

# 乳牙牙髓干细胞分化前后的外泌体 miRNA 筛选研究

黄燕华 刘 澍 李言凤

**摘要** **目的** 分析乳牙牙髓干细胞分化前后的外泌体中 miRNA 差异表达谱。**方法** 原代提取乳牙牙髓干细胞,在矿化诱导培养基中进行分化。超速离心法提纯外泌体并进行鉴定;利用 miRNA 基因芯片检测分化前后的外泌体中 miRNA 的表达谱,验证差异表达的 miRNA,预测其靶基因,进行 GO 分析和 KEGG 通路的功能分析。**结果** 在未分化和分化的乳牙牙髓干细胞的外泌体中共发现 215 个差异表达的 miRNA,最相关的 KEGG 通路为 FoxO、Ras 和 MAPK 等信号通路。GO 分析包括多细胞生物的发育和结构形态发生的调控。**结论** 乳牙牙髓干细胞分化前后的外泌体 miRNA 可能会参加调控成牙本质向分化过程,为牙髓修复提供了理论依据。

**关键词** 乳牙牙髓干细胞 成牙本质向分化 外泌体 微 RNA

**中图分类号** R78 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.04.020

**Screening of Exosome MiRNA Before and After Differentiation of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth.** HUANG Yanhua, LIU Shu, LI Yanfeng. Department of Stomatology, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Jiangsu 210004, China

**Abstract Objective** To analyze the miRNA differential expression profiles in exosomes before and after differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Methods** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth were primary extracted and differentiated in mineralization induction medium. The exosome was purified and identified by ultrafast centrifugal method. MiRNA expression profiles in exosome before and after differentiation were detected by miRNA gene chip, the differentially expressed miRNA were verified, their target genes were further predicted by databases. Then, the overlapping targets were subjected to functional analyses of Gene Ontology (GO) terms and Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. **Results** A total of 215 differentially expressed miRNA were found between undifferentiated and differentiated stem cells from human exfoliated deciduous teeth, the most relevant KEGG pathways were FoxO, Ras, MAPK signaling pathway and so on. GO analysis includes the multicellular organism development and regulation of anatomical structure morphogenesis and so on. **Conclusion** The exosome miRNA may participate in the regulation of odontogenic differentiation before and after the differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, which provides a theoretical basis for dental pulp repair.

**Key words** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth; Odontoblastic differentiation; Exosome; MicroRNA

龋病因其具有发生率高、分布广等特点,已成为人类常见慢性病之一<sup>[1]</sup>。目前,龋齿的治疗方法主要是以人工合成材料来替代缺损的牙体组织,但是这并不能完全恢复牙齿的生物学性能,导致牙体抵抗力降低,进而对牙髓组织造成不同程度的损伤,最终导致治疗的失败<sup>[2]</sup>。

乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED)作为一种成体干细胞,具有较强的增殖和自我更新能力,在矿化诱导液的作用下可

成牙本质向分化并形成类牙本质样结构,故被认为是修复性牙本质形成中理想的种子细胞<sup>[3]</sup>。因此,以 SHED 为研究对象,深入阐明成牙本质向分化的机制,将有助于修复性牙本质的形成。

外泌体(exosome, Exo)是间充质干细胞主动分泌的大小均一、直径在 200nm 以内的一种细胞外囊泡<sup>[4]</sup>。近年来关于牙源性间充质干细胞的外泌体相关研究越来越多<sup>[5]</sup>,研究证明 Exo 可通过其携带的 microRNA(miRNA)发挥促进细胞增殖分化、抑制细胞凋亡、促进血管生成等作用。miRNA 长度仅为 20~25nt,具有高度保守性、表达时序性和组织特异性等特点,保守估计,人类约有 2/3 的蛋白编码基因受 miRNA 调控,miRNA 几乎参与所有生命活动的调节<sup>[6]</sup>。然而 miRNA 数量众多,仍有诸多未知 miR-

基金项目:江苏省南京市卫生科技发展计划项目(YKK20138)

作者单位:210004 南京医科大学附属妇产医院、南京市妇幼保健院口腔科(黄燕华、李言凤);210000 南京大学医学院附属口腔医院、南京市口腔医院放射科(刘澍)

通信作者:李言凤,电子邮箱:379224791@qq.com

NAs 可能与成牙本质向分化有关。

SHED 外泌体 (SHED - exosome, SHED - Exo) 的特性及它所能发挥的作用研究尚少,它如何调控分化功能的机制也还没有明确报道<sup>[7]</sup>。本研究利用基因芯片技术,筛选分析在 SHED 分化过程中的外泌体的差异表达的 miRNAs,初步探讨其在 SHED 分化过程中可能发挥的作用,进而为修复性牙本质形成工程提供新的方向和理论依据。

### 材料与方 法

1. 材料:DMEM 培养基、胎牛血清 FBS、双抗(美国 Gibco 公司);无外泌体的血清(美国 System Biosciences 公司);成骨培养基、成脂培养基(美国 Sciencell 公司);茜素红染色试剂盒、油红 O 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ALP 活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);反转录试剂盒和 SYBR 荧光定量试剂(德国 QIAGEN 公司);蛋白定量试剂盒、蛋白质印迹发光液(美国 Thermo Scientific 公司);流式抗体 CD146 - PE、CD29 - PE、CD90 - PE、CD105 - PE、CD34 - PE、CD45(美国 Biolegend ebioscience 公司);CD63、CD9 单克隆抗体(美国 Santa-cruz 公司)等。

2. 标本收集:来源于 2020 年 4 ~ 7 月就诊于南京医科大学附属妇产医院儿童口腔科,因替牙期乳牙滞留或者二度松动需要拔除的乳牙。所有志愿者无关节炎病史及全身系统性疾病史,并且 2 个月内未服用免疫抑制剂及抗菌药物。所有标本获取均取得患者知情同意并经笔者医院医学伦理学委员会批准(伦理学审批号:宁妇伦字[2020]KY - 028 号)。将新鲜拔除的乳牙在颈部使用涡轮机磨一引导沟,置入盛有 DMEM 培养基的无菌离心管中,用装有冰块的保温桶迅即运输至实验室。

3. SHED 的分离培养及鉴定:在超净台内,使用切断钳在引导沟处夹断牙齿,用镊子将牙髓取出,PBS 多次冲洗,在 DMEM 培养基中剪成约 0.5 ~ 1.0mm<sup>3</sup>大小,并加入 1ml I 型胶原酶(3mg/ml)和中性蛋白酶(4mg/ml),37℃ 消化 45min,收集细胞与组织碎块移入培养瓶中,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基。SHED 表面标志物的流式鉴定:PBS 洗细胞 3 次,重悬,计数,以 1 × 10<sup>5</sup>/100μl 分装至离心管内,分别加入 2μl CD146 - PE、CD29 - PE、CD90 - PE、CD105 - PE、CD34 - PE、CD45 - PE,室温避光孵育 1h,离心,过滤,重悬,移至流式细胞管内,上机检测。SHED 多向分化能力的鉴定:当细胞生长至 80% 时,

分别更换为矿化诱导培养基和成脂诱导培养基,培养 21 天,每 3 天换液 1 次,分别进行茜素红和油红 O 染色,用倒置显微镜观察并拍照。

4. SHED 的碱性磷酸酶(ALP)活性检测:矿化诱导 7、14 和 21 天后,分别用 ALP 试剂盒检测。PBS 洗两次,在 4℃ 条件下 0.2% Triton X - 100 过夜裂解。然后,根据说明书将工作液添加到细胞裂解液中,孵育后,用自动酶标仪在 520nm 处测量每个样品的吸光度值。

5. 超速离心法收集 SHED - Exo 及鉴定:待细胞生长至 80% 时,PBS 洗两次,更换为含 10% 无外泌体的 FBS 培养基,培养 48h,收集培养液,进行如下离心步骤(300 × g 4℃ 离心 10min,2000 × g 4℃ 离心 10min,10000 × g 4℃ 离心 30min)。透射电镜(transmission electron microscope,TEM)形态学检测:PBS 稀释后,滴在可辉光放电的 150 目 formvar 铜网上,4℃ 孵育 2min,洗涤铜网,用 2% 乙酸双氧铀溶液负染,并干燥,在 80kV 电压下观察。纳米颗粒跟踪分析(nanoparticle tracking analysis,NTA)粒径:PBS 稀释后,将样本注入样品池,用盖子封住样品池;按照标准操作流程操作仪器检测。Western blot 法鉴定表面标志物:设置 SHED 蛋白作为对照,分别提取 SHED 以及 SHED - Exo 的蛋白,测定蛋白浓度,垂直电泳,转膜,封闭;孵育一抗 CD9(23 ~ 27kDa)和 CD63(26kDa),4℃ 过夜,加入相应的二抗,常温孵育 1h,ECL 法检测暗室曝光。

6. 分化前后的 SHED - Exo 的 miRNAs 表达谱检测:按照生物公司的送样要求,将处理过的分化前后的细胞上清液保存在干冰中,送至上海康成生物技术有限公司,由该公司完成外泌体的 miRNAs 基因芯片检测。

7. 实时荧光定量 PCR (quantitative real - time PCR, qRT - PCR):用 Trizol 试剂提取细胞样本总 RNA,反转录为 cDNA 后使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行 qPCR 扩增。GAPDH 作为内参检测选定成牙分化相关的基因,U6 作为内参检测选定的 miRNAs 的表达,用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法测定相对表达量。成牙分化相关基因的引物序列为:OPN 上游引物:5' - AGCCAG - GACTCCATTGACTCGAAC - 3' 和下游引物:5' - GTTTCAGCACTCTGGTCATCCAGC - 3';DSPP 上游引物:5' - CAACCATAGAGAAAGCAAACGCG - 3' 和下游引物:5' - TTTCTGTTGCCACTGCTGGGAC - 3';DMP1 上游引物:5' - CAGGAGCACAGGAAAAGGAG - 3' 和下游引物:5' - CTGGTGTATCTTGGGCACT - 3';

OSX 上游引物:5' - GCCAGAAGCTGTGAAACCTC - 3'和下游引物:5' - GCTGCAAGCTCTCCATAACC - 3';GAPDH 上游引物:5' - CGACCACTTTGTCAAGCTCA - 3'和下游引物:5' - AGGGGAGATTCACTGTG - GTG - 3'。miRNA 的引物由锐博生物公司设计,通过 Bulge - loop<sup>TM</sup> miRNA qRT - PCR 引物组(每组 1 个 RT 引物和 1 对 qPCR 引物)对 miRNAs 进行定量,对每个 miRNA 进行特异性检测。

8. 生物信息学分析:通过 miRDBV5 和 TargetScan7.1 进一步预测验证的差异表达 miRNAs 的靶基因,然后对重叠靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路的功能分析。

9. 统计学方法:应用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,所有计量数据以均数 ± 标准差

( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. SHED 的培养鉴定:SHED 细胞大多数为梭形或多角形,矿化诱导培养 7、14 和 21 天后,ALP 活性和成牙分化相关基因(OPN、DSPP、DMP1、OSX)明显增强;显微镜下观察,在矿化诱导培养基中培养 21 天的 SHED 可见明显的红色矿物结节,在成脂诱导液培养 21 天的 SHED 可见细胞间形成红色发亮小脂滴。(图 1 中 A ~ D)流式细胞仪检测分析,分离培养的 SHED 表达 CD146、CD29、CD90、CD105,阳性率分别为 25.55%、99.11%、99.24% 和 0.71%,该结果与文献报道的间充质干细胞特征相一致(图 1E)。

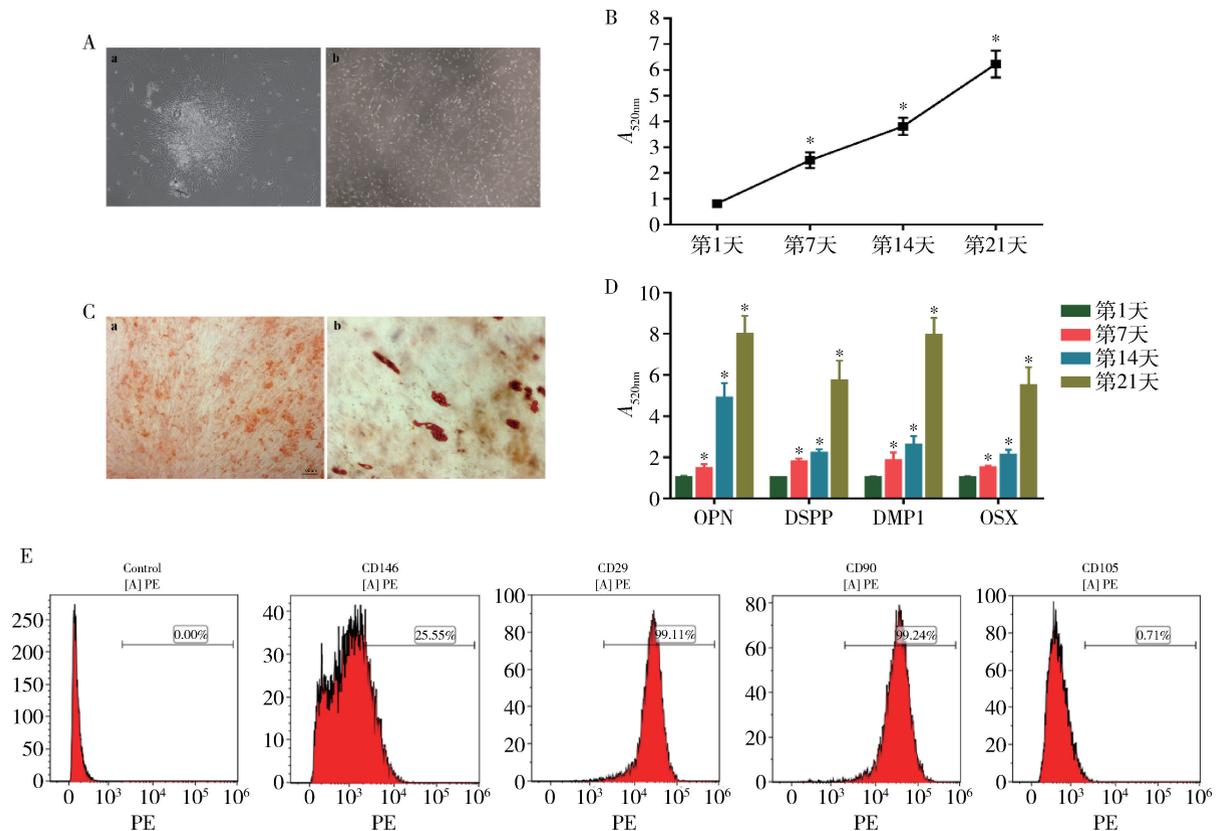


图 1 原代分离的 SHED 的形态学和鉴定

A. 原代提取的 SHED 形态特征 (a. ×40 和 b. ×100); B. ALP 活性的检测; C. 矿物质结节和脂滴形成(茜素红染色和油红 O 染色, ×100); D. OPN、DSPP、DMP1 和 OSX 的表达检测; E. 流式细胞仪检测 SHED 表面分子。与第 1 天比较, \*  $P < 0.05$

2. SHED - Exo 的鉴定:TEM 结果显示,分化前后的 SHED - Exo 直径为 100 ~ 150nm,呈现典型的茶托形双层膜结构;NTA 结果显示分化前后的外泌体粒径均一,且峰值分别为 134.3nm 和 136.7nm;SHED - Exo 的 CD63、CD9 表面蛋白表达量,与对照组 SHED

细胞蛋白比较,表现为明显的上调;以上特征均符合外泌体特征(图 2)。

3. 分化前后的 SHED - Exo 的 miRNAs 表达谱鉴定:在分化前后的 SHED - Exo 中共鉴定出 215 个 miRNAs,其中有 37 个 miRNAs 表达显著差异(13 个

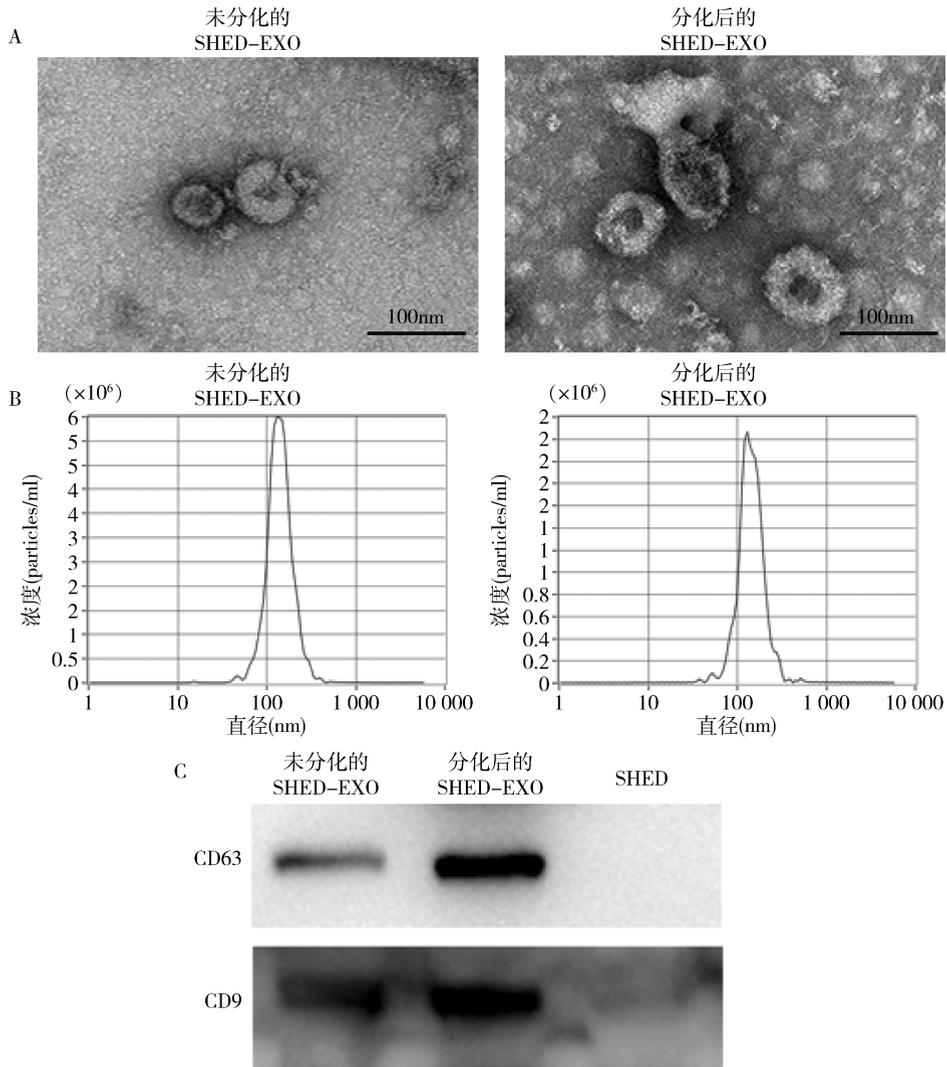


图 2 SHED - Exo 的形态学和表型的鉴定

A. 透射电镜分析 SHED - Exo; B. 粒径检测; C. Western blot 法检测 SHED - Exo 标志物 CD63、CD9

下调  $< 0.2$  倍和 24 个上调  $> 5$  倍, 表 1、表 2)。采用芯片的 miRNAs 的标准值进行聚类分析, 关系近的 miRNAs 会聚到一起 (图 3A)。为了进一步确定芯片结果的准确性, 随机选择了 13 个有显著差异表达的 miRNAs, 通过 qRT - PCR 进行验证。结果显示, miR - 4449、miR - 199b - 5p、miR - 30c - 1 - 3p、miR - 4497、miR - 31 - 5p、miR - 1973 和 miR - 3178 均显著上调 ( $P < 0.05$ ), miR - 4482 - 3p、miR - 3121 - 5p、miR - 335 - 5p 和 miR - 370 - 3p 显著下调 ( $P < 0.05$ ); miR - 3195 和 miR - 711 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 3B)。这些结果表明, 上述 13 个验证的 miRNAs 在芯片和 qRT - PCR 的结果基本一致。由于差异表达的 miRNAs 数量较多, 选择上述 13 个经验证的显著表达的 miRNAs 进行靶基因预测, 共得

到 438 个重叠靶基因 (图 3C)。

表 1 分化前后的 SHED - Exo 的下调 miRNAs (下调  $< 0.2$  倍)

编号	名称	差异倍数
11065	hsa - miR - 335 - 5p	0.092408321
169094	hsa - miR - 4482 - 3p	0.094081712
169329	hsa - miR - 370 - 3p	0.098699513
17349	hsa - miR - 595	0.101649154
145677	hsa - miR - 139 - 5p	0.106253471
168650	hsa - miR - 3121 - 5p	0.108454118
148172	hsa - miR - 216a - 3p	0.123731852
169406	hsa - miR - 376b - 3p	0.130691769
168606	hsa - miR - 4633 - 5p	0.143223856
168627	hsa - miR - 4678	0.165957802
168611	hsa - miR - 4753 - 3p	0.179380859
145836	hsa - miR - 218 - 2 - 3p	0.185872738
169244	hsa - miR - 5572	0.198457871

表 2 分化前后的 SHED-Exo 的上调 miRNAs(上调 >5 倍)

编号	名称	差异倍数
169260	hsa-miR-4436b-3p	5.072776805
148000	hsa-miR-3195	5.135584412
169240	hsa-miR-3944-5p	5.157968476
147595	hsa-miR-3178	5.253503807
148228	hsa-miR-3656	5.300277291
168653	hsa-miR-3158-5p	5.621151347
27536	hsa-miR-190a-5p	6.015970311
169012	hsa-miR-4711-3p	6.059345646
168708	hsa-miR-296-5p	6.17155575
146165	hsa-miR-1973	6.442874919
19591	hsa-miR-199b-5p	7.625188719
168893	hsa-miR-4505	7.84150613
148420	hsa-miR-3607-3p	8.810315759
146196	hsa-miR-711	11.76225919
168959	hsa-miR-4778-5p	11.76225919
169110	hsa-miR-4497	12.25917515
168999	hsa-miR-4749-3p	12.63353765
17427	hsa-miR-200c-3p	12.94470853
168971	hsa-miR-4449	15.68301226
169047	hsa-miR-4665-3p	19.51663748
11052	hsa-miR-31-5p	26.05537486
42702	hsa-miR-30c-1-3p	28.94580658
168736	hsa-miR-4796-3p	29.18782837
14300	hsa-miR-29c-5p	32.23730298

4. 生物信息学分析:为了进一步获得与上述 miRNA 相关的靶基因的生物学信息,笔者进行 GO 和 KEGG 分析。通过 KEGG 通路分析上述 miRNAs 最可能调控的前 10 条信号通路为 FoxO 信号通路、Ras 信号通路、Hippo 信号通路、基底细胞癌和 MAPK 信号通路等。GO 分析后得到的靶基因主要富集在多细胞生物发育、单细胞生物等生物学过程中;细胞成分主要受细胞部分、面上泡和囊泡等影响;主要分子功能指标包括钙离子结合、淀粉样蛋白结合、蛋白转运体活性以及 MAP 激酶酪氨酸/丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性等(图 4)。

讨 论

随着细胞生物学和口腔医学的发展,牙源性干细胞越来越受到人们的关注,主要是由于从新鲜拔牙中分离的细胞具有低免疫原性,可以在临床上高度利用<sup>[8]</sup>。近年来,大多数研究主要集中在恒牙牙髓干细胞体外培养后一些生物学行为的变化,而对更容易获得的 SHED 在矿化后生物学特性的研究报道较少<sup>[9]</sup>。由于外泌体具有作为递质将信号分子传递给受体细胞,能改变其生物学功能的作用,从而引起国内外研究者的重视。外泌体具有精准且高效的作用机

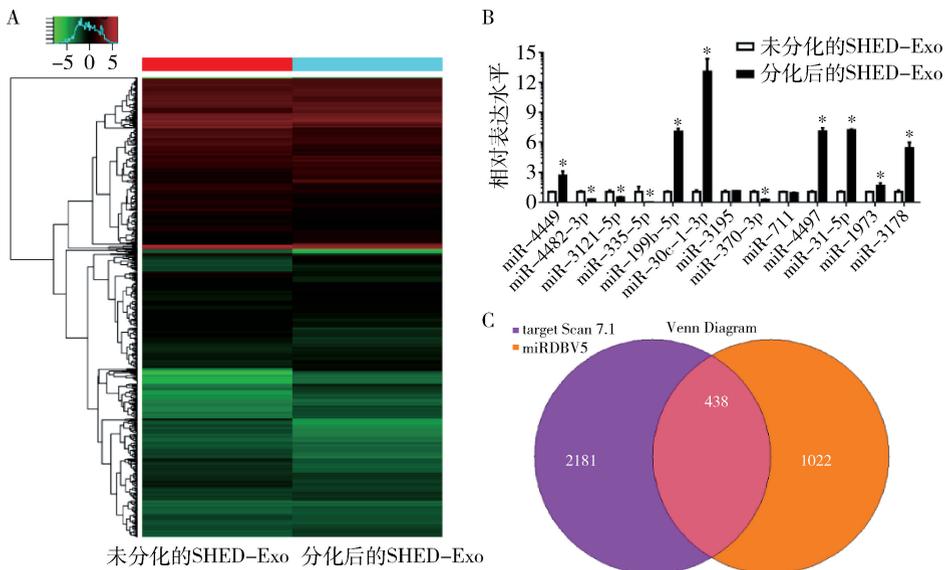


图 3 miRNA 芯片的检测结果及验证

A. 层次聚类图(颜色标度表示 miRNA 的相对表达水平;红色表示相对表达水平较高,绿色表示相对表达水平低);

B. 差异表达 miRNA 的验证,与未分化的 SHED-Exo 比较,\* P < 0.05; C. 两个数据库(TargetScan7.1 和 miRDBV5)的重叠结果

制,并且其易于保存,在外泌体携带的众多生物分子中,miRNAs 可以调控基因表达<sup>[10]</sup>。因而 exosome-miRNA 的靶向治疗技术具有极高的转化应用前景。

尽管已有研究揭示了牙源性干细胞分化过程中存在一些具有调控功能的 miRNAs,但仍有许多 miRNAs 及其调控的靶基因未被发现<sup>[11,12]</sup>。本研究中,

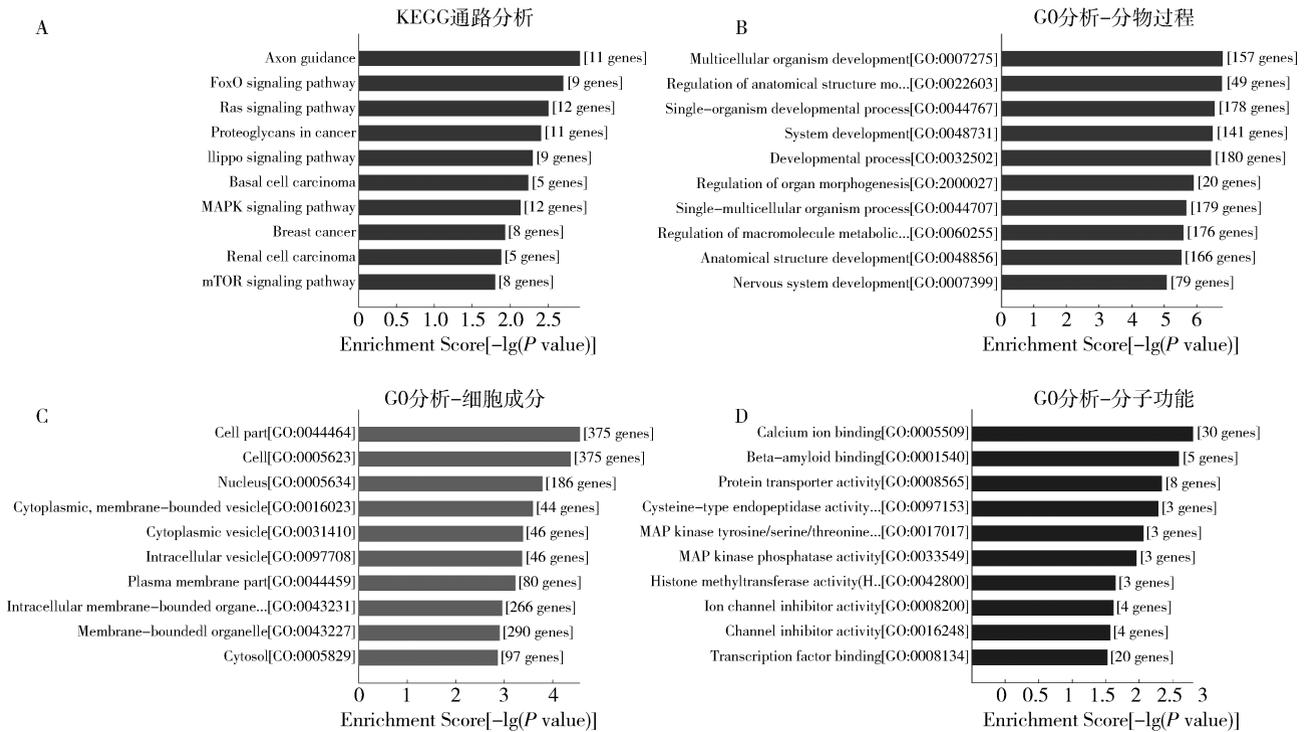


图 4 差异表达 miRNA 的靶基因的功能分析

A. 前 10 条 KEGG 通路; B. 前 10 条生物过程的 GO 分析; C. 前 10 条细胞组成的 GO 分析; D. 前 10 条分子功能的 GO 分析

通过 miRNA 芯片检测,在未分化和分化的 SHED - Exo 中共鉴定了 215 个差异表达的 miRNAs。在这些 miRNA 中,有 13 个被 qPCR 验证并进行生物信息学分析。分化前后的 SHED - Exo 下调最显著的 miRNA 是 miR - 335 - 5p,目前对 miR - 335 - 5p 的研究显示出它和成骨分化具有相关性。例如,Zhao 等<sup>[13]</sup>在体外证实,miR - 335 - 5p 的过表达可能是骨髓干细胞(BMSCs)生物学中的一个关键调控因素,主要是通过下调 WNT 信号通路抑制剂 Dickkopf 相关蛋白 1 (DKK1)来促进成骨分化。

有研究表明,牙本质的形成过程与成骨过程相似,即成骨细胞分化和成牙本质向分化是通过相似的过程完成的<sup>[14]</sup>。因此,可以推测 miR - 335 - 5p 可能也会参与成牙本质向分化过程,研究结果中的其他 miRNAs,包括 miR - 370 - 3p 和 miR - 199b - 5p,也被发现参与成骨分化的过程<sup>[15, 16]</sup>。此外,生物信息学分析发现靶基因在 FoxO 信号通路、MAPK 信号通路等信号通路中显著富集,这两个信号通路已经被报道调控牙源性分化<sup>[17, 18]</sup>。因此,从靶点预测和功能分析结果来看,分化前后的 SHED - Exo 中的 miRNAs 可能会通过这些信号通路调控成牙本质向分化,但还需要进一步探索。

综上所述,本研究结果扩展了目前对 SHED 成牙本质向分化过程的认识,这可能为修复性牙本质形成提供新的见解和理论基础。

参考文献

- 1 周学东, 程磊, 郑黎薇. 全生命周期的龋病管理[J]. 中华口腔医学杂志, 2018, 53(6): 367 - 373
- 2 Moussa DG, Fok A, Aparicio C. Hydrophobic and antimicrobial dentin: a peptide - based 2 - tier protective system for dental resin composite restorations[J]. Acta Biomater, 2019, 88: 251 - 265
- 3 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
- 4 罗湘, 王志霞, 张志强, 等. 外泌体 lncRNA 在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2022, 51(2): 141 - 143, 151
- 5 Huang CC, Narayanan R, Alapati S, et al. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration[J]. Biomaterials, 2016, 111: 103 - 115
- 6 李陈诚, 杨礼丹, 余浪波, 等. 微 RNA 调控 MDSCs 在疾病发展中作用的研究进展[J]. 重庆医学, 2022, 51(4): 692 - 696
- 7 Wang M, Li J, Ye Y, et al. SHED - derived exosomes improve the repair capacity and osteogenesis potential of hPDLcs[J]. Oral Dis, 2022, doi: 10.1111
- 8 Li S, Lin C, Zhang J, et al. Quaking promotes the odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 7292 - 7304

(下转第 97 页)

和脊柱术后早期可为患者提供站立和行走训练<sup>[15]</sup>。通过人体浸入水中深度的变化调整肢体的负重,促进骨折后成骨细胞的分泌,温和的气泡刺激加速创面的愈合<sup>[16]</sup>。借助水中步行浴和水中浮条,减少重力对肢体的持续影响,促进大脑皮质对肢体支配的活跃性,同时协调躯干屈伸和旋转,建立中枢稳定性和灵活性,强化下肢分离运动,纠正异常步态和姿势<sup>[17,18]</sup>。

水疗运用水的多元化特性缓解肌肉痉挛、改善循环、增加关节活动度、提高平衡能力、纠正异常步态等,以及对人皮肤系统、运动系统、心血管系统、呼吸系统、神经系统、内分泌系统等产生明显的治疗效应<sup>[19,20]</sup>。本研究结果显示,水疗进行骨折康复的效果,制定相应的标准和规范,应用于临床治疗,有利于骨折术后的快速康复,具有较高的收益/投入比。

综上所述,BRRM水疗辅助下肢骨折术后功能康复具有明显的临床应用价值,尤其在减轻术后疼痛和肿胀、缩短康复时间、改善肢体运动功能以及患者住院体验方面具有优越性。

参考文献

- 1 Romero Pisonero E, Mora Fernández J. Multidisciplinary geriatric rehabilitation in the patient with hip fracture and dementia[J]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 2019, 54(4): 220-229
- 2 Bruder AM, Shields N, Dodd KJ, et al. Prescribed exercise programs may not be effective in reducing impairments and improving activity during upper limb fracture rehabilitation: a systematic review[J]. *J Physiother*, 2017, 63(4): 205-220
- 3 Dias JM, Cisneros L, Dias R, et al. Hydrotherapy improves pain and function in older women with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial[J]. *Braz J Phys Ther*, 2017, 21(6): 449-456
- 4 King MR. Principles and application of hydrotherapy for equine athletes[J]. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2016, 32(1): 115-126
- 5 王宁, 王伟, 胡西, 等. 军事训练伤水疗康复技术应用研究进

- 展[J]. *海军医学杂志*, 2021, 42(5): 651-654
- 6 唐莹, 江燕芳, 吴涛. 温泉水疗配合八段锦在改善特勤疗养员亚健康状态中的实施体会[J]. *中国疗养医学*, 2021, 30(11): 1214-1216
- 7 张宁平, 王中华, 潘志强, 等. 腾冲温泉水疗的特点及保健作用[J]. *西南军医*, 2021, 23(2): 173-175
- 8 钟锡波, 陈国, 梁嘉妍, 等. 水疗联合关节松动训练对手外伤患者术后康复的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2020, 43(6): 30-31
- 9 陈国, 王和强, 钟锡波, 等. 上肢涡流气压水疗对上肢烧伤术后瘢痕增生的疗效[J]. *实用临床医学*, 2020, 21(11): 23-25, 32
- 10 丛芳, 崔尧. 水中运动治疗的发展现状与展望[J]. *华西医学*, 2020, 35(5): 527-533
- 11 余雨荷, 许明, 张泓. 双重减重智能步态康复水疗训练系统的设计与研发[J]. *中国康复*, 2019, 34(2): 93-97
- 12 王俊, 王建强, 王铁钊, 等. 水疗康复技术专家共识[J]. *中国康复医学杂志*, 2019, 34(7): 756-760
- 13 韩良, 李书钢, 郭鹏飞, 等. 水疗联合熏蒸技术对四肢骨折术后肿胀及疼痛的影响[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(24): 102-105
- 14 丛芳, 崔尧. 脑卒中水中运动治疗中国循证临床实践指南(2019版)[J]. *中国康复理论与实践*, 2020, 26(3): 249-262
- 15 Ellapen TJ, Hammill HV, Swanepoel M, et al. The benefits of hydrotherapy to patients with spinal cord injuries[J]. *Afr J Disabil*, 2018, 7(1): 450
- 16 Wegner S, Thomas P, James C. Hydrotherapy for the long-term ventilated patient: a case study and implications for practice[J]. *Aust Crit Care*, 2017, 30(6): 328-331
- 17 Shaw-Battista J. Systematic review of hydrotherapy research: does a warm bath in labor promote normal physiologic childbirth? [J]. *J Perinat Neonatal Nurs*, 2017, 31(4): 303-316
- 18 Hägglund E, Hagerman I, Dencker K, et al. Effects of yoga versus hydrotherapy training on health-related quality of life and exercise capacity in patients with heart failure: a randomized controlled study[J]. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2017, 16(5): 381-389
- 19 赵燕挺, 陈伟, 苑杰华, 等. 水疗法治治疗脑瘫患儿的康复效果[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2021, 43(6): 538-540
- 20 杨等, 陈颖, 王焯, 等. 水疗配合呼吸训练对胸腰段脊髓损伤患者肺功能及活动能力的影响[J]. *中国综合临床*, 2021, 37(3): 269-274

(收稿日期: 2022-04-06)

(修回日期: 2022-05-05)

(上接第88页)

- 9 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
- 10 Cao LL, Zhang YJ, Wang JW, et al. Studies on microRNA regulation of multidirectional differentiation of dental pulp stem cells: a narrative review[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(6): 1816-1824
- 11 Huang X, Xu S, Gao J, et al. miRNA expression profiling identifies DSPP regulators in cultured dental pulp cells[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(4): 659-667
- 12 包丽荣, 赵文青, 林田, 等. BMP-2诱导人牙髓细胞分化过程中miRNA表达谱的变化[J]. *上海口腔医学*, 2017, 26(5): 476-483
- 13 Zhao W, Tang Y, Yang Y, et al. Low-magnitude, high-frequency vibration promotes osteogenic differentiation via Intensifying miRNA-335-5p expression[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2019, 38(3): 271-283
- 14 Panseri S, Montesi M, Dozio SM, et al. Biomimetic scaffold with aligned microporosity designed for dentin regeneration[J]. *Front Bio-*

- eng Biotechnol, 2016, 4:48
- 15 Jia B, Wang Z, Sun X, et al. Long noncoding RNA LINC00707 sponges miR-370-3p to promote osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells through upregulating WNT2B[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 67
- 16 Dai F, Du P, Chang Y, et al. Downregulation of miR-199b-5p inducing differentiation of bone-marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) toward cardiomyocyte-like cells via HSF1/HSP70 pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 2700-2710
- 17 Cui D, Xiao J, Zhou Y, et al. Epiregulin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via activating MAPK signalling pathway[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(6): e12680
- 18 Novakova S, Danchenko M, Okajceková T, et al. Comparative proteomic and metabolomic analysis of human osteoblasts, differentiated from dental pulp stem cells, hinted crucial signaling pathways promoting osteogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7908

(收稿日期: 2022-04-27)  
(修回日期: 2022-05-07)