

人重组转化生长因子 β_1 促进牙髓干细胞的增殖和矿化

贾维茜, 赵玉鸣, 葛立宏[△]

(北京大学口腔医学院·口腔医院, 儿童口腔科 口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室 口腔数字医学北京市重点实验室, 北京 100081)

[摘要] **目的:** 研究人重组转化生长因子 β_1 (recombinant human transforming growth factor β_1 , rhTGF- β_1) 对牙髓干细胞生物学性能的影响, 包括确定促进牙髓干细胞增殖的最佳作用浓度和该浓度下对牙髓干细胞分化的作用。 **方法:** 分离培养人健康第三磨牙牙髓干细胞, 分别加入 1 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 的 rhTGF- β_1 , CCK-8 (cell counting kit-8) 法检测对牙髓干细胞增殖的影响, 选择出最佳浓度在成骨/成牙本质诱导条件下连续培养, 酶标仪检测碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 光密度值, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白质定量试剂盒计算总蛋白含量, 两者比值作为 ALP 相对活性的指标。茜素红染色观察矿化结节形成能力, 染色液洗脱后检测光密度值, 比较 rhTGF- β_1 对牙髓干细胞增殖和分化的作用。 **结果:** 牙髓干细胞具有体外形成矿化结节的能力, 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 可促进牙髓干细胞增殖; 连续培养 7 d 后, 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 组细胞 ALP 的光密度值为 0.31 ± 0.03 , 显著高于对照组 0.02 ± 0.01 ($P < 0.05$); 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 组总蛋白含量为 $(2\ 775.46 \pm 83.54)$ mg/L, 对照组为 $(1\ 432.20 \pm 110.83)$ mg/L ($P < 0.05$); ALP 相对光密度值, 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 组较对照组提高了 6 倍。茜素红染色下显示矿化结节形成增加, 洗脱液光密度值 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 组和对照组分别为 0.83 ± 0.02 和 0.55 ± 0.05 , $P < 0.05$ 。 **结论:** 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 具有促进牙髓干细胞增殖和促进体外成牙本质分化的作用。

[关键词] 牙髓干细胞; 人重组转化生长因子 β_1 ; 成牙本质细胞; 分化

[中图分类号] R780.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2017)04-0680-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-167X.2017.04.024

Recombinant human transforming growth factor β_1 promotes dental pulp stem cells proliferation and mineralization

JIA Wei-qian, ZHAO Yu-ming, GE Li-hong[△]

(Department of Pediatric Dentistry, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Engineering Laboratory for Digital and Material Technology of Stomatology & Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology, Beijing 100081, China)

ABSTRACT Objective: To explore suitable concentration of recombinant human transforming growth factor β_1 (rhTGF- β_1) usage and study the effect of rhTGF- β_1 on differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs). **Methods:** DPSCs were isolated from the undiseased third molars of people aged 18–25 years and cultured according to instructions *in vitro*. Different concentrations (1, 6, 10 $\mu\text{g/L}$) of rhTGF- β_1 were added to the culture medium to examine DPSCs proliferation by CCK-8 (cell counting kit-8) assay. The suitable concentration was then selected. For differentiation, the DPSCs were incubated for 7 or 14 days with rhTGF- β_1 supplemented with osteo/odontoblastic induction medium containing 10 nmol/L dexamethasone, 10 mmol/L b-glycerophosphate, 50 g/L ascorbate phosphate, 10 nmol/L 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and 10% fetal bovine serum. The cells were then washed 3 times with phosphate-buffered saline and sonicated with 1% Triton X-100 for 30 minutes on ice. Cellular alkaline phosphatase (ALP) activity was assayed with p-nitrophenyl phosphate as the substrate. The enzyme activity was expressed as p-nitrophenyl produced per milligram of protein [bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit]. To examine mineral nodule formation, the cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde and washed in water, and the mineralization of the extracellular matrix was assayed by 1% alizarin red S staining and elution of staining was examined as optical density (D) under microplate reader. The mean difference was considered significant at 0.05 and 95% confidence interval. **Results:** The DPSCs had typical fibroblast morphology and could form mineral nodules after being cultured with osteo/odontoblastic

基金项目: 北京大学“985工程”三期项目临床医院合作专项(2013-4-01)和北京大学口腔医院青年基金(PKUSS20150104)资助 Supported by the 985 Project of Peking University (2013-4-01) and Youth Foundation of Peking University School and Hospital of Stomatology (PKUSS20150104)

[△] Corresponding author's e-mail, gelh0919@126.com

网络出版时间:2017-4-28 11:21:56 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20170428.1121.016.html>

induction medium for 14 days. 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 significantly promoted the DPSCs proliferation on the 3rd and 5th days. After the incubation of osteo/odontoblastic induction medium, the DPSCs with the 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 increased ALP activities compared with the control; D values in the 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 group was 0.31 ± 0.03 , while the control group was 0.02 ± 0.01 ($P < 0.05$). The total protein content in the 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 group was $(2\,775.46 \pm 83.54)$ mg/L, and the control group was $(1\,432.20 \pm 110.83)$ mg/L ($P < 0.05$). To eliminate the cells proliferation influence, relative ALP activities, which was defined as the total ALP divided by the total protein content, the 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 group was 6 times higher than the control group. Alizarin red S staining showed increased mineral nodule formation in the rhTGF- β_1 group. The elution of staining under microplate reader also showed more optical density in the 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 -treated cells (0.83 ± 0.02) than that in the control groups (0.55 ± 0.05 , $P < 0.05$). **Conclusion:** 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 could significantly promote DPSCs proliferation and odontoblastic differentiation *in vitro*.

KEY WORDS Dental pulp stem cells; Recombinant human transforming growth factor β_1 ; Odontoblast; Differentiation

牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)自 Gronthos 等^[1]于 2000 年从人健康第三磨牙牙髓中分离以来,其性质和临床应用一直是口腔内科学研究的热点,与其他类型的成体干细胞一样,DPSCs 具有自我复制的能力和在一定条件下定向分化成终末细胞的能力^[2]。成牙本质细胞是形成牙本质的前体细胞,也是牙髓组织中的终末分化细胞。在牙齿的正常发育过程中,成牙本质细胞由牙髓干细胞分化而来,单层排列于牙本质内层,不断分泌形成牙本质;牙齿萌出后,因龋病等造成成牙本质细胞死亡后,牙髓内部生活的干细胞分化为成牙本质细胞样细胞,形成修复性牙本质,可见,牙本质的形成与这些细胞的存在具有密切关系。

在牙髓干细胞的成牙本质分化中,已知多种因子[如转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、骨形态发生蛋白、成纤维细胞生长因子等]可能起到促进分化的作用^[3]。正常情况下,TGF- β 存在于牙本质基质中,当牙齿因龋病等因素出现脱矿,基质中 TGF- β 释放,促进成牙本质细胞的分化和介导牙体组织的修复。TGF- β 主要有 1~3 三种分型,本文主要研究 TGF- β_1 对牙髓干细胞增殖、矿化能力的诱导分化作用,探索其对成牙本质分化的影响,为临床上牙髓再生、诱导牙本质形成和恢复牙齿结构完整性做准备。

1 资料与方法

1.1 牙髓干细胞的原代分离培养

于北京大学口腔医学院口腔颌面外科获取 18~25 岁、因正畸或阻生拔除的人健康第三磨牙,D-Hanks 液冲洗牙齿表面,在牙颈部将牙齿离断,拔髓针取出牙髓,D-Hanks 液冲洗数次,置于含消化酶(4 g/L 分散酶+3 g/L I 型胶原酶,美国 Sigma 公司)的培养皿中,无菌弯剪剪成小于 1 mm^3 的组织块,收集并转移至 15 mL 离心管中,37 $^\circ\text{C}$ 恒温振荡器中消

化约 40 min 至组织块疏松,加入等体积培养基终止消化,1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入培养基轻柔吹打均匀,转移至培养皿中,细胞培养于含 10% (体积分数)胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、1% (质量分数)青霉素钠(美国 GIBCO 公司)、1% (质量分数)链霉素(美国 GIBCO 公司)、2 mmol/L-谷氨酰胺(美国 GIBCO 公司)的 α -MEM 培养基(α -modification of Eagle's medium, 美国 GIBCO/BRL 公司),恒温培养箱(37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2)中培养。每 3 天换液,至相邻细胞克隆集落汇合,开始传代。

1.2 牙髓干细胞的传代培养

当细胞生长至 80%~90% 汇合时开始传代,首先用 D-Hanks 液冲洗 2 遍,加入 0.5~1 mL 0.25% (质量分数)胰蛋白酶+0.04% (质量分数)乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid, EDTA, 美国 Sigma 公司)消化液,倒置显微镜下观察,当细胞收缩成圆形时加入培养基终止消化,吸管反复吹打培养皿底壁,形成细胞悬液,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入少量培养液轻柔吹打均匀,分 3~5 份进行传代,接种于新的培养皿中。用第 2 代细胞进行实验。

1.3 细胞增殖的检测 (cell counting kit-8, CCK-8 法)

取第 2 代生长良好的细胞,以 4 000 个细胞/孔接种于 96 孔板中。次日,向孔中分别加入 100 μL 含 1 $\mu\text{g/L}$ 、6 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 人重组转化生长因子 β_1 (recombinant human transforming growth factor β_1 , rhTGF- β_1 , 美国 Peptrotech 公司)的培养基进行诱导,对照组加入 100 μL α -MEM 培养基,每个浓度设 6 个复孔。分别于诱导后第 1、3、5 天避光条件下加入新鲜配制含 10 μL CCK-8 (日本 WST 公司)的 100 μL 培养基,37 $^\circ\text{C}$ 孵箱孵育 1.5 h,酶标仪 (ELX808IU, 美国 Biotek 公司)测定 450 nm 下光密度值(optical density, D)。实验重复 3 次。

1.4 矿化诱导

取第2代生长良好的细胞,以50 000个细胞/孔接种于6孔板中。待细胞80%汇合时,加入成骨/成牙本质诱导液[含10% (体积分数)胎牛血清、 10^{-8} mol/L地塞米松、1.8 mmol/L磷酸二氢钾、100 U/mL青霉素钠/链霉素、0.1 mmol/L L-抗坏血酸、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 α -MEM培养基],每3天换一次液。对照组采用细胞培养液连续培养。

1.5 细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测

取第2代生长良好的细胞,以50 000细胞/孔接种于6孔板中,待细胞汇合80%后,加入含6 μ g/L rhTGF- β_1 的成骨/成牙本质诱导液。连续诱导7 d后,磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗3遍。每个样本加入200 μ L 1% (体积分数) Triton X-100 (美国Sigma公司),4 $^{\circ}$ C裂解30 min。收取细胞,超声破碎,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C离心15 min。取60 μ L上清液至96孔板,加入60 μ L对-硝基苯磷酸盐 (p-nitrophenyl phosphate, p-NPP, 美国Sigma公司),37 $^{\circ}$ C孵育15 min,用30 μ L 3 mol/L NaOH中止反应,酶标仪测定405 nm下光密度值,记为碱性磷酸酶光密度值。离心后的样本取20 μ L上清液,应用BCA蛋白质定量试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司),酶标仪测定570 nm下光密度值,记为总蛋白光密度值。倍比稀释的不同浓度标准蛋白光密度值绘制标准曲线,计算样本中总蛋白含量。将ALP光密度值与总蛋白含量相比,作为相对ALP活性的检测指标,并计算两组间倍增差异。

1.6 茜素红染色

矿化诱导14 d后,PBS洗3遍,4% (质量分数)多聚甲醛固定30 min,蒸馏水洗3遍,1% (质量分数)茜素红 (美国Sigma公司)染色10 min,蒸馏水充分冲洗,肉眼及镜下观察棕红色染色颗粒。半定量方法采用每孔加入500 μ L 10 mmol/L磷酸钠和10% (质量分数)西吡氯铵的洗脱液,摇床洗脱3 h,取100 μ L样本置于96孔板,酶标仪检测570 nm波长下光密度值。

1.7 统计学分析

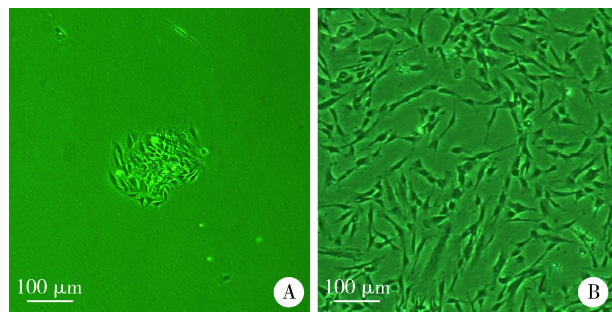
使用统计软件SPSS 13.0进行分析,细胞增殖采用单因素方差分析 (组间比较采用LSD法),ALP活性检测和茜素红染色洗脱结果采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牙髓干细胞的体外分离、培养

酶消化法进行原代培养后,第2天可见未贴壁细胞和少量细小纤维悬浮于培养皿中,换液后可见散在贴壁生长的细胞。约5 d后,单个细胞呈集落生长,细胞形态为纺锤形、梭形 (图1A)。10 d左右,细胞数量增加明显,相邻集落开始汇合,此时进行细胞的传代培养。

1~4代人牙髓干细胞状态良好,细胞形态均一,后续实验均采用第2代细胞 (图1B)。



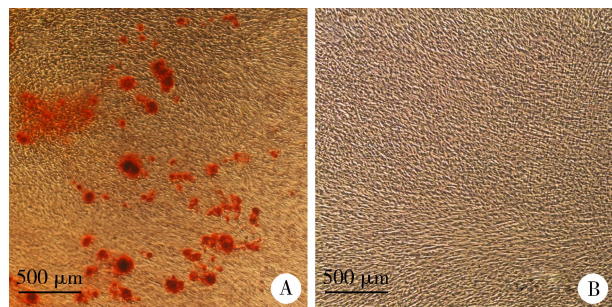
A, primary cultured DPSCs, colony was formed ($\times 4$); B, passage 2 were fibroblast-like cells ($\times 4$).

图1 牙髓干细胞原代和第2代细胞形态

Figure 1 Morphology of primary and passage 2 cells

2.2 牙髓干细胞的体外矿化

将牙髓干细胞在成骨/成牙本质诱导条件下,连续培养14 d,显微镜下观察细胞呈复层生长,局部形成漩涡样结构。固定细胞后,1% (质量分数)茜素红染色,可见实验组有红染的钙化结节产生 (图2A),阴性对照组未见钙化结节产生 (图2B)。



A, alizarin red S staining showed mineral nodule formation after DPSCs were cultured in osteo/odontoblastic induction medium for 14 days ($\times 4$); B, negative control ($\times 4$).

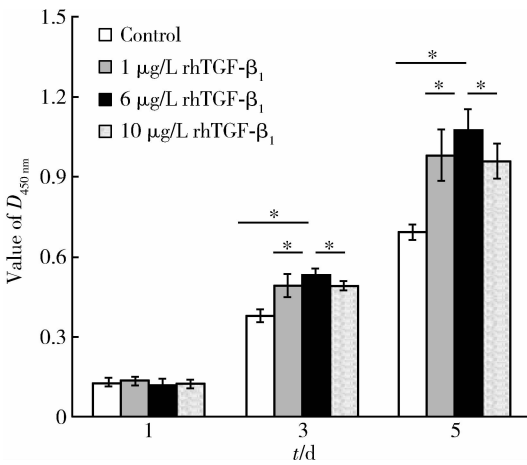
图2 牙髓干细胞矿化诱导

Figure 2 Osteo/odontoblastic induction of DPSCs

2.3 rhTGF- β_1 对牙髓干细胞增殖的影响 (CCK-8法)

在牙髓干细胞培养液中,分别加入1 μ g/L、6 μ g/L、10 μ g/L的rhTGF- β_1 ,观察对细胞增殖的作用,结果显示,加样后第1天不同浓度间细胞数量没有明显差异,第3天开始,6 μ g/L rhTGF- β_1 具有促进DPSCs生长的作用,至第5天其促进作用

更加明显,细胞增殖的差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3)。



CCK-8 assay, on the 3rd and 5th day, 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 promotes the proliferation of DPSCs. * $P < 0.05$, vs. control.

图3 rhTGF- β_1 对牙髓干细胞增殖的影响

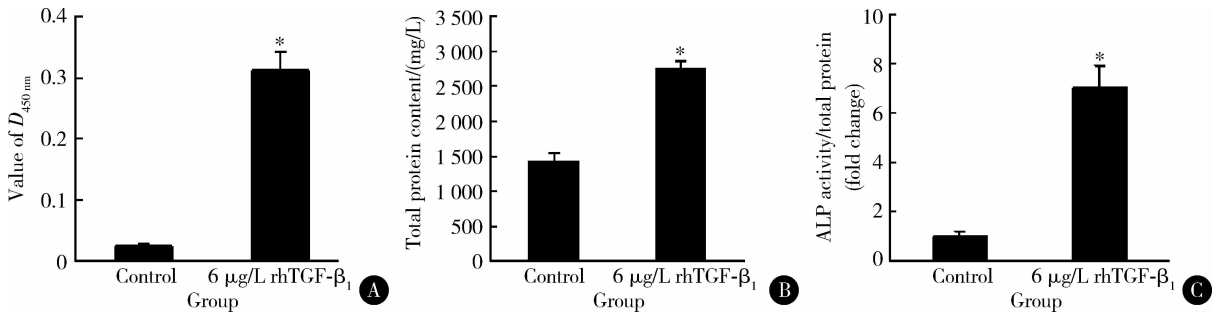
Figure 3 Effect of rhTGF- β_1 on proliferation of DPSCs

2.4 rhTGF- β_1 对牙髓干细胞 ALP 表达的影响

实验组加入 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 , 7 d 后测量细胞表达 ALP 的情况。检测 ALP 总量发现,在 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 的作用下细胞表达 ALP 总量明显升高,差异有统计学意义(图 4A)。为了排除细胞数量增多引入的 ALP 含量升高,采用 BCA 法提取细胞总蛋白,结果显示 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 组总蛋白含量较对照组升高,间接反映了细胞数量增加(图 4B)。将每组 ALP 含量除以总蛋白比值计算相对 ALP 活性,显示 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 组相对对照组提高了 6 倍,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4C)。

2.5 茜素红染色及半定量分析

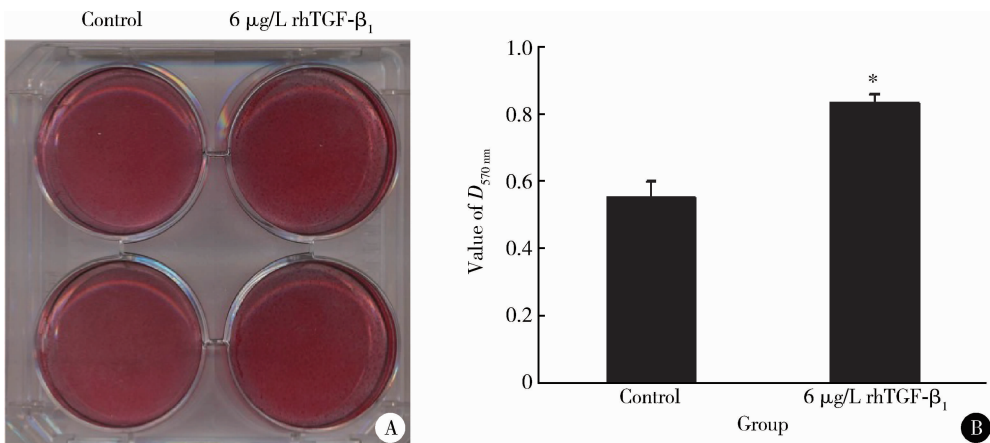
在牙髓干细胞矿化诱导体系中,加入 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 ,连续培养 14 d 后行茜素红染色,与对照组相比形成的矿化结节数量增加,着色程度加深。染色液洗脱后,采用酶标仪测定光密度值进行比较, rhTGF- β_1 组洗脱液光密度值较溶剂对照组升高(图 5)。



A, DPSCs with 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 increased total ALP activity compared with control; B, total protein content was also increased; C, divided by total protein as relative ALP activity, 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 group was 6 times higher than the control group. * $P < 0.05$, vs. control.

图4 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 促进牙髓干细胞 ALP 的表达

Figure 4 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 significantly increased ALP activity



A, alizarin red S staining indicated that 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 -treated cells showed increase in mineral nodule formation (right) compared with control (left); B, elution of staining under microplate reader also showed increased optical density in 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 -treated cells. * $P < 0.05$, vs. control.

图5 茜素红染色及洗脱液分析

Figure 5 Alizarin red S staining and elution analyze

3 讨论

TGF 是调控细胞生长的肽类物质之一,可由体内诸多细胞产生,具有重要的生理病理和治疗作用,迄今所分离的 TGF 主要分为 TGF- α 和 TGF- β 。TGF- α 主要在创伤愈合中发挥作用,介导上皮和组织结构发生。TGF- β 家族在牙齿发生中是成牙本质细胞分化和牙本质基质生成中的重要信号分子,通常由成牙本质细胞分泌,沉积于牙本质基质中,具有抗炎、促进创伤愈合、抑制巨噬细胞和淋巴细胞增殖的作用,可促进牙髓组织矿化,作用机制是与受体结合导致胞内信使如 Smad-2、3 磷酸化,从而引起一系列的信号传导。TGF- β 主要有 1~3 三种分型,其中与成牙本质细胞分化和牙本质基质形成密切相关的是 TGF- β_1 ^[4] 和 TGF- β_3 。Li 等^[5] 的研究发现,TGF- β_1 可诱导鼠牙髓细胞成牙本质分化和牙本质形成,表现为矿化结节形成显著,碱性磷酸酶活性增加,体内分化形成成牙本质细胞和牙本质小管样结构,在细胞增殖中无明显作用,连续培养 7 d 后,细胞表达牙本质涎蛋白、骨桥素、I 型胶原。Shiba 等^[6] 指出 TGF- β_1 可促进牙髓细胞表达骨钙素和骨桥素。Zhang 等^[7] 应用 0、20、400 ng TGF- β_1 与聚乙丙交酯微球复合的磷酸钙材料,覆盖于羊牙髓断面,12 周后可见牙本质桥形成,并呈剂量依赖性,400 ng TGF- β_1 可明显诱导牙髓中的细胞成分迁移,分化为成牙本质样细胞,形成三期牙本质。Huoja 等^[8] 在胎鼠牙胚中加入 rhTGF- β_3 ,证明其通过上调鼠牙髓细胞中骨钙蛋白和 I 型胶原,介导牙本质涎磷蛋白和牙本质基质蛋白 1 的表达,诱导鼠牙髓细胞的异位矿化。

本文主要研究临床上易于获取、组织量大的人健康第三磨牙 DPSCs 在 rhTGF- β_1 诱导条件下的增殖和分化作用,通过 CCK-8 法得出 6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 在体外对牙髓干细胞具有促进增殖的作用,与 Li 等^[5] 的研究未能促进鼠牙髓细胞增殖结果不同,这可能是细胞来源不同所致。

成牙本质细胞的主要功能是形成牙本质,ALP 是参与骨等矿化组织代谢和再生的重要物质,它在硬组织形成中可促进钙化,成牙本质细胞具有较高的 ALP 水平,ALP 表达是牙髓细胞向成牙本质细胞分化的指标。本文结果显示,6 $\mu\text{g/L}$ rhTGF- β_1 诱导 DPSCs 7 d 后细胞中碱性磷酸酶总量明显上升,细胞中总蛋白含量相应增加 (BCA 法),这是细胞增殖的

结果。为了排除细胞增殖的影响,计算 ALP 相对含量结果显示,rhTGF- β_1 诱导后细胞表达 ALP 能力显著增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 rhTGF- β_1 诱导了细胞的成牙本质分化。

牙髓细胞在体外培养诱导分化时,首先形成细胞结节,继而矿化形成矿化结节,经检测这种矿化结节主要为牙本质样的矿化基质,具有牙本质的特性,因此,矿化结节的出现在某种程度上表明了牙髓干细胞的存在,并作为牙髓细胞向成牙本质细胞分化的标志。本研究茜素红染色的结果也表明,rhTGF- β_1 提高了干细胞的体外矿化能力,表现为矿化结节形成量多于对照组,与 Li 等^[5] 的结果一致,提示 rhTGF- β_1 具有促进牙髓干细胞矿化的作用。

本研究分离培养的牙髓细胞具有干细胞的特性,rhTGF- β_1 作为细胞分化的重要生长因子,可促进牙髓干细胞体外增殖和成牙本质分化。生长因子是组织工程学研究中的一个重要部分,后续研究利用 rhTGF- β_1 的这一性能,能够更好地应用于牙齿硬组织再生和牙髓再生。

参考文献

- [1] 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 USA, 2000, 97(25): 13625 - 13630.
- [2] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells [J]. J Dent Res, 2002, 81(8): 531 - 535.
- [3] Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action [J]. J Endod, 2007, 33(4): 377 - 390.
- [4] Luisi SB, Barbachan JJ, Chies JA, et al. Behavior of human dental pulp cells exposed to transforming growth factor-beta1 and acidic fibroblast growth factor in culture [J]. J Endod, 2007, 33(7): 833 - 835.
- [5] Li Y, Lu X, Sun X, et al. Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF-beta1 [J]. Arch Oral Biol, 2011, 56(11): 1221 - 1229.
- [6] Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, et al. Transforming growth factor-beta1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in vitamin-D-activated pulp cells [J]. J Dent Res, 2001, 80(7): 1653 - 1659.
- [7] Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1 [J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(2): 439 - 444.
- [8] Huoja M, Muraoka N, Yoshizaki K, et al. TGF-beta3 induces ectopic mineralization in fetal mouse dental pulp during tooth germ development [J]. Dev Growth Differ, 2005, 47(3): 141 - 152.

(2015-09-09 收稿)

(本文编辑:刘淑萍)