

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.14.002

TNF-α 对鼠根尖乳头干细胞增殖及多向分化能力的影响*

曹蓉蓉,马俊玥,李淑慧,马 玉,吴佩玲[△]
(新疆医科大学第二附属医院口腔科,乌鲁木齐 830063)

[摘要] **目的** 研究肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对鼠根尖乳头干细胞(SCAP)增殖及多向分化能力的影响。**方法** 采用酶消化法结合组织块法获得 SCAP,将细胞分为实验组(TNF-α 浓度为 5、10、20、50 ng/mL)和对照组(TNF-α 浓度为 0 ng/mL),使用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 SCAP 的增殖能力;采用茜素红染色及实时定量 PCR(qRT-PCR)检测 TNF-α 对 SCAP 成骨/成牙本质能力的影响;油红 O 染色检测 TNF-α 对 SCAP 成脂能力的影响;qRT-PCR 检测 TNF-α 对 SCAP 血管相关基因表达的影响。**结果** 体外培养 SCAP 符合间充质干细胞来源的特征且具有多向分化能力。MTT 结果显示:与对照组相比,各浓度组均能促进 SCAP 增殖($P<0.05$),其中 10 ng/mL TNF-α 的促进作用最为明显。茜素红染色结果显示:实验组随着 TNF-α 浓度的增加,矿化结节逐渐变小,形成数量也逐渐变少。qRT-PCR 结果显示:3、7 d 时,与对照组相比,实验组骨钙蛋白(OC)、牙本质涎磷蛋白(DSPP)、牙本质基质蛋白-1(DMP-1)表达量降低,3 d 时两组 OC、DMP-1 比较差异有统计学意义($P<0.05$);7 d 时 DMP-1 比较差异有统计学意义($P<0.05$);14 d 时,实验组 OC、DMP-1 表达量明显降低($P<0.05$)。油红 O 染色结果显示:与对照组相比,实验组随着 TNF-α 浓度的增加,脂滴形成数量逐渐减少。qRT-PCR 结果显示:3、7 天时,与对照组相比,血管生成素 1、血管内皮生长因子 A、血小板内皮细胞黏附分子-1 表达量明显降低($P<0.05$)。**结论** 炎症因子 TNF-α 对 SCAP 的增殖有明显促进作用但同时不同程度抑制 SCAP 多向分化能力。

[关键词] 干细胞;分生组织;肿瘤坏死因子 α;根尖乳头干细胞;多向分化;大鼠,Wistar
[中图分类号] R781.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)14-1874-04

Effect of tumor necrosis factor-α on the proliferation and multi-directional differentiation of stem cells from rat apical papilla*
Cao Rongrong, Ma Junyue, Li Shuhui, Ma Yu, Wu Peiling[△]
(Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 830063, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the biological effect of tumor necrosis factor-α(TNF-α) on the proliferation and multi-directional differentiation of stem cells from rat apical papilla(SCAP). **Methods** SCAP was extracted by combining enzyme digestion method with tissue block method. The cells were divided into control group(TNF-α 0 ng/mL) and experimental group(TNF-α 5, 10, 20, 50 ng/mL). The ability of proliferation of SCAP was measured by MTT method. The ability of osteogenic/dentinogenic differentiation of SCAP was measured by alizarin red staining and quantitative real-time PCR. The ability of adipogenic of SCAP was measured by oil red O staining. The expression of vascular related genes of SCAP was measured by quantitative real-time PCR. **Results** SCAP was consistent with the characteristics of mesenchymal stem cells and possessed the ability of multi-directional differentiation. The MTT results showed that experimental group promoted the proliferation of SCAP in comparison with the control group. The difference was statistically significant($P<0.05$), and 10 ng/mL was the optimum concentration. The results of alizarin red staining showed that with the increase of the concentration of TNF-α, the mineralized nodules in the experimental group gradually became smaller, and the number of the formation decreased gradually. The results of quantitative real-time PCR showed that the expression of OC, DMP-1 and DSPP in the experimental group was significantly lower than that of the control group at 3 and 7 days, in which the expression of OC was statistically significant different($P<0.05$); at 14 days, the expression of OC, DMP-1 in the experimental group was significantly lower than that of the control group($P<0.05$). The result of Oil red O staining showed that with the increase of the concentration of TNF-α, the lipid droplets formation in the experimental group gradually decreased. The result of quantitative real-time PCR showed that the expression of ANGPT1, VEGFA, PECAM-1 in the experimental group was significantly lower than that of the control group($P<0.05$). **Conclusion** TNF-α might promote the proliferation and inhibit the multi-directional differentiation of SCAP.

[Key words] stem cells; meristem; tumor necrosis factor-α; stem cells from rat apical papilla; multi-directional differentiation; rats, Wistar

2006 年, Sonoyama 等^[1] 从人未发育完全的第三磨牙根尖乳头组织中分离出新的间充质干细胞, 命名为根尖乳头干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP), 并证实它具有高度的增殖、自我更新和多向分化潜能, 并在一定的诱导条件下可向成骨/成牙本质、脂肪、软骨、肌肉、神经元等细胞分化。近年来, 随着人们对 SCAP 的深入研究, 证实 SCAP 在介导牙本质再生及牙根发育过程中发挥着极其重要的作用^[2]。牙髓炎、根尖周炎是一种复杂的炎症反应, 其中包含以肿瘤坏死因子-α(tumor

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460103)。 作者简介:曹蓉蓉(1992—),在读硕士,主要从事牙体牙髓学方面研究。 △ 通信作者, E-mail: wplkq@sina.com。

necrosis factor- α , TNF- α)为主的多种炎症因子,且炎症的病变程度与炎症因子的水平存在着一定的相关性^[3]。有研究结果显示,炎症微环境会影响干细胞的增殖和分化,甚至引起细胞凋亡^[4];但对于炎症因子对 SCAP 分化能力的影响研究甚少。本实验拟通过不同浓度 TNF- α 对 SCAP 进行干预,从而研究炎症因子 TNF- α 对 SCAP 增殖及多向分化潜能的影响,为研究炎症环境下 SCAP 生物学特性的改变提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 胎牛血清、 α -MEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、青霉素链霉素溶液、0.25%胰蛋白酶、谷氨酰胺(Hyclone 公司,美国),I 型胶原酶(Worthington 公司,美国),TNF- α (Peprotech 公司,美国),维生素 C、B-甘油磷酸钠、地塞米松、吡喹酮、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBXM)、茜素红粉剂(Sigma 公司,美国),基质细胞抗原-1(STRO-1, Santa Cruz 公司,美国),兔抗大鼠一抗 CD90、CD146(北京博奥森生物技术有限公司,中国),油红 O 染液(南京建成生物工程研究所),荧光定量 PCR 试剂盒(Thermo 公司,美国),光学显微镜、倒置显微镜(莱卡公司,德国),37℃细胞培养孵箱(力康生物医疗有限公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司),酶标仪(Thermo 公司,美国),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国),Wistar 大鼠(新疆医科大学动物实验中心)。本研究通过新疆医科大学第一附属医院动物实验医学伦理委员会批准(批准号: IACUC20150423-01)。

1.2 方法

1.2.1 鼠 SCAP 的培养 健康雄性 Wistar 大鼠 2 只,分离根尖乳头组织,剪碎、消化至絮状,离心后接种,每 2~3 天换液,观察细胞至 80%~90%融合时,消化,按 1:3 常规传代培养,取 3~5 代细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞鉴定 免疫荧光法鉴定表面标志物 STRO-1、CD90、CD146 的表达。多向分化能力的鉴定:茜素红染色检测成骨能力;油红 O 检测成脂能力。

1.2.3 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 TNF- α 对 SCAP 增殖能力的影响 取第 3 代 SCAP,以 2×10^3 /孔密度接种于 96 孔板,设实验组(TNF- α 浓度为 5、10、20、50 ng/mL)和对照组(TNF- α 浓度为 0 ng/mL),每组 3 个复孔,分别培养 1、3、5、7 d,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 50 μ L,37℃ 孵育 4 h,加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO),测定各孔 490 nm 吸光度(A)值并记录。

1.2.4 检测成骨/成牙本质能力

1.2.4.1 茜素红染色 取第 3 代 SCAP,以 2×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板,设实验组和对照组,24 h 后更换含相应浓度 TNF- α 的成骨诱导液,3 周后茜素红染色,观察矿化结节的形成情况。

1.2.4.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测成骨相关基因的表达 取第 3 代 SCAP,以 2×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板,设实验组(TNF- α 浓度为 10 ng/mL)和对照组(TNF- α 浓度为 0 ng/mL),培养 24 h 后,更换含相应浓度 TNF- α 的成骨诱导液,分别培养 3、7、14 d,按步骤提取 RNA,根据逆转录试剂盒说明配成 20 μ L 体系合成 cDNA,反应条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min。目的基因骨钙蛋白(osteocalcin, OC)、牙本质基质蛋白-1(dentin matrix protein-1, DMP-1)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)由华大基因设计并合成(表 1)。按试剂盒说明书配成 25 μ L 体系进行实验,反应条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。每个目的基

因重复 3 管,同时设置 1 管阴性对照,结果根据使用倍比关系 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ 。

1.2.5 油红 O 检测 SCAP 成脂能力 取第 3 代 SCAP,分为实验组(TNF- α 浓度为 5、10、20、50 ng/mL)和对照组(TNF- α 浓度为 0 ng/mL),培养 24 h 更换为含相应浓度 TNF- α 的成脂诱导液 A,3 d 后更换含相应浓度 TNF- α 的成脂液 B 24 h,3 个循环后,油红 O 染色,观察脂滴形成情况并记录。

1.2.6 qRT-PCR 检测血管相关基因的表达 取第 3 代 SCAP,以 2×10^5 /孔的密度接种于 12 孔板,设实验组(TNF- α 浓度为 10 ng/mL)和对照组(TNF- α 浓度为 0 ng/mL),培养 24 h 后,更换含相应浓度 TNF- α 的成骨诱导液,分别培养 3、7、14 d,按步骤提取 RNA,根据逆转录试剂盒说明配成 20 μ L 体系合成 cDNA,反应条件:42℃ 60 min,70℃ 5 min。目的基因血管生成素 1(angiogenin 1)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor a, VEGFA)、血小板内皮细胞黏附分子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)及内参 GAPDH 由华大基因设计并合成(表 1)。按试剂盒说明书配成 25 μ L 体系进行实验,反应条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环。每个目的基因重复 3 管,同时设置 1 管阴性对照,结果根据使用倍比关系 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ 。

表 1 qRT-PCR 目的基因的引物序列		
目的基因	引物序列(5'-3')	序列长度(bp)
OC	上游:GGGCTCCAAGTCCATTGTT	133
	下游:GCATTCTGCCTCTCTGACCT	
DSPP	上游:TATCCAAACCAGCACCTTCC	117
	下游:GAACACACGGGAGTGGAGTT	
DMP-1	上游:GAAAGGACTCAGGGATGGTG	125
	下游:GATGACAAGGAGGAGGAGGA	
ANGPT1	上游:TGGAGATAGGAACCAGCCTCT	113
	下游:TGGATTTCGAACGGGATGT	
VEGFA	上游:GTTGCTCCTTCACTCCCTCA	121
	下游:CCTGTCCCTCTCTCTGTTCG	
PECAM-1	上游:GTGGAAGTGGGACAAAGAA	123
	下游:TGGCAGCGAAACACTAACAG	

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,MTT 结果采用单因素方差分析,实时定量 PCR 结果采用独立样本 t 检验,采用 Dunnett 和 LSD- t 进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SCAP 形态 原代培养 3~5 d 后,可见细胞从组织块边缘呈放射状生长,细胞形态多为短梭形,轮廓清楚,大小基本一致,生长状况良好,可稳定传代,约 3~5 d 可达到 80%~90%汇合,见图 1。

2.2 细胞鉴定 SCAP 抗 STRO-1 呈弱阳性表达,抗 CD90、CD146 呈阳性表达。结果提示符合间充质干细胞来源的特征。茜素红染色阳性,证实 SCAP 具有成骨/成牙本质向分化的潜能;油红 O 染色阳性,倒置显微镜下可见胞质内有脂滴形成,证实 SCAP 具有成脂向分化的潜能。

2.3 MTT 检测 SCAP 增殖能力 与对照组相比,各浓度组均能明显促进 SCAP 增殖,且差异有统计学意义($P<0.05$),其

中 10 ng/mL TNF-α 的促进作用最为明显,见图 2。

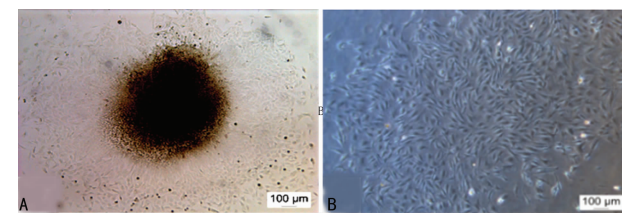


图 1 SCAP 生长情况

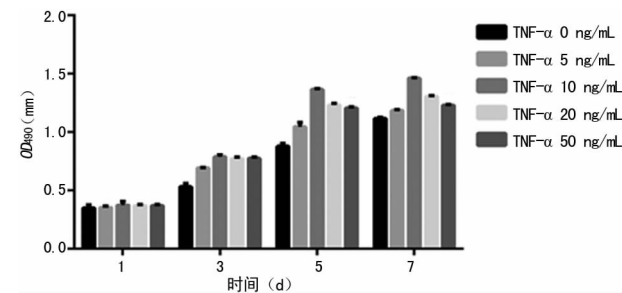


图 2 不同浓度 TNF-α 刺激下 SCAP 的增殖能力

2.4 SCAP 成骨/成牙本质能力的检测

2.4.1 茜素红染色结果 对照组染色后形成矿化结节较大、染色较深;与对照组相比,随着 TNF-α 浓度的增加,形成的矿化结节逐渐变小,数量也逐渐减少,见图 3。

2.4.2 qRT-PCR 结果 3、7 d 时,与对照组相比,实验组 OC、DSPP、DMP-1 表达量降低。其中,3 d 时两组 OC、DMP-1 比较差异有统计学意义($P<0.05$);7 d 时 DMP-1 比较差异有统计学意义($P<0.05$);14 d 时,实验组 OC、DMP-1 表达量明显降低($P<0.05$),见表 2。

2.5 油红 O 染色结果 对照组染色后可见胞质内大量红色大小不等的脂滴形成;与对照组相比,实验组随着 TNF-α 浓度

的增加,脂滴形成数量逐渐减少,见图 4。

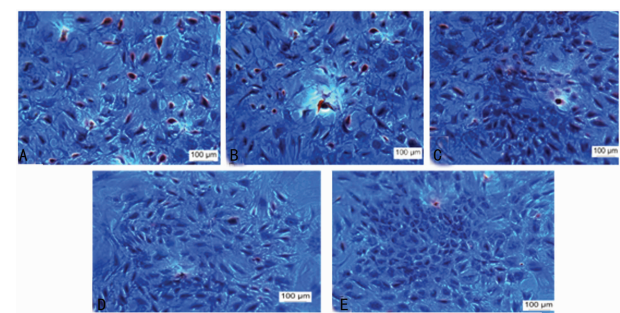


图 3 SCAP 经含不同浓度 TNF-α 的成骨诱导液诱导 3 周染色结果(×100)

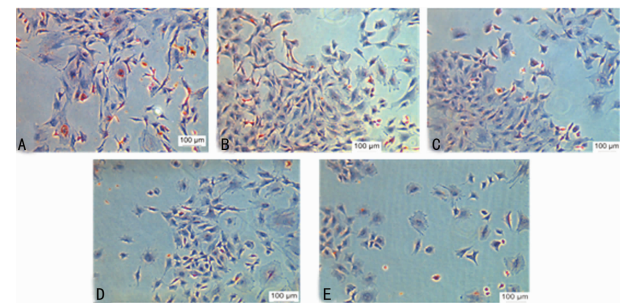


图 4 SCAP 经含不同浓度 TNF-α 的成脂诱导液诱导后的油红 O 染色结果(×100)

2.6 SCAP 成血管相关基因的表达情况 3、7 d 时,与对照组相比,实验组 ANGPT1、VEGFA、PECAM-1 表达量明显降低,且比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 TNF-α 刺激下 SCAP 成骨/成牙本质相关基因表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	3 d			7 d			14 d		
		DSPP	OC	DMP-1	DSPP	OC	DMP-1	DSPP	OC	DMP-1
对照组	3	1.00±0.37	1.00±0.12	1.00±0.10	1.00±0.33	1.00±0.30	1.00±0.07	1.00±0.59	1.00±0.38	1.00±0.33
实验组	3	0.27±0.02	0.53±0.25	0.48±0.20	0.67±0.08	0.60±0.17	0.53±0.21	1.75±0.75	0.08±0.00	0.18±0.02
t		2.928	2.953	4.057	1.180	2.157	3.046	−1.131	3.858	4.515
P		0.208	0.042	0.015	0.303	0.097	0.038	0.321	0.018	0.011

表 3 TNF-α 刺激下 SCAP 血管相关基因表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	3 d			7 d		
		ANGPT1	VEGFA	PECAM-1	ANGPT1	VEGFA	PECAM-1
对照组	3	1.00±0.76	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.11	1.00±0.20
实验组	3	0.55±0.12	0.47±0.19	0.39±0.18	0.67±0.05	0.54±0.04	0.48±0.09
t		5.660	4.326	5.454	5.230	6.464	4.240
P		0.005	0.012	0.005	0.006	0.003	0.013

3 讨 论

临床研究表明,发生牙髓炎及根尖周炎的年轻恒牙经过彻底地清理和消毒后根尖仍能继续发育成形^[5],并认为在此过程中 SCAP 可能发挥了关键的作用。随着研究的深入,学者们发现 SCAP 在介导牙本质再生及牙根发育过程中均发挥着极其重要的作用^[6-7]。但牙髓炎及根尖周炎是一种复杂的炎症反

应,当年轻恒牙发生牙髓炎及根尖周炎时,SCAP 会暴露于炎性环境中,其中包含以 TNF-α 为主的多种炎性因子,且研究表明炎性因子的刺激会改变干细胞的生物学特性,影响其增殖及分化能力^[8-9],故明确炎性因子对 SCAP 增殖及多向分化能力的影响对牙髓牙本质复合体再生及根尖的持续发育成形有着不可忽视的作用。

Yang 等^[10]的研究也发现 TNF- α 可促进根尖乳头细胞增殖能力。刘彩奇等^[11]研究发现 10 ng/mL TNF- α 可促进 SCAP 的增殖,提高克隆形成率。于莉等^[12]研究也表明 10 ng/mL TNF- α 促进 SCAP 增殖作用最明显。本研究结果与以上研究基本一致,但同时发现随着 TNF- α 浓度的增加,促进 SCAP 增殖的作用并不会加强。这可能表明炎性因子 TNF- α 对 SCAP 的增殖作用具有浓度的依赖性,高浓度并不能增加促进增殖的作用。

TNF- α 是 1975 年由 Cors Wells 发现的一种内毒素诱导的糖蛋白,到目前为止,研究者们发现 TNF- α 通常在健康的牙髓和根尖周组织中检测不到,而发生龋病、牙髓炎及根尖周炎时,牙髓组织和根尖周组织中炎性因子表达增加,其中 TNF- α 水平最高^[13-15],这表明 TNF- α 在牙髓炎症及根尖周炎症的发生、发展过程中发挥了重要作用。也有学者研究表明 TNF- α 会抑制 SCAP 的成骨/成牙本质的能力^[7-8]。本研究结果也显示 TNF- α 可抑制 SCAP 矿化结节的形成;抑制成骨、血管相关基因的表达;同时抑制 SCAP 成脂能力。本研究为牙髓牙本质复合体的再生及牙根继续发育提供一定的实验基础。

本研究采用酶消化法分离培养鼠 SCAP,通过不同浓度的 TNF- α 对 SCAP 进行干预,结果表明 TNF- α 可促进 SCAP 的增殖能力,但同时会抑制其多向分化能力,为进一步研究在炎症微环境中 SCAP 生物学特性的改变及牙髓牙本质复合体再生提供了实验基础,也为临床治疗根尖周组织病变的提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine[J]. PLoS One, 2006, 1: e79.

[2] Jung IY, Kim ES, Lee CY, et al. Continued development of the root separated from the main root[J]. J Endod, 2011, 37(5): 711-714.

[3] Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on pulp fibroblast mediated collagen degradation[J]. J Endod, 2006, 32(9): 853-861.

[4] Hua P, Liu LB, Liu JL, et al. Inhibition of apoptosis by knockdown of caspase-3 with siRNA in rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Exp Biol Med, 2013, 238(9):

991-998.

[5] Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, et al. Challenges in regenerative endodontics: a case series[J]. J Endod, 2010, 36(3): 536-541.

[6] 杨杰, 赵玉鸣, 王文君, 等. 犬根尖牙乳头干细胞的分离培养和生物学特性[J]. 北京大学学报, 2012, 44(6): 921-926.

[7] 于莉, 李淑慧, 周春梅, 等. 根尖乳头干细胞向牙髓牙本质复合体分化能力的实验研究[J]. 临床口腔医学杂志, 2016, 32(1): 26-30.

[8] 张欣然, 刘翠, 朱彪, 等. 肿瘤坏死因子- α 诱导骨髓间充质干细胞凋亡作用的研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(7): 391-395.

[9] Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, et al. Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by aggregatibacter actinomycetemcomitans in interleukin-1 receptor antagonist knockout mice[J]. Infect Immun, 2014, 82(5): 1904-1913.

[10] Yang H, Ma L, Han X, et al. The Effects of tumor necrosis factor- α on mineralization of human dental apical papilla cells[J]. J Endod, 2012, 38(7): 960-964.

[11] 刘彩奇, 陈柯, 黄义彬, 等. TNF- α 对人根尖乳头干细胞增殖及分化能力的影响[J]. 口腔医学研究, 2014, 30(5): 392-395.

[12] 于莉, 李淑慧, 袁萍, 等. TNF- α 对根尖乳头干细胞体外增殖及成牙成骨向分化能力的影响[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(4): 343-346.

[13] Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, et al. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps[J]. Arch Med Res, 2002, 33(5): 482-484.

[14] Gumus P, Nizam N, Lappin DF, et al. Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor-alpha in patients with periodontitis [J]. J Periodontol, 2014, 85(2): 270-280.

[15] 黄海云. TNF- α 对牙周膜干细胞和骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化及骨创伤修复影响的研究[D]. 山东: 山东大学, 2012.

(收稿日期: 2016-11-20 修回日期: 2017-01-08)

(上接第 1873 页)

响因子已超过 6 分, 位居综合医学期刊全球排名前 7 位。此外, 诸多供临床医生使用的循证资料库包括 Clinical Evidence(<http://www.clinicalevidence.com>), UpToDate (<http://www.uptodate.com>), Pubmed Clinical queries (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/clinical>) 等^[6]。

参考文献

[1] Djulbegovic B, Guyatt GH. Progress in evidence-based medicine: a quarter century on[J]. Lancet, 2017, 390(10166): 31592-31596.

[2] Hecht L, Buhse S, Meyer G. Effectiveness of training in evidence-based medicine skills for healthcare professionals: a systematic review[J]. BMC Med Educ, 2016(16): 103.

[3] Sheridan DJ, Julian DG. Achievements and limitations of

evidence-based medicine[J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(2): 204-213.

[4] Kelly MP, Heath I, Howick J, et al. The importance of values in evidence-based medicine[J]. BMC Med Ethics, 2015, 16(1): 69.

[5] Argyriou C, Georgiadis GS, Georgakarakos EI, et al. Applying evidence-based medicine in actual clinical practice: can we bridge the gap? A review of the Literature[J]. Hellenic J Cardiol, 2015, 56(5): 373-378.

[6] Hung BT, Long NP, Hung P, et al. Research trends in evidence-based medicine: a joinpoint regression analysis of more than 50 years of publication data[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0121054.

(收稿日期: 2017-01-18 修回日期: 2017-03-06)