-3 α 与成骨诱导因子联合应用能使 ALP 活性、dspp 的 mRNA 表达以及 DSP 升高。结论:本研究显示 MIP-3 α 与成骨诱导因子联合应用可以增强成牙本质细胞相关基因以及蛋白的表达,为牙齿再生种子细胞的寻找开辟了一条新思路。

关键词: MIP-3 α ; 成牙本质样细胞; 脂肪干细胞; dspp; DSP

中图分类号: R783 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)15-2876-06

Induction of Odontoblast-Like Cells From Rat Adipose Derived Stem Cells by MIP-3 α Combined with Osteogenic Factors *in Vitro**CHEN Xi, WU Guo-feng, BAI Shi-zhu, ZHAO Yi-min Δ

(Department of Prosthodontics, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of MIP-3 α on rat adipose derived stem cells' differentiation into odontoblast-like cells *in vitro*. **Method:** Rat adipose-derived stem cells were isolated, cultured and their multi-potential differentiation capacities were analyzed. Osteogenic factors (dexamethasone, β -glycerophosphate and ascorbic acid) were used to induce rat ASCs to differentiated into odontoblast-like cells in the presence or absence of MIP-3 α . At Day 1, 4, and 7, ALP activity was measured, and dspp and DSP were examined by RT-PCR and Western Blotting, respectively. **Results:** The combination use of MIP-3 α and osteogenic factors increased ALP activity, dspp expression, and DSP protein level as compared with osteogenic factors alone group. The control group showed the lowest ALP activity and no dspp expression or DSP protein synthesized. **Conclusion:** This study demonstrates that the combination use of MIP-3 α and osteogenic factors may induce rat ASCs to differentiate towards odontoblast-like cells by promoting ALP activity and dspp expression and DSP protein level, and thus provide a new insight for the selection of tooth tissue engineering seed cells.

Key words: MIP-3 α ; Odontoblast-like cells; Adipose derived stem cells; dspp; DSP

Chinese Library Classification: R783 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2876-05

前言

牙齿疾病是人类发病率最高的三大非传染性疾病之一,目前治疗牙齿缺失方法虽已经比较成熟,仍存在不少弊端。组织工程采用新的思路修复和替代因年龄、疾病、损坏和先天性造成的牙齿缺损,提供具有活力、功能和生物相容性的牙相关组织,是一种充满希望的新治疗方法,其目的在于刺激自体重建缺损组织或将体外培养的组织移植回体内,受到越来越广泛的关注^[1]。

目前比较公认的种子细胞分牙源性干细胞^[2-5],如脱落乳牙干细胞 (SHEDs)、牙髓干细胞 (DPSCs)、根尖乳头干细胞 (SCAPs)、牙囊干细胞 (DFSCs) 及牙周膜干细胞 (PDLSCs),以及非牙源性干细胞,如骨髓间充质干细胞 (BMSCs)^[6-7]。目前,虽

然大量研究已证实牙源性干细胞具有良好的成牙分化潜能,但其在成体中来获取困难,来源有限,一定程度上限制了其应用前景。非牙源性干细胞如 BMSCs 与牙源性干细胞在很多生物学特性方面存在相似性,并有研究表明 BMSCs 能在体外诱导形成牙本质及牙周膜样组织,但其在临床上取材亦存在一定的困难与风险。

自 2001 年 Zuk 等^[8]首次在人体内分离出脂肪干细胞 (Adipose-derived stem cells, ASCs) 以来,这一间充质干细胞家族的主要成员收到越来越多的关注和研究。ASCs 是一群成纤维样的基质干细胞,不但具有多向分化潜能,如脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、内皮细胞、神经细胞等,而且具有重要的旁分泌功能,并具有一定的免疫调节作用。另外, ASCs 取材方便,对机体损伤小,获得率高,将会成为很有临床

* 基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAI07B02)

作者简介: 陈晞 (1986-) 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 牙齿再生, 颌面缺损修复,

Tel: 13630230803, E-mail: stephen_0803@126.com

Δ 通讯作者: 赵钦民, Tel: 13572975585, E-mail: Zhaoyim@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-01-23 接受日期: 2012-02-18)

应用前景的干细胞之一。

巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α)是CC-趋化因子家族中的主要成员,能够对包括成骨细胞及成牙本质细胞在内的基质干细胞起到分化引子的作用。本研究通过MIP-3 α 联合成骨诱导因子(地塞米松、 β -甘油磷酸钠,以及抗坏血酸)诱导大鼠脂肪干细胞向成牙本质细胞定向分化,探索分化条件,以期为进一步构建ASCs组织工程牙髓及牙本质提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM/F12培养基,胰酶消化液,左旋抗坏血酸,青-链霉素(Hyclone),地塞米松, β -甘油磷酸钠,EDTA,1-甲基-3-异丁基黄嘌呤,牛胰岛素,吲哚美辛(Sigma),胎牛血清(四季青),荧光标记兔抗大鼠单克隆抗体(CD29-FITC, CD49d-FITC, CD45-FITC, 美国Pierce),茜素红(Cyagen),MTT试剂盒(Sigma),ALP碱性磷酸酶试剂盒(南京建成),RNA抽提试剂盒(Invitrogen),RT-PCR试剂盒(TOYOBO),DNA Marker DL2(TakaRa),MIP-3 α (biovision #4492-20)等。

1.1.2 主要仪器 超净工作台(苏州净化设备厂),细胞培养孵箱(Thermo),台式低速离心机(湘仪TDZ5-W),水浴箱(南京顺流),PCR仪(美国ABI),电泳仪(北京六一DYCP-31DN),高速离心机(湘仪H1650-W),紫外分光光度计(上海江仪UV-7502C),成像系统(柯达紫外显相系统)。

1.1.3 实验动物 清洁级4周龄雄性SD大鼠由第四军医大学动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠ASCs的原代培养 过量戊巴比妥处死大鼠,无菌条件下取双侧腹股沟处脂肪,PBS缓冲液冲洗2遍,剔除肉眼可见的筋膜及血管,眼科剪剪碎,用等量0.1%I型胶原酶于恒温空气摇床中震荡消化40min。加入等体积含10%FBS培养基终止消化,1200rpm离心5min,弃上清,培养基重悬,经200目筛孔过滤后800rpm离心5min,弃去上清。培养基重悬后以 5×10^6 /L接种于培养瓶中。48h后首次换液,以后每隔1~2d换液。观察细胞生长至80%融合时传代。取第3~5代细胞进行试验。

1.2.2 大鼠ASCs表面标志物鉴定 取第3代生长至70~80%融合的大鼠ASCs,以生理盐水洗涤细胞2次,以0.25%胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,1000rpm离心5min,PBS洗涤细胞3次,调整细胞浓度为 1×10^6 /ml,取1毫升细胞悬液,用PBS洗三次,加入上述荧光标记抗体,4℃避光孵育30分钟,加PBS 1ml离心洗涤以洗去未标记抗体,加PBS调至200 μ L体积重悬细胞,上机检测(BD FACSCalibur),以WinMD12.9分析软件记录并分析结果。

1.2.3 MTT试验 取处于对数生长期的第3代细胞,常规消化接种于96孔板,每孔约含细胞 1×10^4 个,置于37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养。每组设3个复孔,1个对照孔,每日定时进行酶联免疫检测。

1.2.4 成骨诱导分化 取生长至70~80%融合的第3代大鼠ASCs,常规消化收获细胞,以含10%FBS的DMEM/F12重悬,计数,以每孔接种105个接种入6孔板;以含10%FBS的DMEM/F12补足至每孔3ml,37℃、5%CO₂、饱和湿度下培养;

24h后倒置相差显微镜下观察细胞贴壁后,更换成骨诱导培养基(DMEM/F12+10%FBS+0.1 μ mol/L地塞米松,50 μ mol/L 2-抗坏血酸钠盐,10mmol/L β -甘油磷酸钠+1%青-链霉素),每4d更换诱导培养基。另设1空白对照组,培养液中不含上述成骨诱导成分。培养2周后,进行细胞碱性磷酸酶染色诱导。3周后进行矿化结节染色。

1.2.5 成脂诱导分化 取生长至70~80%融合的第3代大鼠ASCs,常规消化收获细胞,以含10%FBS的DMEM/F12重悬,计数,以每孔接种105个接种入6孔板;以10%FBS的DMEM/F12补足至每孔3ml,37℃、5%CO₂、饱和湿度下培养;24h后倒置相差显微镜下观察细胞贴壁后更换成脂诱导培养基(DMEM/F12+10%FBS+0.5mmol/L IBMX<1-甲基-3-异丁基黄嘌呤>+1 μ mol/L地塞米松+10 μ mol/L胰岛素+200 μ mol/L吲哚美辛)。另设1空白对照组,培养液中不含上述成脂诱导成分。每周换液2次,诱导2周后,进行油红O染色检测。

1.2.6 成牙本质诱导分化 取生长至70~80%融合的第3代大鼠ASCs细胞,以含10%FBS的DMEM/F12重悬,计数,以 1×10^4 孔接种于12孔板,以含10%FBS的DMEM/F12补足每孔至2ml左右,24h后观察细胞贴壁后根据更换不同培养基分为3组:a)成牙本质诱导液组,即更换成牙本质诱导液(10nM地塞米松,100mg/mL β -甘油磷酸钠,100mg/mL抗坏血酸,以及2ng/mL MIP-3 α) b)成骨诱导液组,即更换成成骨诱导液(10nM地塞米松,100mg/mL β -甘油磷酸钠,100mg/mL抗坏血酸) c)空白对照组,即常规培养基(10%FBS,DMEM/F12,1%青-链霉素)。每2天更换培养基一次,培养7天。根据不同分组消化收集细胞,a)组于第1、4、7天进行下游检测,b)、c)组于第7天进行下游检测。

1.2.6.1 碱性磷酸酶(ALP)活性检测 将每组细胞浓度调整至 1×10^6 个/孔,以PBS洗涤两遍,以200 μ L Assay Buffer超声匀浆,10000g离心3min,取上清待测。每孔加入ALP底物混合液50 μ L,室温避光孵育60min,而后每孔加入10 μ L 0.5mol/L NaOH终止反应,震荡5min,用酶联检测仪选择410nm波长,测定每孔吸光度OD值,取均值。

1.2.6.2 RT-PCR 每组细胞以PBS洗涤两遍,以RNA抽提试剂盒提取细胞总RNA,260/280nm波长测定样本RNA的纯度。在RT反应体系下进行反转录:42℃ 20min,99℃ 5min,4℃ 5min,瞬间离心。分别以大鼠dspp引物及GAPDH引物(见表1)在PCR体系下对cDNA产物进行PCR反应,反应过程为:95℃ 5min,94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 30s,前述3步骤进行30个循环,72℃ 5min,4℃ ∞ 。PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳紫外光曝光胶片记录。

1.2.6.3 Western Blotting 检测大鼠DSP表达 根据Promab蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,参照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书方法测定蛋白浓度。将各组蛋白质浓度调至1mg/mL,6% SDS-PAGE电泳后转膜,加一抗于4℃孵育过夜。TBST洗液振荡洗涤3次。室温下二抗振荡孵育1h后将PVDF膜浸到ECL化学荧光试剂中进行显色和定量分析,以QuantityOne软件测定电泳条带的光密度值,DSP相对表达量=DSP条带光密度值/GADPH条带光密度值。

表 1 检测 dspp 基因 mRNA 的引物序列及扩增片段长度

Table 1 Primer sequences and amplification fragment length dspp by RT-PCR

引物名称 Primer names	序列 Sequences	片段长度(bp) Fragment length
dspp	F 5'-GAAGTGACGGAAGTGATGAT-3'	234
	R: 5'-CATTGTCGTGGTTACTGTTG-3'	
GAPDH	F 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	450
	R 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

1.2.7 统计分析 采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 各组间比较用独立样本 t 检验 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 表面标志物流式鉴定结果

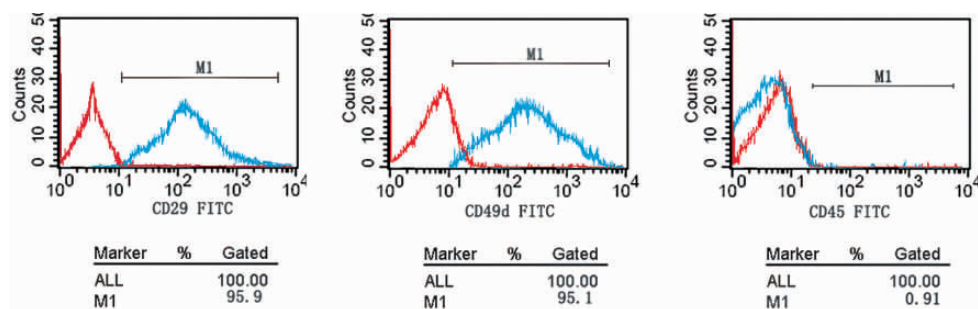


图 1 大鼠 ASCs 表面 CD 分子检测

Fig.1 Surface antigens analysis of rat ASCs by flow cytometry

对大鼠第 3 代 ASCs 表面标志物的流式细胞分析显示: CD29、CD49d 为阳性表达, CD45 为阴性表达 (见图 1)。

2.2 MTT 实验

MTT 实验结果显示第 3 代大鼠 ASCs 生长曲线大致呈 S

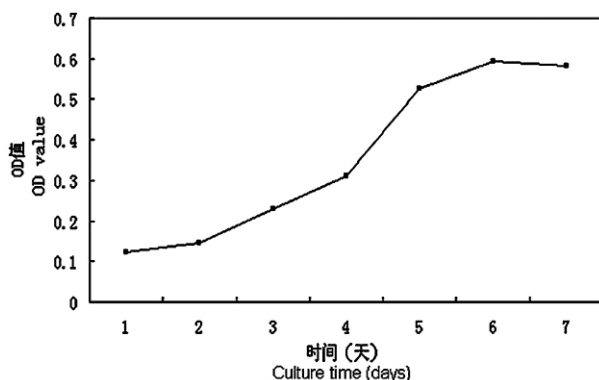


图 2 MTT 法测第 3 代大鼠 ASCs 生长曲线

Fig.2 Growth curve of the 3rd passage of rat ASCs by MTT

形, 1~2 天时细胞处于潜伏期, 3 天后细胞进入对数生长期, 至第 6 天细胞进入平台期 (见图 2)。

2.3 成骨诱导实验

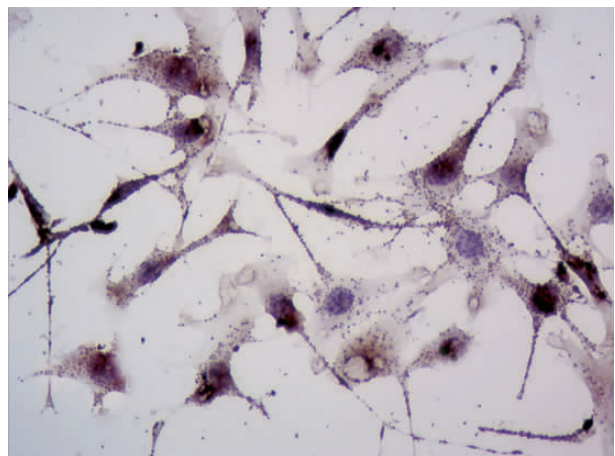
体外成骨诱导 2 周后, 碱性磷酸酶染色呈阳性, 可见胞浆中棕黑色颗粒 (见图 3)。3 周后茜素红染色呈阳性, 可见胞浆中大小不一的红色钙化结节 (见图 4)。

2.4 成脂诱导实验

体外成脂诱导 5d 左右光镜下可见细胞周围出现散在脂滴, 逐渐增大。诱导 2 周后油红 O 染色显示胞质内存在大量圆形红色脂肪颗粒, 胞核蓝染 (见图 5)。

2.5 成牙本质诱导实验

2.5.1 ALP 活性 诱导 7d 时, 与单独应用成骨诱导因子相比, MIP-3 α 与成骨诱导因子联合使用能使 ALP 活性升高 ($P<0.05$)。而随着时间的增加, MIP-3 α 与成骨诱导因子联合使用组

图 3 碱性磷酸酶染色, 可见棕黑色颗粒定位于胞浆中 (400 $\times$)Fig.3 Alkaline phosphatase stain of osteogenic induced rat ASCs. (400 $\times$)

的 ALP 活性亦呈增加趋势 ($P<0.05$)。对照组则显示最低的 ALP 活性 ($P<0.01$) (见图 6、图 7)。

2.5.2 RT-PCR 及 DSP 表达 与单纯应用成骨诱导因子相比, MIP-3 α 与成骨诱导因子联合应用能使大鼠 ASCs 的 dspp 表达及 DSP 水平显著升高, 并且随着时间的推移, 联合应用组的 dspp 表达及 DSP 水平不断提高。对照组无 dspp 基因表达或 DSP 合成 (见图 8、9)。

3 讨论

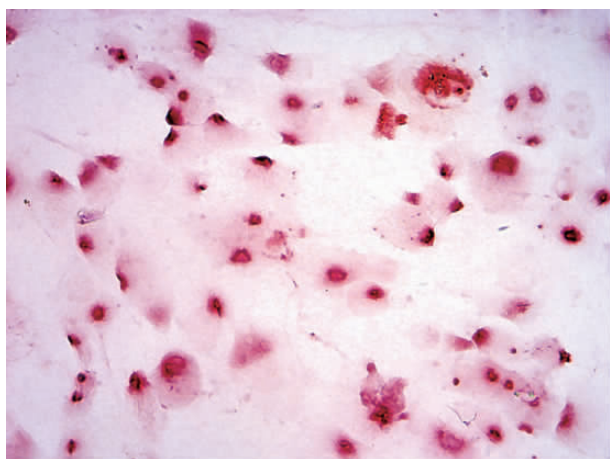


图4 茜素红染色,可见胞浆内红色钙化结节(400×)

Fig. 4 Alizarin red dye of osteogenic induced rat ASCs. (400×)

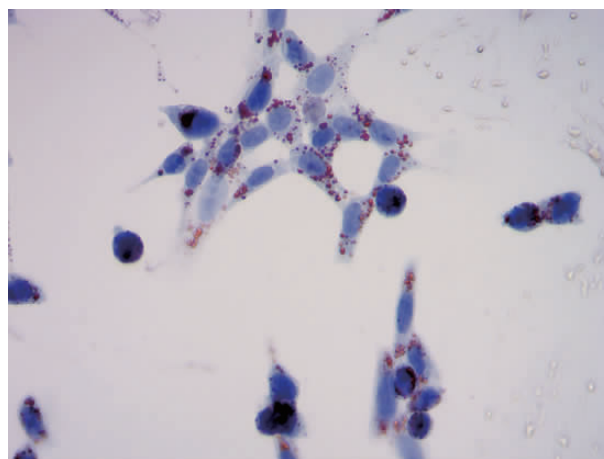


图5 油红O染色,可见胞质内大量红色脂滴,胞核蓝染(400×)

Fig. 5 Oil red O stain of adipogenic induced rat ASCs(400×)

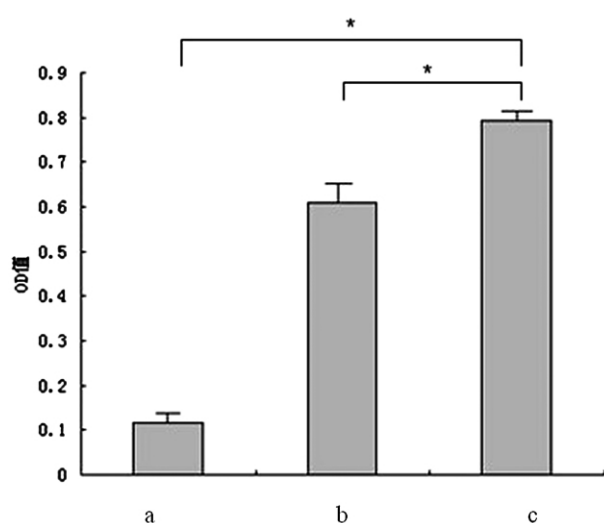


图6 培养7天时各组ALP活性(a:对照组 b:成骨诱导液组 c:成牙本质诱导液组)(*P<0.05)

Fig.6 ALP activity by Day 7(a: control group; b: osteogenic group; c: odontoblast-induced group) (*P<0.05)

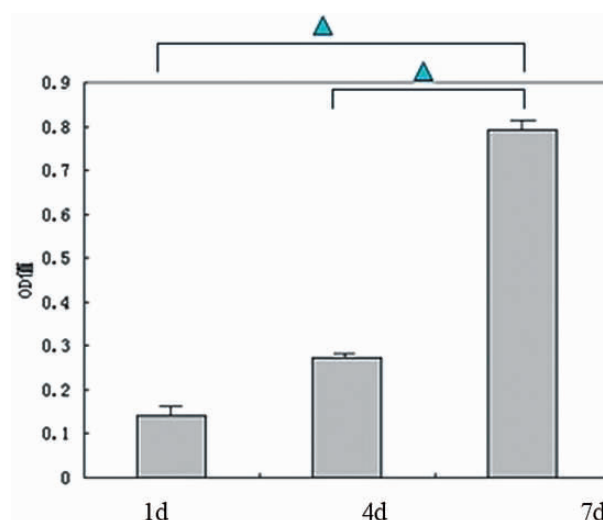


图7 成牙本质诱导不同时间成牙本质诱导后ALP活性

P<0.05)

Fig.7 ALP activity of odontoblast-induced rat ASCs at Day 1, 4, and 7 (P<0.05)

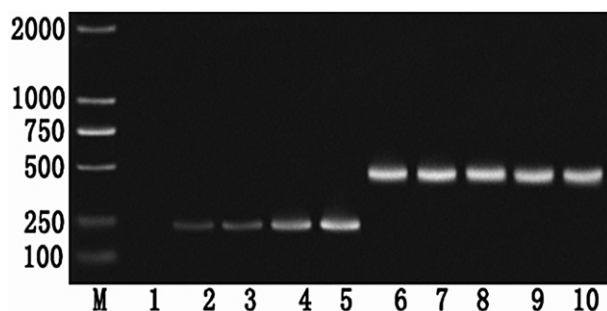


图8 RT-PCR 检测 dspp 基因表达结果(M:参照 1:对照组 2:成骨诱导液 7d 3:成牙本质诱导液 1d 4:成牙本质诱导液 4d 5:成牙本质诱导液 7d 6-10:GAPDH)

Fig.8 dspp expression analysis by RT-PCR (M: maker; 1: control group; 2: osteogenic induction at day 7; 3: odontoblast induction at day 1; 4: odontoblast induction at day 4; 5: odontoblast induction at day 7; 6-10: GAPDH)

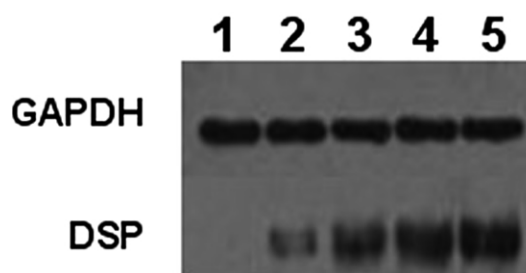


图9 Western Blot 测定 DSP 表达结果(1:对照组 2:成骨诱导液 7d 3:成牙本质诱导液 1d 4:成牙本质诱导液 4d 5:成牙本质诱导液 7d)

Fig.9 Expression file of DSP by Western Blot (1: control group; 2: osteogenic induction at day 7; 3: odontoblast induction at day 1; 4: odontoblast induction at day 4; 5: odontoblast induction at day 7)

种子细胞一直以来都是牙齿再生组织工程研究领域中的热点之一。过去牙齿再生领域中使用的种子细胞多为牙源性干

细胞,因其向牙齿组织分化能力强,受到了人们的广泛关注。近年来,有学者将骨髓基质干细胞(BMSCs)与胚胎期口腔上皮

合物植入体内后观察到牙齿样组织形成^[10]。其后有学者发现大鼠切牙根尖上皮细胞产生的上皮信号能够诱导 BMSCs 表达 dspp 基因,并形成了类似于牙髓-牙本质复合体结构^[7]。然而,牙源性干细胞及 BMSCs 均存在成体内来源有限、体外扩增相对困难、取材不便甚至有创等制约因素。与上述两类细胞相比,脂肪干细胞(ASCs)具有供体创伤小,体内来源丰富,取材方便,体外扩增简单高效等优势,逐渐得到更多学者的关注^[11]。本实验采取原代分离培养大鼠 ASCs 方法,测定细胞增长曲线呈 S 样走行,表面标志物 CD29(+),CD49d(+),CD45(-),这与之前研究相吻合^[12]。而后成骨及成脂诱导分化实验进一步证实其干细胞的多向分化潜能。

CC-趋化因子受体 6(ccr6)是目前已知哺乳动物细胞唯一的 MIP-3 α 受体,有研究表明在受致病菌侵袭的牙本质部位,巨噬细胞高表达 MIP-3 α 以募集下游 CC-趋化因子受体 6(ccr6)表达细胞,启动防御反应^[13]。另有研究表明 MIP-3 α 可以增加牙本质涎磷蛋白基因(dspp)的表达,促进成牙本质细胞的分化^[14]。Iejima^[15]等研究发现 MIP-3 α 可促进人类基质干细胞表达成牙本质细胞相关基因及蛋白,而不影响成骨细胞标志蛋白 CBFA1 或 BSP 的表达。

ALP 是无机焦磷酸脂降解的细胞外酶,能为矿化过程提供局部充足的磷酸盐浓度,其活性通常作为成骨细胞分化的早期标志,也是成牙本质细胞矿化的早期标志之一^[16-17]。Matsuyama^[18]等发现 ALP 参与牙乳头外胚间充质细胞在向成牙本质细胞分化过程中分泌基质的矿化过程。本实验中,MIP-3 α 与成骨诱导液联合应用组的 ALP 活性显著高于单独使用成骨诱导液组,说明 MIP-3 α 可以提高大鼠 ASCs ALP 活性,促进 ASCs 基质的矿化。

由于 ALP 为成骨及成牙本质细胞分化的早期标志,因此本实验检测了诱导分化后大鼠 ASCs dspp 基因及 DSP 蛋白表达情况。dspp 基因是目前已知的成牙本质细胞标志基因^[19-20],其编码的蛋白为牙本质涎蛋白(DSP)及牙本质磷蛋白(DPP),属于牙本质特异性基质非胶原蛋白。陈小红^[21]等将大鼠 ASCs 于牙胚细胞条件培养液中培养 7d 后发现,大鼠 ASCs 能够表达牙本质细胞特异性 DSP 及牙本质基质蛋白-1(DMP-1)。本实验中,将 MIP-3 α 与成骨诱导液联合应用,可以使得大鼠 ASCs 表达 dspp 基因及 DSP 显著高于单独使用成骨诱导液组和对照组,并且表达量随时间逐渐增高,说明 MIP-3 α 与成骨诱导液联合使用可以诱导大鼠 ASCs 向成牙本质细胞分化。然而,本实验中已检测到成骨诱导液组有微量的 dspp 基因表达,与前期研究不符^[15],其产生原因是由于实验误差或者由于物种不同所致,还需后续大量实验继续观察研究。

本实验证明了采用 MIP-3 α 联合成骨诱导因子可以诱导大鼠 ASCs 表达成牙本质细胞特异性基因 dspp 及标志蛋白 DSP,向着成牙本质样细胞方向分化。然后 dspp 基因的表达并不足以证明大鼠 ASCs 细胞已经分化为终末分化的成牙本质细胞,因为本实验中为观察到成牙本质细胞特征性高柱状、单极突起的形态学特征。后续工作应着眼于研究 MIP-3 α 作用于 dspp 基因的信号传导通路,以及将诱导分化后的 ASCs 复合生物活性材料移植入动物体内,观察其在体内的生物学反应与特征。

参考文献(References)

- [1] Peng L. Mesenchymal stem cells and tooth engineering [J]. Int J Oral Sci, 2009,1(1): 6-12
- [2] Yang, Z.H. Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues[J]. J Periodontal Res, 2009,44(2): 199-210
- [3] Gronthos, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97(25): 13625-13630
- [4] Yokoi, T. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327 (2): 301-311
- [5] Trubiani, O. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 87(4): 986-993
- [6] Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine[J]. J Dent Res, 2009, 88(9):792-806
- [7] Yu J. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells[J]. Biol Cell, 2007, 99(8): 465-474
- [8] Zuk PA. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies[J]. Tissue Eng, 2001,7(2): 211-228
- [9] Rossi DL. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3 α and MIP-3 β [J]. J Immunol, 1997,158:1033-1036
- [10] Ohazama A. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth [J]. J Dent Res, 2004,83(7): 518-522
- [11] Zuk PA. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(12): 4279-4295
- [12] Xu Y. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro [J]. BMC Neurosci, 2008, 9: 21
- [13] Nakanishi T. Expression of macrophage inflammatory protein 3 α in human inflamed dental pulp tissue[J]. J Endodont, 2005, 31:84-87
- [14] Shiba H. Macrophage inflammatory protein-3 α and β -defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,306:867-871
- [15] Iejima D. Odontoblast marker gene expression is enhanced by a CC-chemokine family protein MIP-3 α in human mesenchymal stem cells[J]. Arc Oral Bio, 2007,52: 924-931
- [16] Sumita Y. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering[J]. Biomaterials, 2006,27: 3238-3248
- [17] Fehrer, C. and G. Lepperding, Mesenchymal stem cell aging[J]. Exp Gerontol, 2005,40(12):926-930
- [18] Matsuyama T. Monolayer cultures of normal human bone cells contain multiple subpopulations of alkaline phosphatase positive cells [J]. Calcif Tissue Int,1990,47:276-283
- [19] Bleicher F. Sequential expression of matrix protein genes in developing rat teeth[J]. Matrix Biol,1999,8:133-143
- [20] Yamakoshi Y. Dentinogenesis and dentin sialophosphoprotein (DSPP)[J]. J Oral Biosci,2009,51(3):134
- [21] 陈小红,刘鲁川,金岩,邓蔓菁.脂肪来源干细胞诱导分化为成牙本质样细胞的体外培养研究[J].实用口腔医学杂志,2008,24(1):9-12
- Chen Xiao-hong, Liu Lu-chuan, Jin Yan. A study on differentiation of adipose-derived stem cells into odontoblasts-like cells in vitro[J]. J Pract Stomatol, 2008, 24(1): 9-12