

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.07.003

基于 PI3K/AKT 通路探究上调 miR-210 对牙髓干细胞增殖、凋亡能力的影响 *

于 璐 余少华[△] 熊 宇 税桦桦 王 迪 黄文静

(陆军军医大学第一附属医院口腔科 重庆 400038)

摘要 目的:研究基于磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路探究上调微小 RNA 210(miR-210)对大鼠牙髓干细胞增殖、凋亡能力的影响。**方法:**选取 10 只健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, 颈椎脱臼处死后提取大鼠下切牙牙髓, 进行牙髓干细胞培养和鉴定。分为正常组(未进行处理), miR-210 抑制组(给予 20 nmol/L 的 miR-210 抑制物), miR-210 对照组(给予 20 nmol/L 的 miR-210 模拟物)三组。采用 CCK-8 法检测牙髓干细胞增殖活性, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 ALP 活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 采用免疫印迹(Western blot)检测 PI3K、AKT 蛋白。**结果:**与正常组相比, miR-210 抑制组细胞增殖、ALP 活性降低, 细胞凋亡率升高; miR-210 对照组细胞增殖、ALP 活性升高, 细胞凋亡率降低($P<0.05$)。与 miR-210 抑制组相比, miR-210 对照组细胞增殖、ALP 活性升高, 细胞凋亡率降低($P<0.05$)。与正常组相比, miR-210 抑制组 PI3K、p-AKT 蛋白表达降低, miR-210 对照组 PI3K、p-AKT 蛋白表达升高($P<0.05$)。与 miR-210 抑制组相比, miR-210 对照组 PI3K、p-AKT 蛋白表达升高($P<0.05$)。**结论:** miR-210 通过调控 PI3K、p-AKT 蛋白激活 PI3K/AKT 通路, 促进大鼠牙髓干细胞增殖, 抑制牙髓干细胞凋亡。

关键词: 牙髓干细胞; 增殖; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 蛋白激酶 B

中图分类号: R-33; R329.2; R322.41; Q593.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)07-1212-05

Effects of miR-210 on Proliferation and Apoptosis of Dental Pulp Stem Cells Based on PI3K / AKT Pathway*

YU Lu, YU Shao-hua[△], XIONG Yu, SHUI Hua-hua, WANG Di, HUANG Wen-jing

(Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of microRNA 210 (mir-210) on the proliferation and apoptosis of rat dental pulp stem cells based on phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) pathway. **Methods:** Ten healthy Sprague Dawley (SD) male rats were selected. After cervical dislocation, the pulp of the lower incisors was extracted, and dental pulp stem cells were cultured and identified. They were divided into three groups: normal group (untreated), mir-210 inhibitory group (treated with 20 nmol / L mir-210 inhibitor), and mir-210 control group (treated with 20 nmol / L mir-210 mimic). CCK-8 method was used to detect the proliferation activity of dental pulp stem cells. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect ALP activity. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Western blot was used to detect PI3K and AKT proteins. **Results:** Compared with the normal group, the proliferation and ALP activity of mir-210 group were decreased, while the apoptosis rate was increased in mir-210 control group ($P<0.05$). Compared with mir-210 group, mir-210 control group increased cell proliferation, ALP activity and decreased apoptosis rate ($P<0.05$). Compared with the normal group, the expression of PI3K and p-AKT in mir-210 inhibition group was lower than that in mir-210 control group ($P<0.05$). Compared with mir-210 group, the expression of PI3K and p-AKT protein in mir-210 control group was increased ($P<0.05$). **Conclusion:** MiR-210 promotes the proliferation of rat dental pulp stem cells and inhibits the apoptosis of dental pulp stem cells by regulating PI3K and p-AKT proteins and activating PI3K / AKT pathway.

Key words: Dental pulp stem cells; Proliferation; Apoptosis; Phosphatidylinositol 3 kinase; Protein kinase B

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R329.2; R322.41; Q593.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)07-1212-05

前言

牙髓干细胞具有一定的自我更新—集多向分化作用, 主要是从牙髓组织中分离, 目前研究指出, 牙髓干细胞可以从健康成人牙髓组织中得到, 也可以从乳牙以及感染牙齿牙髓组织中

得到, 具有较高的增殖能力, 并且受牙齿损伤影响小^[1,2]。研究指出, 牙髓干细胞可塑性主要体现在, 通过诱导分化作用促进其向脂肪、内皮、成骨、软骨细胞分化^[3,4]。微小 RNA 主要存在于真核细胞中, 起到转录调节作用, 参与基因表达过程。研究显示, miRNA 通过调控干细胞自我更新、分化, 对干细胞未分化具有

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81671022)

作者简介: 于璐(1989-), 女, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 口腔颌面外科, 电话: 13209929727

[△] 通讯作者: 余少华(1987-), 男, 研究方向: 牙本质过敏研究, 电话: 18983286275, E-mail: 723324634@qq.com

(收稿日期: 2020-09-23 接受日期: 2020-10-19)

一定的维持作用^[5,6]。牙髓干细胞在成牙本质分化中发挥着重要作用,促进牙髓再生,在牙髓干细胞 miRNAs 表达谱筛查中,牙髓干细胞在成牙本质分化中,miR-210 表达水平降低^[7]。目前缺少 miR-210 对牙髓干细胞调节的实验研究。本文旨在研究基于 PI3K/AKT 通路探究上调 miR-210 对大鼠牙髓干细胞增殖、凋亡能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 20 只健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, SPF 级, 均由新疆医科大学动物实验动物中心提供, 动物伦理审查批号: IACUC20150709-05, 体重 85-120 g, 鼠龄为 25-30 d。所有大鼠均选择常规饲养, 自由饮水, 饲养环境黑光和白光各 12h, 温度为 22-25℃, 湿度为 50-70%。

1.2 方法

1.2.1 牙髓细胞分离及培养 将大鼠颈椎脱臼处死后, 对大鼠进行常规消毒, 将整个下颌骨游离后采用 PBS 冲洗, 将硬组织剔除后, 提取大鼠下切牙牙髓, 将根尖 1/3 剪除, 剪碎后置入玻璃培养皿中, 加 3 mg/mL 的 I 型胶原酶溶液, 在 37℃ 环境中水浴消化处理 1h, 每间隔 10 min 中进行一次吹打, 牙髓组织松软后, 离心处理 5 min (1000 r/min), 将上清液摒弃后, 加 10% 的 FBS 培养基配制悬浊液, 置入 6 孔板中孵育培养, 得到原代细胞。提取原代细胞培养的上清液, 离心处理 10 min (1000 r/min), 过滤 (直径为 0.22 μm), 滴加 10% 的 FBS DMEM 低糖培养基, 待细胞融合至 80-90%, 给予胰酶消化传代。

1.2.2 牙髓干细胞鉴定 选择生长良好的第 3 代牙髓干细胞, 胰酶消化后配制重悬液, 密度调整到 1×10^5 /mL, 在 6 孔板中接种, 连续培养 24 h, 发现细胞贴壁将上清液摒弃, 采用 PBS 冲洗 3 次, 干燥后在 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 再次采用 PBS 冲洗 3 次, 进行免疫组化染色, 严格按照免疫组化染色试剂盒操作步骤进行。

1.2.3 牙髓干细胞分组 将培养好的牙髓干细胞分为正常组 (未进行处理), miR-210 抑制组 (给予 20 nmol/L 的 miR-210 抑制物), miR-210 对照组 (给予 20 nmol/L 的 miR-210 模拟物) 三组, 均由上海吉玛制药技术公司提供。

1.2.4 牙髓干细胞增殖活性 选择生长良好的牙髓干细胞, 密度调整到 1×10^4 /mL, 在 96 孔板中接种, 滴加 200 μL 的细胞悬液进行培养 24h, 滴加 10 μL 的 CCK-8 工作液混合均匀后, 在 37℃ 环境中连续孵育 2h, 采用酶标仪观察在波长 450 nm 处的吸光值。

1.2.5 ALP 活性 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测: 将提前稀释好的牙髓干细胞标本 100 μL 加入相应的微孔板反应空中, 第 1 孔只加样品稀释液为零孔, 混合均匀, 在 37℃ 下处理 90 min, 甩去孔内液体, 吸干水分; 将准备好的抗体加入到每孔中 0.1 mL, 在 37℃ 下处理 60 min, 底物四甲基联苯胺 (TMS) 空白孔不加; 甩去孔内液体, 每孔中加满 0.01 M PBS, 浸泡 1-2 min, 甩去孔内液体, 吸干水分; 每孔中加入 90 μL TMS, 避光处理 15-20 min; 每孔中加入 90 μL TMS 终止液, 即蓝色变为黄色。在波长 450 nm 处分析 ALP 表达水平。

1.2.6 牙髓干细胞凋亡 提取 100 μL 的抗凝血钾荧光抗体加

入到牙髓干细胞中, 在 4℃ 环境下避光孵育 30 min; 加 1 mL 的红细胞裂解液, 在温室中继续孵育 15 min; 2000 r/min 离心处理 5 min, 吸取上清液; 加 2 mL 的 PBS 含 1% 的 BSA, 再次 2000 r/min 离心处理 5 min, 吸取上清液, 重悬于 0.5 mL 的 PBS 缓冲液中, 通过流式细胞仪检测牙髓干细胞凋亡。

1.2.7 PI3K/AKT 相关蛋白检测 采用免疫印迹 (Western blot) 将采集到的牙髓干细胞 10000×g 离心处理 10 min, 对上清液进行提取后, BCA 进行蛋白定量检测, 在 2×SDS 凝胶缓冲液中加入 50 μg 蛋白, 在 100℃ 环境中加热 5 min 有助于蛋白发生变性。凝胶电泳完、转膜, 取膜, 4℃ 环境下在 5% 脱脂牛奶中固定、封闭处理时间为 1 h, 将一抗使用 0.05%-0.1% TBST 给予稀释 (PI3K、AKT 一抗为 1:1000), 4℃ 孵育过夜保存, 之后使用 0.05%-0.1% TBST 洗膜, 3 次, 每次为 5 min, 二抗被 0.05%-0.1% TBST 稀释 (1:10000), 摇动孵育时间为 1h, 再次采用 TBST 连续洗膜 3 次, 处理时间为 5 min。DAB 显色, 定量分析蛋白表达情况。以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学分析

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析处理。计量资料采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 多组间比较采用方差齐性检验, 两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 牙髓干细胞鉴定

培养 72h 后发现, 细胞表现为伸展生长, 大部分为纤维细胞, 少部分细胞增殖慢, 有少量的细胞克隆, 见图 1A; 细胞数量明显增加, 大部分细胞排列紧密, 表现为集落样克隆增长, 细胞形态为长梭形, 见图 1B; 细胞伴有突起, 细胞状态表现良好, 见图 1C。

2.2 牙髓干细胞表型鉴定

免疫组化染色结果显示, 牙髓干细胞 CD44、CD29 表现为阳性, 见图 2A、图 2B; CD34 表现为阴性, 见图 2C。

2.3 各组牙髓干细胞增殖活性比较

与正常组相比, miR-210 抑制组细胞增殖活性降低, miR-210 对照组细胞增殖活性升高, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。与 miR-210 抑制组相比, miR-210 对照组细胞增殖活性升高, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 各组牙髓干细胞 ALP 活性比较

与正常组相比, miR-210 抑制组 ALP 活性降低, miR-210 对照组 ALP 活性升高, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。与 miR-210 抑制组相比, miR-210 对照组 ALP 活性升高, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 各组牙髓干细胞凋亡率比较

与正常组相比, miR-210 抑制组细胞凋亡率升高, miR-210 对照组细胞凋亡率降低, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。与 miR-210 抑制组相比, miR-210 对照组细胞凋亡率降低, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 各组牙髓干细胞 PI3K/AKT 相关蛋白表达比较

与正常组相比, miR-210 抑制组 PI3K、p-AKT 蛋白表达降低, miR-210 对照组 PI3K、p-AKT 蛋白表达升高, 有统计学差异 ($P < 0.05$)。三组 AKT 蛋白表达比较, 无统计学差异 ($P >$

0.05)。与 miR-210 抑制组相比,miR-210 对照组 PI3K、p-AKT 蛋白表达升高,有统计学差异($P<0.05$)。见图 6、图 7。

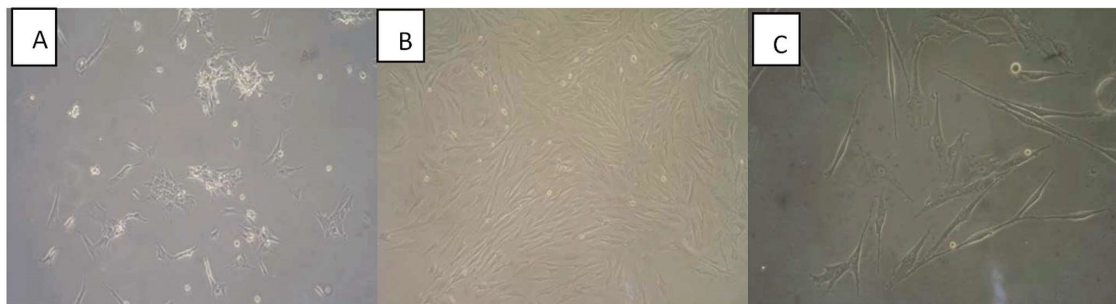


图 1 牙髓干细胞形态学观察

Fig. 1 Morphological Observation of dental pulp stem cells

注:A 为培养 72h($\times 40$);B 为培养 11-15d($\times 100$);C 为细胞突起($\times 200$)。

Note: A is culture for 72h ($\times 40$); B is culture for 11-15d ($\times 100$); C is cell process ($\times 200$).

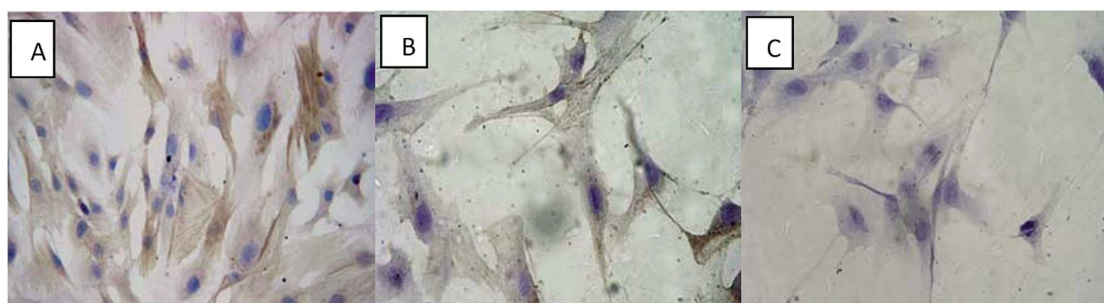


图 2 牙髓干细胞表型鉴定

Fig. 2 Phenotype identification of dental pulp stem cells

注:A 为 CD44($\times 200$);B 为 CD29($\times 200$);C 为 CD34($\times 200$)。

Note: A is CD44 ($\times 200$); B is CD29 ($\times 200$); C is CD34 ($\times 200$).

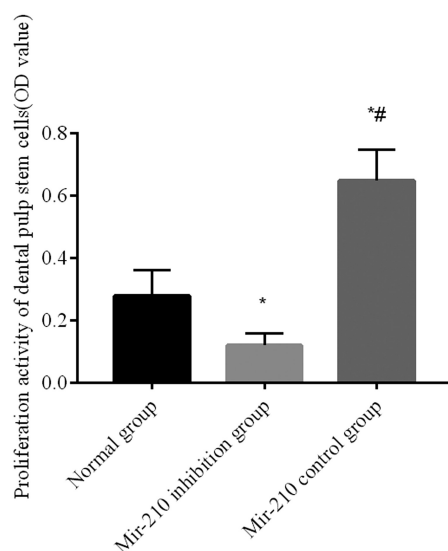


图 3 各组牙髓干细胞增殖活性比较

Fig. 3 Comparison of proliferation activity of dental pulp stem cells in each group

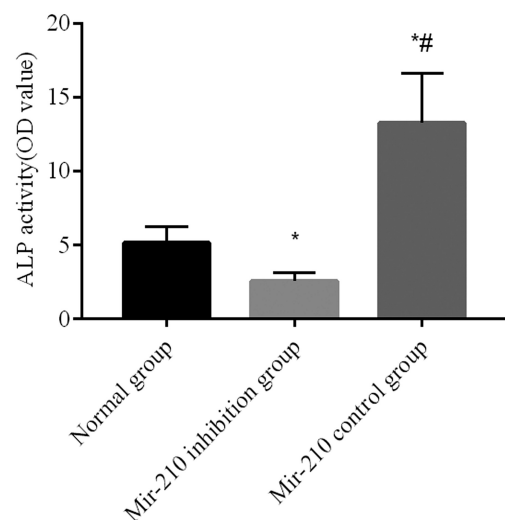


图 4 各组牙髓干细胞 ALP 活性比较

Fig. 4 Comparison of ALP activity of dental pulp stem cells in each group

3 讨论

牙髓干细胞会分化成内皮细胞、神经细胞以及成牙本质样结构,参与牙齿再生过程,并且提取自牙髓组织,对患者产生的伤害较小^[8]。得到原代牙髓细胞主要通过酶消化、组织块、组织

块消化三种方式,采用组织块消化法对人原代牙髓细胞进行培养发现,虽然其操作简单,但是消耗的时间相对较长;采用酶消化法得到的细胞贴壁数量较少,成活率也随之降低;组织块消化能在最短的时间内,得到足量的牙髓细胞,更加科学有效^[9,10]。研究认为,大鼠牙髓组织细胞量少,通过组织块消化法

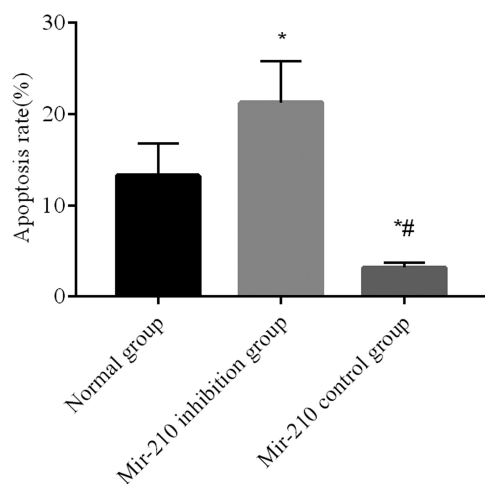


图5 各组牙髓干细胞凋亡率比较

Fig. 5 Comparison of apoptosis rate of dental pulp stem cells in each group

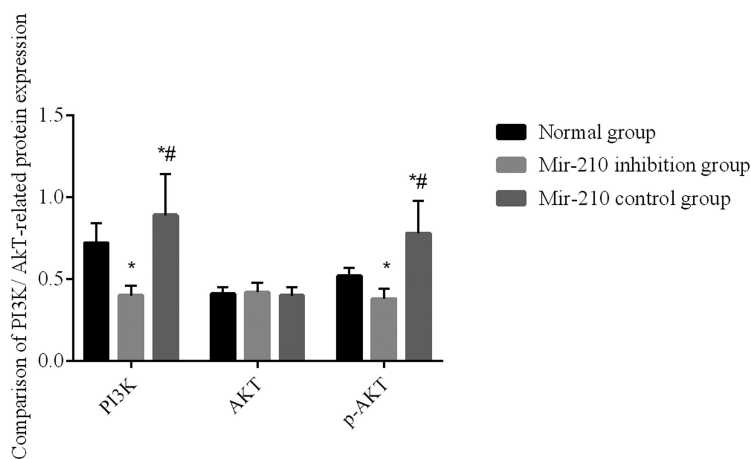


图6 各组牙髓干细胞 PI3K/AKT 相关蛋白表达比较

Fig. 6 Comparison of PI3K / Akt related protein expression in dental pulp stem cells of each group

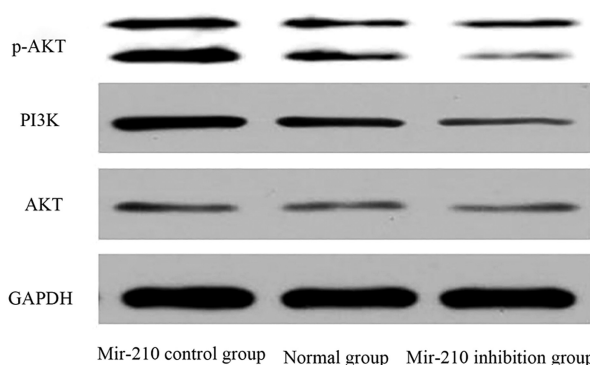


图7 各组牙髓干细胞 PI3K/AKT 相关蛋白表达(WB图)

Fig. 7 Expression of PI3K / Akt related protein in dental pulp stem cells of each group(WB diagram)

对牙髓细胞进行培养发现,牙髓组织块结构疏松,有助于细胞游出,培养时间大大缩短,避免对细胞活性产生影响,促进细胞存活率的提升^[11,12]。

miRNA 不仅参与细胞增殖、分化等多种生理过程,在 3T3-L1 前脂肪细胞研究中,细胞分化伴随 miRNAs 表达谱改变,与多种疾病尤其是肿瘤的发生有紧密的联系^[13]。miRNA 参与恶性肿瘤的侵袭、迁移过程,并且能调节血管生成^[14]。miRNA 属于一种内源性 RNA,对牙髓干细胞生长、分化具有一定的调控能力^[15]。目前临床中关于 miRNA 功能主要以正向和反向遗传学方法来完成,反向遗传学方法建立 miRNA 表达载体,通过转染进入到细胞中,发挥过表达或者是表达抑制作用,反应细胞的生化能力,进一步对 miRNA 生物学功能给予确定^[16,17]。Yang Z^[18]研究指出,miR-210 对间充质干细胞向成骨细胞转化中发挥促进作用。

牙髓干细胞与骨髓间充质干细胞在表面标志物方面具有一定的相似性,CD44、CD105、CD29 等属于充质干细胞表面标志物,表现为阳性,CD34 属于造血干细胞表面标志物,表现为阴性^[19,20]。在本文研究中,对牙髓干细胞进行鉴定发现,CD44、CD29 表现为阳性,CD34 表现为阴性,与 Nakashima M^[21]研究结果保持一致,用于下文研究。采用 CCK-8 法检测牙髓干细胞

增殖,其吸光度与存活细胞的数量表现为正相关,因此 OD 值能间接反应牙髓干细胞的存活数量。本文研究中,miR-210 能促进细胞增殖活性升高,从而促进牙髓干细胞增殖。王艳玲^[22]研究也指出,miR-210 转染牙髓干细胞会促进 miR-210 表达上调,提高牙髓干细胞增殖率,促进其牙源性分化。本文研究结果也体现这一观点。ALP 属于一种功能性标志酶,参与骨代谢、牙齿代谢过程,在矿化组织形成中具有重要意义,其活性的高低决定着细胞矿化能力的强弱,ALP 随细胞分化其活性也在发生着改变^[23,24]。牙髓干细胞定向分化中,ALP 活性已经成为牙髓干细胞终末细胞分化的标志物^[25]。本文研究结果显示,miR-210 能促进 ALP 活性提高,提示 miR-210 能促进牙髓干细胞成骨分化。

PI3K 作为一种激酶与多种生长因子以及受体有关,当受体被活化之后,会对亚基具有催化作用,向细胞膜附近募集,对细胞膜表面的二磷酸肌醇具有一定的催化作用,向三磷酸肌醇转化^[26,27]。AKT 是一种常见的丝/苏氨酸蛋白激酶,大部分的细胞因子、激素、基因失活与 AKT 磷酸化有关^[28]。PI3K/AKT 信号通路主要通过酪氨酸激酶受体介导,在多种细胞中广泛存在,在细胞增殖、凋亡、分化中发挥着重要的功能^[29]。p-AKT 是活化的 AKT,从而引发下游一系列的因子发生活化,从而发挥生物学效应,AKT 在 PI3K/AKT 信号通路的中心位置,p-AKT 水平决定着 PI3K/AKT 信号通路活性^[30]。目前已经有研究证实,PI3K/AKT 参与骨髓间充质干细胞、成骨细胞存活、增殖、分化过程^[31,32]。本文研究中,miR-210 通过提高 PI3K、p-AKT 蛋白表达,将 PI3K/AKT 通路激活,参与牙髓干细胞增殖、凋亡过程。

综上所述,miR-210 通过调控 PI3K、p-AKT 蛋白激活 PI3K/AKT 通路,促进大鼠牙髓干细胞增殖,抑制牙髓干细胞凋亡,为牙髓再生靶向治疗提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] Nuti N, Corallo C, Chan BM, et al. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review [J]. Stem Cell Rev Rep, 2016, 12(5): 511-523
- [2] Victor AK, Reiter LT. Dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders[J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(R2): R166-R171

- [3] Lambrechts I, Driesen RB, Dillen Y, et al. Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds [J]. *J Endod*, 2017, 43(9S): S12-S16
- [4] Kaneko T, Gu B, Sone PP, et al. Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2018, 14(5): 668-676
- [5] Mens MMJ, Ghanbari M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2018, 14(3): 309-322
- [6] Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, et al. Role of miRNA- Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 840
- [7] 张萍,朱聪惠,张纲,等.人牙髓干细胞向成牙本质细胞定向分化过程中 miRNAs 表达谱筛选及鉴定[J].*实用口腔医学杂志*, 2011, 27(2): 212-216
- [8] Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine [J]. *Cytherapy*, 2018, 20(4): 479-498
- [9] Fawzy El-Sayed KM, Elsalawy R, Ibrahim N, et al. The Dental Pulp Stem/Progenitor Cells-Mediated Inflammatory-Regenerative Axis[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2019, 25(5): 445-460
- [10] Eramo S, Natali A, Pinna R, et al. Dental pulp regeneration via cell homing[J]. *Int Endod J*, 2018, 51(4): 405-419
- [11] Xuan K, Li B, Guo H, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth [J].*Sci Transl Med*, 2018, 10(455): eaaf3227
- [12] Kaneko T, Gu B, Sone PP, et al. Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2018, 14(5): 668-676
- [13] Liu Z, Xu S, Dao J, et al. Differential expression of lncRNA/miRNA/ mRNA and their related functional networks during the osteogenic/ odontogenic differentiation of dental pulp stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3350-3361
- [14] Qiao W, Li D, Shi Q, et al. miR-224-5p protects dental pulp stem cells from apoptosis by targeting Rac1 [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1): 9-18
- [15] Iaculli F, Di Filippo ES, Piattelli A, et al. Dental pulp stem cells grown on dental implant titanium surfaces: An in vitro evaluation of differentiation and microRNAs expression[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2017, 105(5): 953-965
- [16] 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
- [17] Fang F, Zhang K, Chen Z, et al. Noncoding RNAs: new insights into the odontogenic differentiation of dental tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 297
- [18] Yang Z, Zhao N, Cui J, et al. Exosomes derived from cancer stem cells of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells enhance drug resistance by delivering miR-210[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2020, 43(1): 123-136
- [19] Carnevale G, Pisciotta A, Riccio M, et al. Human dental pulp stem cells expressing STRO-1, c-kit and CD34 markers in peripheral nerve regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(2): e774-e785
- [20] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(25): 13625-30
- [21] 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
- [22] 王艳玲,左春然,王静,等.miR-210 促进大鼠牙髓干细胞的增殖和牙源性分化[J].*中国组织工程研究*, 2019, 23(25): 4004-4010
- [23] Kunimatsu R, Nakajima K, Awada T, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(1): 193-198
- [24] Winning L, El Karim IA, Lundy FT. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15): 1050-1058
- [25] Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, et al. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5015
- [26] Li JY, Ren KK, Zhang WJ, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 247
- [27] Lanza Caricchio V, Scionti D, Raffa A, et al. Treatment of Periodontal Ligament Stem Cells with MOR and CBD Promotes Cell Survival and Neuronal Differentiation via the PI3K/Akt/mTOR Pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2341
- [28] Tan FZ, Dai HL. TAZ accelerates osteogenesis differentiation of mesenchymal stem cells via targeting PI3K/Akt [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3 Suppl): 81-88
- [29] Zhang F, Ye J, Meng Y, et al. Calcium Supplementation Enhanced Adipogenesis and Improved Glucose Homeostasis Through Activation of Camkii and PI3K/Akt Signaling Pathway in Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (pBMSCs) and Mice Fed High Fat Diet (HFD)[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(1): 154-172
- [30] Liu H, Sun X, Gong X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes exert antiapoptosis effect via activating PI3K/Akt/mTOR pathway on H9C2 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14455-14464
- [31] Sun X, Meng L, Qiao W, et al. Vascular endothelial growth factor A/Vascular endothelial growth factor receptor 2 axis promotes human dental pulp stem cell migration via the FAK/PI3K/Akt and p38 MAPK signalling pathways[J]. *Int Endod J*, 2019, 52(12): 1691-1703
- [32] Yagi Mendoza H, Yokoyama T, Tanaka T, et al. Regeneration of insulin-producing islets from dental pulp stem cells using a 3D culture system[J]. *Regen Med*, 2018, 13(6): 673-687