

## miR-26b 对人脱落乳牙牙髓干细胞向神经及血管分化的影响

周绍兰, 袁媛园, 潘露, 徐文, 瞿姝嫒

<https://doi.org/10.12307/2025.560>

投稿日期: 2024-06-19

采用日期: 2024-09-24

修回日期: 2024-11-11

在线日期: 2024-11-26

中图分类号:

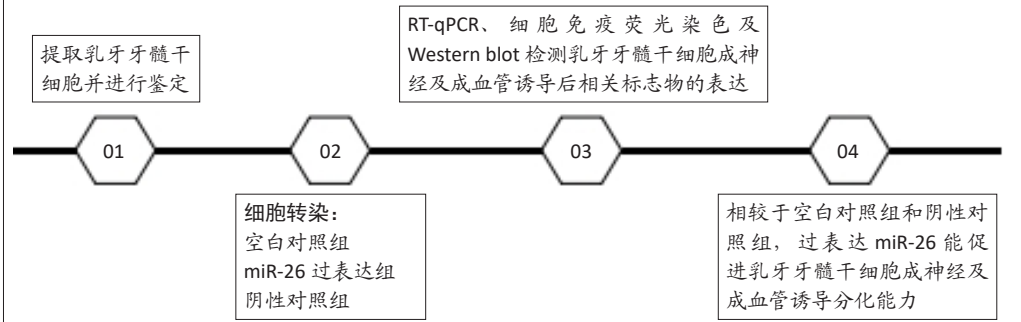
R459.9; R318; R780.1

文章编号:

2095-4344(2025)36-07769-07

文献标识码: A

## 文章快速阅读: miR-26b 对乳牙牙髓干细胞成神经及血管分化能力的影响



## 文题释义:

miR-26b: 是一种微小RNA, 长度约为22个核苷酸。miR-26b在神经发育、肿瘤发生和心血管系统中的作用受到了广泛关注, 主要包括促进细胞分化、调控细胞周期和凋亡, 以及参与疾病的发展。

人脱落乳牙牙髓干细胞: 是从儿童自然脱落的乳牙中提取的成体干细胞, 具有自我更新和多向分化潜能, 能够分化成多种细胞类型, 如成骨细胞、成牙本质细胞和神经细胞等, 在再生医学和组织工程领域具有应用潜力。

## 摘要

背景: 人脱落乳牙牙髓干细胞广泛应用于组织修复再生领域, 但组织再生效果在实际应用中存在局限性。利用miRNA干预人脱落乳牙牙髓干细胞的定向分化是未来组织修复再生的重要发展方向。

目的: 探讨miR-26b对乳牙牙髓干细胞成神经及成血管分化能力的影响。

方法: 从人脱落乳牙中分离提取乳牙牙髓干细胞, 并将其向神经及血管方向诱导分化, 分别检测成神经标志物Nestin、NSE、 $\beta$ III-Tubulin和成血管标志物CD31、VEGFR2、ANG-1及miR-26b的表达。然后将乳牙牙髓干细胞分为空白对照组、miR-26过表达组和阴性对照组, RT-qPCR、细胞免疫荧光染色及Western blot检测各组乳牙牙髓干细胞成神经及成血管诱导后相关标志物的表达变化。

结果与结论: ①乳牙牙髓干细胞具有多向分化潜能, 能向成骨、成脂、成神经及成血管方向分化; ②在乳牙牙髓干细胞成神经及成血管分化过程中miR-26b表达水平升高; ③相较于空白对照组和阴性对照组, miR-26b过表达组乳牙牙髓干细胞成神经相关基因 $\beta$ III-Tubulin、Nestin、NSE及成血管相关基因CD31、VEGFR2、ANG-1的mRNA表达显著升高( $P < 0.01$ ),  $\beta$ III-Tubulin、Nestin及CD31、VEGFR2蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ )。以上结果表明, miR-26b过表达能促进人脱落乳牙牙髓干细胞成神经和成血管诱导分化。

关键词: 乳牙牙髓干细胞; miR-26b; 成神经分化; 成血管分化; 牙髓再生; 工程化干细胞

## Effect of miR-26b on neural and vascular differentiation in stem cells from human exfoliated deciduous teeth

Zhou Shaolan, Yuan Yuanyuan, Pan Lu, Xu Wen, Qu Shuman

School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Zhou Shaolan, MS, Physician, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Corresponding author: Yuan Yuanyuan, MS, Associate chief physician, School of Stomatology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth are widely used in the field of tissue repair and regeneration, but the tissue regeneration effect has limitations in practical applications. Using miRNA to intervene in the directional differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth is an important development direction for tissue repair and regeneration in the future.

贵州医科大学口腔医学院, 贵州省贵阳市 550004

第一作者: 周绍兰, 女, 1996年生, 贵州省贵阳市人, 汉族, 2023年贵州医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事牙体牙髓病学相关工作, 以及牙髓干细胞方向研究工作。

通讯作者: 袁媛园, 硕士, 副主任医师, 贵州医科大学口腔医学院, 贵州省贵阳市 550004

<https://orcid.org/0009-0002-0806-3498> (袁媛园)

基金资助: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwmkj2021-1-353), 项目负责人: 袁媛园; 贵州医科大学附属口腔医院学科项目(KQYY-2021-2), 项目负责人: 袁媛园

引用本文: 周绍兰, 袁媛园, 潘露, 徐文, 瞿姝嫒. miR-26b 对人脱落乳牙牙髓干细胞向神经及血管分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7769-7775.



**OBJECTIVE:** To investigate the effect of miR-26b on the neurogenic and angiogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

**METHODS:** Dental pulp stem cells were isolated and extracted from human exfoliated deciduous teeth, and induced to differentiate into nerves and blood vessels. The expressions of neurogenic markers Nestin, NSE,  $\beta$ III-Tubulin, and angiogenic markers CD31, VEGFR2, ANG-1 and miR-26b were detected. Dental pulp stem cells were divided into blank control group, miR-26 overexpression group, and negative control group. RT-qPCR, cell immunofluorescence staining, and western blot assay were used to detect the expression changes of related markers of neurogenic and angiogenic induction of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in each group.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Stem cells from human exfoliated deciduous teeth had multi-directional differentiation potential and could differentiate into osteogenesis, adipogenesis, neurogenesis, and vasculogenesis. (2) The expression level of miR-26b increased during the neurogenic and angiogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. (3) Compared with the blank control group and negative control group, the mRNA expression of neuroblast-related genes  $\beta$ III-Tubulin, Nestin, NSE and angiogenesis-related genes CD31, VEGFR2, and ANG-1 in stem cells from human exfoliated deciduous teeth in the miR-26b overexpression group was significantly increased ( $P < 0.01$ ),  $\beta$ III-Tubulin, Nestin, CD31, and VEGFR2 protein expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The above results show that overexpression of miR-26b can promote the neurogenic and angiogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth.

**Key words:** stem cells from deciduous teeth; miR-26b; neurogenic differentiation; angiogenic differentiation; pulp regeneration; engineered stem cells

**Funding:** Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project, No. gzwjkj2021-1-353 (to YYY); Guizhou Medical University Affiliated Stomatology Hospital Discipline Project, No. KQYY-2021-2 (to YYY)

**How to cite this article:** ZHOU SL, YUAN YY, PAN L, XU W, QU SM. Effect of miR-26b on neural and vascular differentiation in stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7769-7775.

## 0 引言 Introduction

牙髓根尖周病是口腔中多发性疾病，通常是由剧烈刺激（如龋齿、意外创伤或医源性原因）对牙髓的不可逆损伤所造成，可引起牙齿及颌面部剧烈的疼痛、肿胀甚至患牙缺失<sup>[1]</sup>。据统计全球患病率高达52%<sup>[2]</sup>，这意味着全世界一半人口都至少有一颗牙齿患有牙髓根尖周病。根管治疗是目前临床上牙髓根尖周病的主要治疗方法<sup>[3]</sup>，尽管现阶段根管治疗方法有了很大的改善，但在各种因素的影响下，仍存在较高的失败率<sup>[4]</sup>，且根管治疗后的牙齿会丢失原有的富含神经及血管的牙髓组织，丧失牙髓生理功能。近些年随着组织工程技术的发展，利用牙髓再生技术重建牙髓血管及神经并恢复其应有的防御以及感觉功能成为可能<sup>[5]</sup>，牙髓再生技术也愈发受到研究者的关注。

人脱落乳牙牙髓干细胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs) 存在于乳牙牙髓组织，来源于外胚层神经嵴结构<sup>[6]</sup>，具有较其他来源间充质干细胞更强的神经向分化能力，同时 SHEDs 位于血管周围生态位，具有较强的成血管分化能力，是极具潜能的牙髓再生种子细胞，自从被发现以来一直是研究热点<sup>[7]</sup>。miRNA 与干细胞增殖、迁移、分化等多种功能密切相关<sup>[8]</sup>。miR-26b 是 miRNA 大家族的一员，过表达 miR-26b 可以促进内皮细胞的生长和存活，以增强血管内皮细胞增殖、迁移和血管形成能力<sup>[9]</sup>。此外，多项研究表明 miR-26b 参与调控间充质干细胞生物学特性，如 miR-26 促进 SHEDs 的增殖<sup>[10]</sup>。鉴于 SHEDs 具有出色的多向分化能力，以及 miR-26b 在间充质干细胞生物学中的重要调节作用，该实验在体外探究 miR-26b 对 SHEDs 成神经和成血管分化能力的影响，旨在为牙髓根尖周病的治疗提供新的策略。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞生物学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 11 月至 2023 年 1 月在贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心及贵州医科大

学附属医院临床医学研究中心完成。

1.3 材料 DMEM 低糖培养基 (Gibco, 美国); 成骨诱导培养基和茜素红染色试剂盒 (赛业, 广州); 血管内皮细胞诱导培养基 (Lonza, 瑞士); 胎牛血清 (Gibco, 美国); 无血清神经诱导培养基 (Gibco, 美国); B27 (Gibco, 美国); 表皮细胞生长因子 (Pepro Tech, 美国); 碱性成纤维细胞生长因子 (Pepro Tech, 美国); 成脂诱导培养基 (Biological Industries, 以色列); Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国); miR-26b mimics miRNAs (吉玛制药, 上海); mimics 对照 (吉玛制药, 上海); 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本); RT-qPCR 试剂盒 (TaKaRa, 日本); Rabbit anti-Nestin (Proteintech, 美国); Rabbit anti- $\beta$  III -Tubulin (Affinity, 美国); Rabbit anti-CD31 (Affinity, 美国); Rabbit anti-VEGFR2 (Proteintech, 美国); Rabbit anti-GAPDH (Abcam, 英国); Cy3 标记羊抗兔 IgG (H+L) (Biosharp, 广州); ECL 化学发光试剂盒 (碧云天, 上海); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 上海); 流式细胞仪 (Beckman, 美国); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (碧云天, 上海); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 SHEDs 的分离与培养 在 2021 年 11 月至 2022 年 3 月期间，从贵州医科大学附属口腔医院收集 6-10 岁儿童因未能正常脱落而拔除的乳牙样本，共计 4 颗。首先用体积分数 75% 乙醇对这些乳牙进行消毒，随后用 PBS 反复清洗，以去除残留杂质。清洗完毕后，在超净台内将牙冠与牙根分开，取出牙髓腔内的牙髓，用手术剪将牙髓组织剪碎，转移至含 I 型胶原酶的离心管中，37 °C 水浴消化 30 min，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬，接种于 T25 培养瓶中，在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱进行原代培养，待细胞生长融合率达到 60%-80% 时，加入 0.25% 胰蛋白酶消化，以 1 : 2 比例传代，传代扩增至第 3-5 代，用于后续研究。

该研究的实施符合贵州医科大学的相关伦理要求，

审批号为：2021 伦申第 (179) 号，征求患儿及其监护人同意并签订知情同意书

**1.4.2 SHEDs 鉴定及多向分化能力检测** 取第 3 代 SHEDs，用胰酶消化后进行离心，加入 5 mL PBS 制备成单细胞悬液，以 1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，用 PBS 重悬细胞，将细胞浓度调整为  $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ，分别加入 5  $\mu\text{L}$  含有 FITC 荧光标记的鼠抗人 CD90、CD105 抗体，以及含有 PE 荧光标记的鼠抗人 CD34、CD45 抗体，在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下避光孵育 30 min，1 000 r/min 离心 5 min，去除上清液，用 300  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞，然后转移至流式细胞仪检测。

第 3–5 代 SHEDs 以每孔  $6 \times 10^4$  个细胞密度接种于 6 孔板，待其生长融合至 60%–70% 时，成骨诱导组加入 2 mL 成骨诱导培养基，成脂诱导组加入 2 mL 成脂诱导培养基，每 3 d 换液 1 次，成脂诱导 21 d 进行油红 O 染色，成骨诱导 28 d 进行茜素红染色。

**1.4.3 SHEDs 成神经及成血管向诱导分化** 第 3–5 代 SHEDs 以每孔  $3 \times 10^4$  个细胞密度接种于 6 孔板，待细胞长至板底 60% 融合度时，成神经诱导组加入无血清神经诱导培养基 (Neurobasal A 培养基，2%B27 添加剂、20  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子、20  $\mu\text{g/L}$  表皮细胞生长因子及 1% 双抗)，成血管诱导组加入 2 mL 血管内皮细胞诱导培养基，每 2 d 换液 1 次，在诱导 7，14 d 通过 RT-qPCR 检测成神经相关基因 Nestin、 $\beta$  III -Tubulin、NSE 和成血管相关基因 CD31、VEGFR2、ANG-1 的表达，在诱导 14 d 通过细胞免疫荧光染色检测早期神经元标志物  $\beta$  III -Tubulin 及成血管相关蛋白 CD31 的表达。

**1.4.4 细胞转染及分组** 第 3 代 SHEDs 以每孔  $1.5 \times 10^5$  个细胞密度接种于 6 孔板，当细胞融合约 50% 时开始转染，将带有羧基荧光素 (FAM) 标记的 miR-26b mimics 和 miRNAs mimics 按照说明转染至 SHEDs。过表达组为转染 miR-26b mimics 的 SHEDs，阴性对照组为转染 miRNAs mimics 的 SHEDs，未进行转染的细胞设为空白对照组。转染 6 h 后，使用荧光显微镜观察荧光表达，然后继续在常规条件下培养 24–48 h，进行后续诱导实验。

**1.4.5 RT-qPCR 检测转染效率** 使用 Trizol 试剂提取各组 SHEDs 的总 RNA，根据反转录试剂盒使用说明将 RNA 反转录为 cDNA，采用 SYBR Green 法进行 RT-qPCR 扩增，PCR 程序设置为：95  $^{\circ}\text{C}$  30 s，95  $^{\circ}\text{C}$  5 s，55  $^{\circ}\text{C}$  30 s，72  $^{\circ}\text{C}$  30 s，共 40 个循环。以 U6 作为内参基因，使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算 miR-26b 的相对表达量。引物序列见表 1。

**1.4.6 RT-qPCR 检测过表达 miR-26b 后 SHEDs 成神经及成血管相关基因的表达** 第 3–5 代 SHEDs 以每孔  $3 \times 10^4$  个细胞密度接种于 6 孔板，当细胞融合度达到 70% 时，分别加入无血清神经诱导培养基和血管内皮细胞诱导培养基，分别在第 3，7，14 天终止诱导，然后提取细胞总 RNA，

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
miR-26b	F: GCC GCT TCA AGT AAT TCA GG R: TAT GGT TTT GAG GAC TGT GTA T
U6	F: CTC GCT TCG GCA GCA CA R: AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT
NSE	F: GAA TTC ATG TCC ATA GAG AAG ATC TG R: TCT AGA AGA GGA ATC ACA GCA CAC TG
Nestin	F: CAA GGT GTT GTG CGA TGA CG R: GGG CTC TGA TCT CTG CAT CTA C
$\beta$ III -Tubulin	F: GGC CAA GGG TCA CTA CAC G R: GCA GTC CGC AGT TTT CAC ACT C
CD31	F: ACG GAA GTT CAA GTG TCC TCA C R: GCT TTC CAC GGC ATC AGG GA
VEGFR2	F: CTG CCT ACC TCA CCT GTT TCC R: CTG TCC GTC TGG TTG TCA TCT G
ANG-1	F: TCG TGA GAG TAC GAC AGA CCA R: TCT CCG ACT TCA TGT TTT CCA C
GAPDH	F: CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT R: GAA GGC TGG GGC TCA TTT

通过 RT-qPCR 检测 miR-26b 的表达水平。

转染 SHEDs 生长融合约 70% 时，空白对照组、过表达组及阴性对照组细胞进行成神经及成血管向诱导分化，分别在第 7，14 天终止诱导，提取总 RNA，通过 RT-qPCR 检测成神经标志物 Nestin、NSE、 $\beta$  III -Tubulin 以及成血管标志物 CD31、VEGFR2、ANG-1 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

**1.4.7 免疫荧光检测过表达 miR-26b 后 SHEDs 成神经及成血管相关蛋白的表达** 转染 SHEDs 生长融合至 70%–80% 后，过表达组及阴性对照组细胞进行成神经及成血管向诱导分化，在第 14 天终止诱导。制备细胞爬片，PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；40 g/L 多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗涤 3 次，每次 2 min；0.1% Triton X-100 通透 15 min，PBS 洗涤 3 次，每次 3 min；用 3% BSA 在室温下封闭 30 min，然后孵育不同的一抗 (Rabbit anti- $\beta$  III -Tubulin、Rabbit anti-CD31，稀释比例 1 : 100)，于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜，PBS 清洗 3 次，每次 5 min；加入二抗，于室温孵育 1 h，PBS 洗 3 次，每次 5 min；加入抗荧光淬灭剂封固液进行封固，在荧光显微镜下观察，使用 Image J 软件定量分析荧光强度。

**1.4.8 Western blot 检测过表达 miR-26b 后 SHEDs 成神经及成血管相关蛋白的表达** 转染 SHEDs 生长融合至 70%–80% 后，空白对照组、过表达组及阴性对照组细胞进行成神经及血管向诱导分化，在第 14 天终止诱导，弃原培养基，PBS 清洗，加入高效蛋白裂解液使细胞充分裂解，离心收集上清，利用 BCA 法测定蛋白浓度，加入蛋白缓冲液，煮沸变性，每个泳道加入等量蛋白，进行 SDS-PAGE 电泳，转膜，5% 脱脂牛奶封闭 1 h，加入一抗 (Rabbit anti- $\beta$  III -Tubulin、Rabbit anti-Nestin、Rabbit anti-CD31、Rabbit anti-VEGFR2，稀释比例 1 : 3 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜，洗膜，加入二抗 (1 : 3 000) 常温孵育 1 h，ECL 曝光液曝光，保存图像，使用 Image J 进行定量分析。

1.5 主要观察指标 ① SHEDs 成神经及成血管诱导分化第 7、14 天成神经标志物 Nestin、NSE、 $\beta$  III -Tubulin 以及成血管标志物 CD31、VEGFR2、ANG-1 的表达; ② SHEDs 诱导分化过程中 miR-26b 的表达; ③ 过表达 miR-26b 后 SHEDs 成神经及成血管诱导分化第 14 天成神经标志物 Nestin、NSE、 $\beta$  III -Tubulin 以及成血管标志物 CD31、VEGFR2、ANG-1 的表达; ④ 过表达 miR-26b 后 SHEDs 成神经及成血管诱导分化第 14 天  $\beta$  III -Tubulin 及 CD31 蛋白荧光定量。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 21.0 统计软件进行所有数据的处理分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 Student's *t* test,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。文章统计学方法通过贵州医科大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 SHEDs 的培养和鉴定结果 原代培养 3-7 d, 显微镜下观察到细胞从组织块周边爬出, 贴壁生长, 多呈长梭形, 以组织块为中心呈放射状向四周生长。细胞传代后 2-4 h 开始贴壁生长, 两三天融合至 80%, 细胞形态较为均一, 相互间多以平行排列的方式生长 (图 1)。流式细胞术检测 SHEDs 表面抗原 CD34、CD45 表达为阴性, CD90、CD105 表达为阳性 (图 2)。成骨诱导 28 d 茜素红染色, 镜下可观察到红染的矿化结节形成; 成脂诱导 21 d 油红 O 染色, 镜下可观察到红染发亮的圆形脂滴形成, 脂滴大小不一 (图 3)。

2.2 SHEDs 成神经及成血管分化潜能 在成神经及成血管诱导分化后成神经相关基因  $\beta$  III -Tubulin、Nestin、NSE 和成血管相关基因 CD31、VEGFR2、ANG-1 的表达逐步上调 ( $P < 0.05$ ) (图 4A, B)。诱导 14 d 后免疫荧光染色可见神经元早期标志物  $\beta$  III -Tubulin 及成血管相关标志物 CD31 的表达 (图 4C)。

SHEDs 成神经和成血管诱导过程中 miR-26b 的表达逐步上调 ( $P < 0.01$ ) (图 5), 这一结果提示 miR-26b 的差异表达可能与 SHEDs 成神经元样细胞及成血管内皮样细胞分化相关。

2.3 miR-26b 过表达模型的验证 转染 miR-26b mimics 6 h 后, 通过荧光显微镜观察到大部分细胞的胞体内有绿色荧光。转染 48 h 后, 提取细胞总 RNA, 通过 RT-qPCR 检测 miR-26b 的表达变化。如图 6 所示, 过表达组中 miR-26b 的表达量比对照组提高了约 20 倍 ( $P < 0.001$ ), 说明 miR-26b mimics 可有效提高 miR-26b 在 SHEDs 中的表达。

2.4 过表达 miR-26b 促进 SHEDs 向神经及血管分化 在诱导分化第 7、14 天, 与空白对照组、阴性对照组比较, 过表达组成神经相关基因  $\beta$  III -Tubulin、Nestin、NSE 和成血管相关基因 CD31、VEGFR2、ANG-1 的 mRNA 水平均显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 7)。

在诱导分化第 14 天, 与空白对照组、阴性对照组比

较, 过表达组成神经相关蛋白  $\beta$  III -Tubulin、Nestin 和成血管相关蛋白 CD31、VEGFR2 的表达水平均显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 8)。在诱导分化第 14 天, 免疫荧光染色显示过表达组神经元早期标志物  $\beta$  III -Tubulin 及成血管相关标志物 CD31 的荧光强度较阴性对照组增强 (图 9)。

## 3 讨论 Discussion

随着再生医学与组织工程研究的发展, 利用干细胞实现牙髓再生已成为可行的研究方向<sup>[11-12]</sup>。牙髓是高度血管化和神经支配的组织, 这两者的共同作用可能是促使牙髓再生成功的关键<sup>[13-14]</sup>。SHEDs 起源于外胚间充质神经嵴, 具有较强的成神经分化能力, 研究发现 SHEDs 可通过多方面的神经再生活性促进脊髓损伤后的神经功能恢复<sup>[15]</sup>。不仅如此, SHEDs 位于血管周围生态位, 具有较强的成血管分化能力, 不仅可以分化为血管内皮细胞, 还可以分泌许多促进血管生成和神经发生的调节蛋白<sup>[16-18]</sup>。基于这一研究背景, 该研究首先成功分离提取 SHEDs, 所提取的 SHEDs 具有与间充质干细胞相似的基本形态、免疫表型和生物学特性<sup>[19-21]</sup>, 然后通过细胞因子成功诱导 SHEDs 成神经及成血管分化, 检测到成神经相关因子及成血管相关因子的显著表达, 与之前的研究结果一致<sup>[16, 22-23]</sup>, 提示 SHEDs 在成神经及成血管方面的良好开发潜能, SHEDs 可能是牙髓再生的潜在种子细胞。

牙髓再生治疗中, 干细胞的定植与分化受局部微环境的调控, miRNA 作为一类短小的非编码 RNA 分子, 广泛存在于生物体内, 转录后 miRNA 可以与靶基因的 mRNA 结合, 导致 mRNA 降解或者抑制其翻译, 从而参与细胞的生长、分化、凋亡等生物过程<sup>[24-26]</sup>。有学者通过基因芯片筛选发现 16 个 miRNAs 在间充质干细胞趋化迁移中的差异表达, 其中 miR-26b 的表达显著上调<sup>[27]</sup>, 提示 miR-26b 在间充质干细胞中可能发挥着重要的作用。miR-26b 是一种高度保守的 miRNA, 已有研究发现 miR-26b 的差异表达与多种细胞的增殖、分化密切相关, 过表达 miR-26b 促进骨髓间充质干细胞的成骨及成软骨分化、促进脂肪间充质干细胞的成脂分化及胚胎干细胞的成神经元分化<sup>[28-29]</sup>。此外, 课题组前期研究发现, miR-26b 过表达促进 SHEDs 的增殖及迁移, 因此推测 miR-26b 具有调控 SHEDs 定向分化的潜能<sup>[10]</sup>。

为验证 miR-26b 对 SHEDs 分化的影响, 通过 RT-qPCR 检测 miR-26b 在成神经及成血管诱导分化过程中的表达, 结果显示 miR-26b 的表达呈上调趋势且有明显时间依赖性, 提示 miR-26b 参与 SHEDs 成神经及成血管分化的调控过程, 这与之前的研究报道相一致<sup>[9, 30]</sup>。为进一步验证 miR-26b 是否会影响 SHEDs 成神经和成血管分化能力, 通过脂质体转染法上调 SHEDs 中 miR-26b 的表达量, 并



进一步诱导细胞向神经和血管方向分化。在 miR-26b 的作用下, 与成神经及成血管密切相关的基因及蛋白表达均相应升高, 证明 miR-26b 具有促进 SHEDs 成神经及成血管分化的能力。值得注意的是, 相对于成神经相关因子的表达, 成血管相关因子的表达总体上偏低, 推测这可能与 SHEDs 来源于神经嵴, 具有神经胚层的特性有关, 这使得它们在神经分化方向上更具有潜力。以上结果提示 miR-26b 的调控可能成为一种潜在的治疗策略, 用以促进牙髓组织再生和修复。

该研究证明 miR-26b 可增强 SHEDs 的成神经及成血管分化能力, 但干细胞的分化过程是一个高度协调、精密调控的生物学过程, 这个过程牵涉到复杂的分子网络, 包括转录因子、靶基因和多种信号通路的协同作用。近期有学者发现, 磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (phosphoinositide 3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt) 信号通路及与牙髓干细胞的增殖及迁移<sup>[31-32]</sup>、间充质干细胞的血管生成及神经分化密切相关<sup>[33-34]</sup>, 它被认为是细胞内一个重要的信号传导通路。

PI3K 是一种磷脂激酶, 活化的 PI3K 会将细胞膜上的 PIP2 转化为 PIP3, 当细胞内的 PIP3 水平增加时, Akt 被磷酸化并激活, 激活的 Akt 可以通过磷酸化一系列底物蛋白, 参与调控细胞增殖、分化、运动和代谢等多种生物学过程。而 miR-26b 可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的负调控因子如 PTEN 间接激活该信号通路<sup>[35-36]</sup>, 揭示 miR-26b 调控 SHEDs 分化的潜在机制。PTEN 是磷酸酶, 其主要功能是去除 PIP3 的磷酸基团, 将其还原为 PIP2, 这个过程抑制了 PI3K/Akt 信号通路的活性, 因此 PTEN 被认为是 PI3K/Akt 信号通路的重要负调控因子, 可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活进而抑制细胞的分化潜能<sup>[37-39]</sup>。miR-26b 对 PTEN 具有抑制作用, PTEN 是 miR-26b 的直接靶标, miR-26b 可以结合到 PTEN mRNA 的 3' UTR, 导致 PTEN mRNA 的降解, 从而减少 PTEN 蛋白的表达<sup>[36-38]</sup>。结合以上学者的研究及该实验的结果, 推测 miR-26b 上调可能抑制 PTEN 的表达, 从而增强 PI3K/Akt 信号通路的活性, 最终增强 SHEDs 成神经及成血管分化的能力。总体而言, miR-26b 的过表达可以促进 SHEDs 向神经和血管方向分化, 表现为成神经相关因子及成血管相关因子的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。这些结果为深入探究 miR-26b 在 SHEDs 分化过程中的调控机制提供重要线索。

综上所述, 过表达 miR-26b 促进 SHEDs 向神经和血管分化。然而, 由于体内环境及牙髓组织的成分相对复杂, 成神经及成血管分化的调控因子众多, 体外实验虽提示 miR-26b 具有促进 SHEDs 成神经及成血管的潜能, 却仍存在局限性, 有待后续体内实验进一步论证。此外, 后续也将深入研究 miR-26b 是否通过 PTEN 负反馈激活 PI3K/

Akt 信号通路从而促进 SHEDs 成神经及成血管分化。但总体而言, 该研究证明了 SHEDs 在牙髓再生性治疗中的潜在价值, 为临床治疗牙髓根尖周病提供新的契机。

**作者贡献:** 周绍兰负责实验实施以及论文撰写, 徐文负责细胞培养, 潘露负责相关指标检测, 瞿姝媛负责数据分析与处理, 袁媛园负责实验设计、统计学分析以及论文修改。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

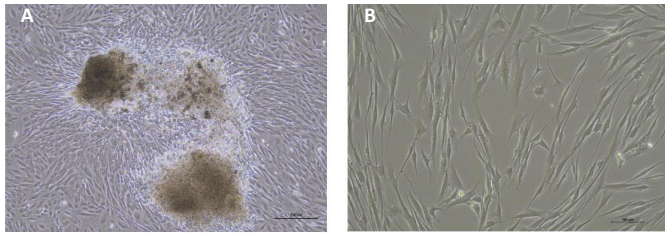
**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

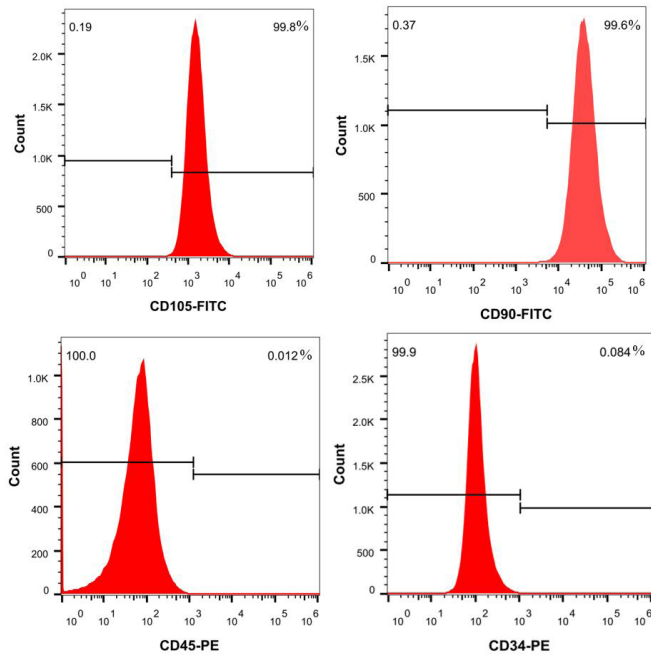
- JAKOVljević A, NIKOLIĆ N, JACIMOVIĆ J, et al. Prevalence of Apical Periodontitis and Conventional Nonsurgical Root Canal Treatment in General Adult Population: An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Cross-sectional Studies Published between 2012 and 2020. *J Endod.* 2020;46(10):1371-1386.e8.
- TIBÚRCIO-MACHADO CS, MICHELON C, ZANATTA FB, et al. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2021; 54(5):712-735.
- BURNS LE, KIM J, WU Y, et al. Outcomes of primary root canal therapy: An updated systematic review of longitudinal clinical studies published between 2003 and 2020. *Int Endod J.* 2022;55(7):714-731.
- BROCHADO MARTINS JF, GUERREIRO VIEGAS O, CRISTESCU R, et al. Outcome of selective root canal retreatment-A retrospective study. *Int Endod J.* 2023;56(3): 345-355.
- 凌均荣, 毛剑. 牙髓再生的研究现状与发展前景 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2018, 53(6):361-366.
- MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-5812.
- 魏珊, 李勤, 苏怡. 人乳牙牙髓干细胞的研究热点及应用潜能 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(1):125-129.
- MENS MMJ, GHANBARI M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev Rep.* 2018;14(3):309-322.
- MARTELLO A, MELLIS D, MELONI M, et al. Phenotypic miRNA Screen Identifies miR-26b to Promote the Growth and Survival of Endothelial Cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;13:29-43.
- 袁媛园, 潘露, 周绍兰, 等. miR-26b 对人脱落乳牙牙髓干细胞及人脐带间充质干细胞增殖、迁移和成骨分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(13):2017-2023.
- 马琳, 刘安琪, 郭皓, 等. 牙髓干细胞用于牙再生的新进展和新方向 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2024, 59(5):496-501.
- MURRAY PE, GARCIA-GODOY F, HARGREAVES KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-390.
- GOLDBERG M, NIEH A, UZUNOGLU E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:347649.
- BASABRAIN MS, ZHONG J, LIU J, et al. Interactions of Neuronally Induced Stem Cells from Apical Papilla Spheres, Stems Cells from Apical Papilla, and Human Umbilical Vascular Endothelial Cells on Vasculogenesis and Neurogenesis. *J Endod.* 2024;50(1):64-73.e4.
- YAMAMOTO A, SAKAI K, MATSUBARA K, et al. Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury. *Neurosci Res.* 2014;78:16-20.
- GUGLIANDOLO A, MAZZON E. Dental Mesenchymal Stem Cell Secretome: An Intriguing Approach for Neuroprotection and Neuroregeneration. *Int J Mol Sci.* 2021;23(1):456.
- SUGIMURA-WAKAYAMA Y, KATAGIRI W, OSUGI M, et al. Peripheral Nerve Regeneration by Secretomes of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Stem Cells Dev.* 2015;24(22):2687-2699.
- RATAJCZAK J, BRONCKAERS A, DILLEN Y, et al. The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9762871.
- GONMANEE T, THONABULSOMBAT C, VONGSAVAN K, et al. Differentiation of stem cells from human deciduous and permanent teeth into spiral ganglion neuron-like cells. *Arch Oral Biol.* 2018;88:34-41.
- AKPINAR G, KASAP M, AKSOY A, et al. Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells Int.* 2014; 2014:457059.
- CHEN K, XIONG H, XU N, et al. Chondrogenic potential of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro and in vivo. *Acta Odontol Scand.* 2014;72(8): 664-672.



图注：图 A 为培养 10 d 时原代人脱落乳牙髓干细胞 (标尺为 500 μm)；B 为第 3 代人脱落乳牙髓干细胞 (标尺为 100 μm)。

图 1 | 倒置显微镜下观察人脱落乳牙髓干细胞形态

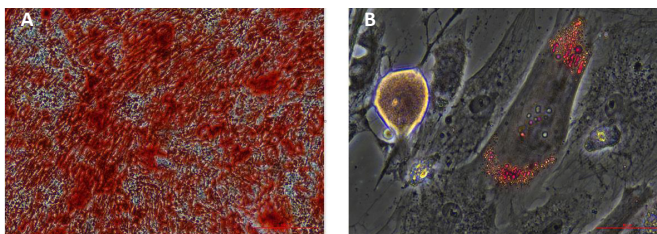
Figure 1 | Morphology of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained under inverted microscope



图注：间充质干细胞标志物 CD90、CD105 阳性表达率分别为 99.60%、99.80%，造血干细胞标志物 CD34、CD45 阳性表达率为 0.084%、0.012%。

图 2 | 人脱落乳牙髓干细胞的流式细胞术鉴定结果

Figure 2 | Results of flow cytometry identification of stem cells from human exfoliated deciduous teeth

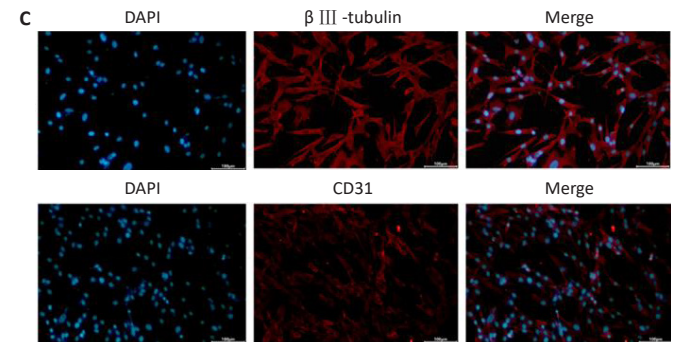
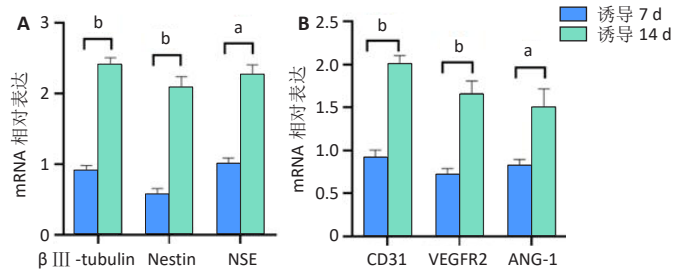


图注：图 A 为成骨诱导 28 d 茜素红染色，可见钙结节 (标尺为 500 μm)；B 为成脂诱导 21 d 油红 O 染色，可见脂滴 (标尺为 50 μm)。

图 3 | 人脱落乳牙髓干细胞的成骨、成脂分化潜能

Figure 3 | Osteogenic and adipogenic differentiation ability of stem cells from human exfoliated deciduous teeth

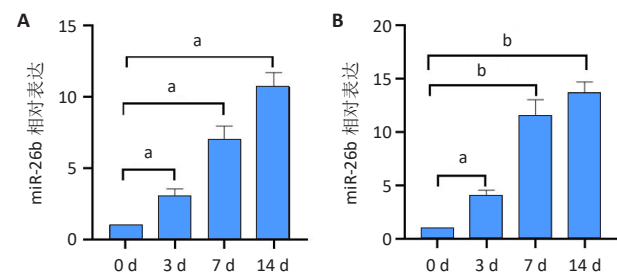
- [22] WANG P, ZHU S, YUAN C, et al. Shear stress promotes differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth into endothelial cells via the downstream pathway of VEGF-Notch signaling. *Int J Mol Med*. 2018;42(4):1827-1836.
- [23] XU JG, GONG T, WANG YY, et al. Inhibition of TGF-β Signaling in SHED Enhances Endothelial Differentiation. *J Dent Res*. 2018;97(2):218-225.
- [24] LI S, ZHAO W, XU Q, et al. MicroRNA-765 regulates neural stem cell proliferation and differentiation by modulating Hes1 expression. *Am J Transl Res*. 2016;8(7):3115-3123.
- [25] CAO C, LI L, LI H, et al. Cyclic biaxial tensile strain promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells by miRNA-27a. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;99:125-132.



图注：图 A 为 RT-qPCR 检测成神经相关基因的表达水平；B 为 RT-qPCR 检测成血管相关基因的表达水平；C 为免疫荧光检测 β III-tubulin 及 CD31 蛋白的表达 (标尺为 100 μm)。<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01。

图 4 | 人脱落乳牙髓干细胞的成神经、成血管分化潜能

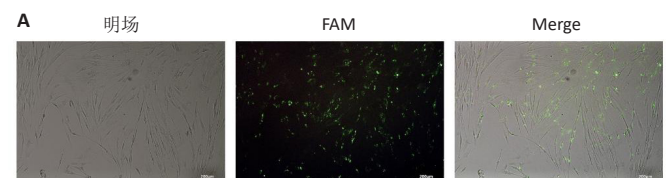
Figure 4 | Neurogenic and angiogenic differentiation ability of stem cells from human exfoliated deciduous teeth



图注：图 A 为成神经诱导分化过程中 miR-26b 的表达水平；B 为成血管诱导分化过程中 miR-26b 的表达水平。<sup>a</sup>*P* < 0.01, <sup>b</sup>*P* < 0.001。

图 5 | 人脱落乳牙髓干细胞成神经分化及成血管分化过程中 miR-26b 的表达水平

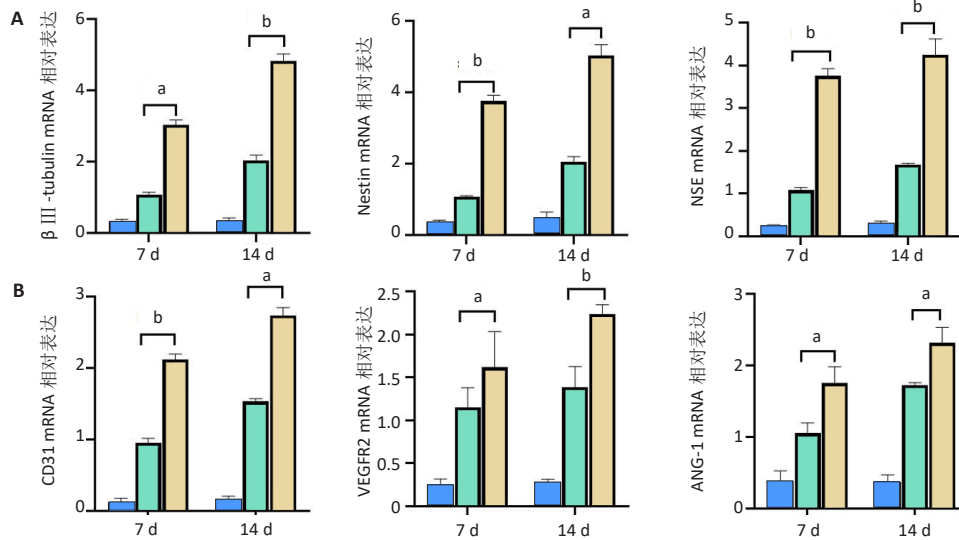
Figure 5 | Expression levels of miR-26b during neurogenic and angiogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth



图注：图 A 为人脱落乳牙髓干细胞转染 miR-26b mimics 6 h 后荧光显微镜下观察的明场图、荧光图 (标尺为 200 μm)；B 为转染 miR-26b mimics 48 h 后，细胞内 miR-26b 的相对表达量 (<sup>a</sup>*P* < 0.001)。

图 6 | 人脱落乳牙髓干细胞中羧基荧光素 (FAM) 荧光表达及 miR-26b 细胞转染率

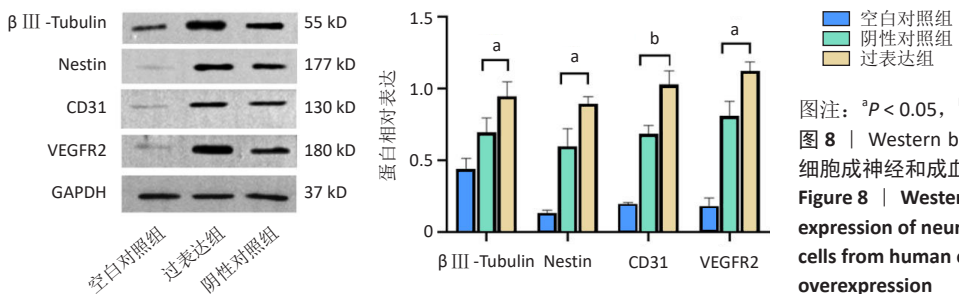
Figure 6 | Carboxyfluorescein (FAM) fluorescence expression and miR-26b cell transfection rate in stem cells from human exfoliated deciduous teeth



图注：图 A 为转染 miR-26b 后人脱落乳牙牙髓干细胞成神经分化第 7, 14 天成神经相关基因的表达；B 为转染 miR-26b 后人脱落乳牙牙髓干细胞成血管分化第 7, 14 天成血管相关基因的表达。<sup>a</sup>*P* < 0.01, <sup>b</sup>*P* < 0.001。

图 7 | RT-qPCR 检测 miR-26b 过表达人脱落乳牙牙髓干细胞成神经和成血管相关基因的表达变化

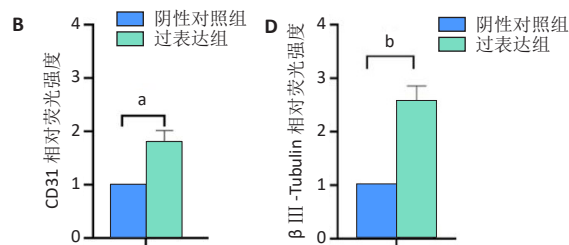
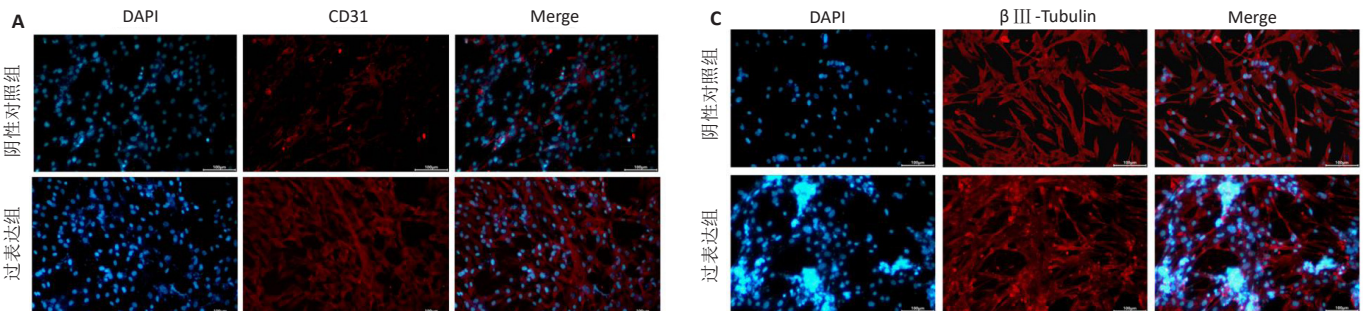
Figure 7 | Expression changes of neural-related genes and angiogenesis-related genes of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in miR-26b overexpression detected by RT-qPCR



图注：<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01。

图 8 | Western blot 检测 miR-26b 过表达人脱落乳牙牙髓干细胞成神经和成血管相关蛋白的表达变化

Figure 8 | Western blot analysis showing changes in expression of neurogenic and angiogenic proteins in stem cells from human exfoliated deciduous teeth in miR-26b overexpression



图注：图 A, C 为 CD31、β III-Tubulin 荧光表达 (标尺为 100 μm)；B, D 为 CD31、β III-Tubulin 蛋白的相对荧光强度，β III-Tubulin 过表达组的相对荧光强度约是阴性对照组的 2.3 倍，CD31 过表达组的荧光强度约是阴性对照组的 1.9 倍。<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01。

图 9 | 转染 miR-26b 后人脱落乳牙牙髓干细胞成神经和成血管诱导分化 14 d β III-Tubulin 及 CD31 免疫荧光染色

Figure 9 | Fluorescence quantification of βIII-Tubulin and CD31 proteins in stem cells from human exfoliated deciduous teeth after miR-26b transfection for 14 days after neurogenesis and vasogenesis

[26] HAN J, DENLI AM, GAGE FH. The enemy within: intronic miR-26b represses its host gene, *ctdsp2*, to regulate neurogenesis. *Genes Dev.* 2012;26(1):6-10.

[27] 朱爱思. HGF 通过上调 miR-221 及 miR-26b 促进 MSCs 的增殖及迁移 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.

[28] LUO Y, JI H, CAO Y, et al. miR-26b-5p/TCF-4 Controls the Adipogenic Differentiation of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 2020;29:963689720934418.

[29] WAS N, SAUER M, FISCHER U, et al. lncRNA *Malat1* and miR-26 cooperate in the regulation of neuronal progenitor cell proliferation and differentiation. *RNA.* 2022;29(1):69-81.

[30] DILL H, LINDER B, FEHR A, et al. Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript, *ctdsp2*. *Genes Dev.* 2012;26(1):25-30.

[31] WANG JH, HE DE. Simvastatin treatment promotes proliferation of human dental pulp stem cells via modulating PI3K/AKT/miR-9/KLF5 signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2021;25(23):10892-10901.

[32] 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. *Int Endod J.* 2019;52(12):1691-1703.

[33] SAMAKOVA A, GAZOVA A, SABOVA N, et al. The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiological condition in ischemia. *Physiol Res.* 2019;68(Suppl 2):S131-S138.

[34] HE J, ZHANG N, ZHU Y, et al. MSC spheroids-loaded collagen hydrogels simultaneously promote neuronal differentiation and suppress inflammatory reaction through PI3K-Akt signaling pathway. *Biomaterials.* 2021;265:120448.

[35] ZHU A, KANG N, HE L, et al. MiR-221 and miR-26b Regulate Chemotactic Migration of MSCs Toward HGF Through Activation of Akt and FAK. *J Cell Biochem.* 2016;117(6):1370-1383.

[36] SHI E, YE XN, XIE LY. miRNA-26b suppresses the TGF-β2-induced progression of HLE-B3 cells via the PI3K/Akt pathway. *Int J Ophthalmol.* 2021;14(9):1350-1358.

[37] ZHOU Y, QIAO H, LIU L, et al. miR-21 regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs by targeting PTEN. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2021;21(4):568-576.

[38] LI G, NING C, MA Y, et al. miR-26b Promotes 3T3-L1 Adipocyte Differentiation Through Targeting PTEN. *DNA Cell Biol.* 2017;36(8):672-681.

[39] 娜日松, 孙亮, 赵振群, 等. miR-26b 调控脂肪酸结合蛋白 4 介导脂肪细胞分化的分子机制 [J]. *中国组织工程研究.* 2022;26(2):260-265.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)