



中国 南昌

NANCHANG CHINA

2018 SOB·NAN CHANG

2018全国口腔生物医学学术年会

2018 CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

论文汇编

DISSERTATION COMPILE

2018.10.12-14



2018全国口腔生物医学学术年会
CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

目 录

一 特邀报告.....	1
二 专题发言.....	7
三 基础研究论文.....	18
四 应用研究论文.....	253

一 特邀报告

自主式种植牙机器人的研制及临床应用

赵铤民 白石柱等

空军军医大学口腔医院；军事口腔医学国家重点实验室

摘要：

为解决目前口腔种植手术主要依赖医生个人技术经验，种植医生培训困难，周期长；口腔空间狭小、难以直视，不利操作；多牙种植时植入位置不精确，难以实现即刻修复等问题，本项目研发了自主式种植机器人，综合应用视觉传感、三维可视化和微型模块化机器人等技术实现了种植牙的自主式机器人植入。

通过研究，开发出基于 CT 断层扫描数据的三维可视化种植术前规划系统，该系统同时能够实现术中实时导航显示与机器人运动控制；搭建起由小型模块化口腔种植机器人平台、基于双目视觉的视觉跟踪平台、空间映射模型、多信息融合的系统控制平台组成的种植手术实施系统，实现了实时的医学影像手术导航；开发出基于放射托盘转换的坐标空间映射系统，实现了机器人的手眼标定；配备了完善的机器人种植手术安全策略。通过大量的模型和动物实验，验证了机器人的稳定性及种植精度，初步建立了口腔种植机器人手术临床诊疗流程，目前已用于临床，完成5例病例，均获得了满意的手术效果；种植精度误差小于0.3mm，并与3D打印技术结合，实现了种植术后的即时牙冠修复。

所开发的口腔种植机器人系统能够实现手术区域解剖结构的判读重现、术前种植精确设计、种植手术自动精准实施、手术实时导航校准和即刻种植修复等功能，达到了精准、高效、微创、舒适的手术要求，为机器人在口腔领域中的应用开辟了新的途径。

早期胚胎发育与体细胞重编程的表观调控机制

高绍荣教授

同济大学生命科学与技术学院

不同表观遗传修饰的重编程在配子受精形成具有全能性胚胎和早期发育过程中,以及人为将分化的体细胞重编程为全能性胚胎或多能性干细胞过程中发挥重要作用,我们近期发展了微量细胞免疫共沉淀结合测序技术(ChIP-Seq),对早期胚胎发育过程中重要组蛋白修饰重编程机制进行了深入研究,同时我们也对体细胞核移植胚胎发育过程中组蛋白修饰以及DNA甲基化修饰重编程机制进行了深入探讨。

Epigenetic Regulation in Mesenchymal Stem Cell Immune Therapies

施松涛, DMD,PhD

Department of oral molecular biology, school of dentistry, university of Pennsylvania

Abstract:

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent postnatal stem cells capable of regenerating mineralized and non-mineralized tissues and interplaying with various immune cells. MSCs are widely used to treat a variety of autoimmune diseases, such as graft versus host disease, diabetes, rheumatoid arthritis, autoimmune encephalomyelitis, inflammatory bowel disease, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. However, detailed mechanism by which MSC transplantation (MSCT) offers effective immune therapies is not fully understood. Our recent studies showed that MSCT utilizes multiple mechanisms to interplay with the recipient cellular components to ameliorate disease phenotypes. MSCT is capable of inducing recipient activated T cell apoptosis via Fas/Fas ligand pathway to trigger macrophage to take debris of apoptotic T cells, resulting in an elevated TGFbeta level as well as immune tolerance in systemic sclerosis. In addition, exosomes secreted by donor MSCs during MSCT provide functional cell components and miRNA, thereby rescuing recipient impaired MSCs or immune cells via a reuse mechanism to regulate DNA methylation and histone modification. Moreover, we found that MSCT is able to directly transfer miRNA to the recipient stem cells to rescue impaired stem cell function. Our findings demonstrate that MSCT use multiple epigenetic regulation to rescue recipient MSC function and ameliorate disease phenotypes.

Interaction between mesenchymal stem cells and transit amplifying cells regulates tissue homeostasis

Junjun Jing and Yang Chai

Center for Craniofacial Molecular Biology, University of Southern California

The regulation of tissue homeostasis by adult stem cells is a fundamental issue in stem cell biology. Once stem cells leave their niche, they become committed to a specific lineage and differentiate into specific cell types. Recent studies suggest that the interaction between stem cells and their progeny is critical for tissue homeostasis and regeneration. In many tissues and organs, stem cells give rise to transit amplifying cells (TACs), an undifferentiated progenitor population, in the transition between stem cells and differentiated cells. However, the molecular signaling mechanism regulating the transition from mesenchymal stem cells (MSCs) to TACs remains unknown. TACs function as transient but indispensable integrators of stem cell niche component. In addition, regulatory feedback from TACs may instruct stem cells to replenish downstream lineages and coordinate the self-renewal of stem cells during the tissue homeostasis and regeneration of adult organs. To date, however, these studies have been limited to ectodermal organs, and it remains unknown how MSCs interact with TACs to maintain tissue homeostasis. Here, using adult mouse incisor as a model, we have uncovered novel signaling network in regulating the interaction between MSCs and TACs. We show that Wnt and IGF signaling play crucial roles in this process. This knowledge will contribute to our understanding of the regulatory mechanism in stem cell-mediated tissue homeostasis and may also contribute to

our effort in tissue regeneration.

人牙髓间充质干细胞注射液新药研发及应用

王松灵

首都医科大学附属北京口腔医院

牙再生及口腔组织功能重建北京市重点实验室

生理状态下成体间充质干细胞具有良好的增殖分化及细胞干性，具有良好的免疫调节能力；炎症状态下的干细胞生物学及免疫学功能均受累，尤其免疫调节能力明显低下。成体间充质干细胞种类较多，牙源性干细胞种类也有不少。用局部微创注射异体牙髓干细胞或维生素C诱导的异体干细胞膜片均能明显治疗牙周炎及修复再生牙周炎致牙周骨缺损。异体牙源干细胞通过分泌前列腺素E2 (PGE2)调节受体T淋巴细胞，并导致T细胞无能而免疫无应答；通过分泌程序死亡因子1 (PD-1) 以细胞接触及分泌因子等方式来调节受体B细胞。牙源性干细胞再生牙周的效果比非牙源性干细胞好；牙髓干细胞保持细胞的干性及抗凋亡衰老能力明显优于其他干细胞。目前国家政策明确干细胞临床研究必须在批准的干细胞临床实验基地，干细胞需通过新药申请获批后才可以广泛应用。我们按照新药制剂制备牙髓干细胞注射液，经过国家生检院等部门制剂质量及安全评估明确合格后，对22例慢性牙周炎进行异体牙髓干细胞注射治疗，临床研究表明有明显牙周组织再生，无副作用。通过建立牙源干细胞库、牙髓干细胞注射液新药制作及转化研究有望应用到临床，成为慢性牙周炎等疾病新的有效治疗方法。

二 专题发言

ALPL可以影响间充质干细胞功能并导致牙骨病变

金岩 刘文佳 李蓓 轩昆 施松涛

第四军医大学口腔医院, 第四军医大学组织工程研发中心

低碱性磷酸酯酶症 (hypophosphatasia, HPP) 是口腔较为常见的一类常染色体遗传性疾病, 由于肝/骨/肾碱性磷酸酯酶基因 (ALPL) 突变导致其编码的组织非特异性碱性磷酸酶 (TNSALP) 活性降低所致。常表现出乳、恒牙早脱以及骨量下降、骨质疏松等骨稳态紊乱症状。

我们的工作首次证明ALPL突变可以导致MSCs功能异常, 并由此引起了由ALPL突变所致HPP患者的骨量下降及牙早脱。我们的系列研究首次明确了: ①MSCs功能异常, 特别是成骨分化能力下降, 是导致HPP患者骨量下降及牙早脱的重要原因; ②ALPL不仅仅是一个成骨标志基因, 它能直接调控MSCs的功能, 可以影响MSCs的成骨/成脂分化平衡; ③证明了被认为是成骨分化标志基因的ALPL, 能够作为上游调控因子调控Wnt通路从而影响MSCs的分化功能; ④首次揭示了ALPL通过调节ATP-介导的AMPK α 维持MSC的干性、预防骨衰老。

我们的研究进一步揭示了HPP来源的MSCs免疫调节能力的异常可能与HPP炎性病变的发生相关。MSCs的免疫调节能力与ALPL突变所致炎性病变相关、ALPL突变影响了MSCs免疫调节的分子机制。我们的研究结果不仅揭示了HPP炎性病变的发病机制, 并为其治疗提供了新的靶点和策略, 而且为探索内源性MSCs的免疫调节能力与炎性疾病发生的相关性以及细胞的衰老提供了新的理论依据。

口腔种植中的生物学问题

王佐林

同济大学附属口腔医院

牙种植技术已成为牙缺失患者常规修复治疗手段之一，为人类的第三副牙。长期缺牙造成牙槽骨水平和垂直骨量的不足、及伴有软组织量尤其附着龈不足，是种植修复中常遇到的临床问题。国内外已有研究主要侧重于不同材料对拔牙位点保存的效果及造成牙槽骨吸收的影响因素等。

我们在牙槽骨萎缩相关机制、附着龈增量的方法及机制、上颌窦底成骨机制等方面取得一定的研究进展。包括发现上颌窦内成骨中干细胞发挥重要作用、不同附着龈增量方法的效果，及长期失牙后破骨细胞、干细胞外泌体在牙槽骨吸收中的作用机制等。

然而，失牙后骨吸收、上颌窦底成骨等确切机制仍具有很大争议。因此，研究牙槽骨萎缩的精确机制，如何通过阻断失牙后牙槽骨萎缩的进程、寻找最有效可行垂直骨增量的材料及寻找最有效可行方法增加附着龈质和量仍为未来的研究方向。

口腔颌面部组织再生与功能修复新策略

蒋欣泉教授

上海交通大学医学院附属第九人民医院

摘要

针对由各种原因造成的口腔颌面部组织缺损的临床难题，课题组凝练出诱导性、血管化、个性化等关键问题，从种子细胞/生物活性因子投递、生物材料结构/成分改性及个性化组织再生入手，以口腔颌面骨组织再生与功能修复的临床转化为最终目标开展研究。本次演讲将重点介绍一种全新的通过磁控精确制备的复合生长因子的细胞膜片，实现了无支架材料的种子细胞投递并发挥了生长因子诱导调控细胞分化作用，这一新策略展现出在组织再生中极高的应用前景。课题组也通过改良3D打印技术，结合前期工作基础及仿生学理念，制备出具有中空管道结构的3D打印生物陶瓷支架材料，应用于血管化骨再生研究中，也取得良好效果。综上，希望这些由口腔医学、再生医学和材料学等学科的相互交叉融合形成的新策略，能尽早解决口腔颌面部组织缺损的再生治疗难题，早日惠及广大患者。

基于外显子组测序的舌鳞状细胞癌相关基因筛选及功能鉴定

李铁军教授

北京大学口腔医院

摘要:

本研究采用全外显子组测序分析了82例舌鳞癌及对应的癌旁组织样本，共发现5139个SNVs和107个INDELS。除检出7个已知与舌鳞癌相关的显著突变基因外，还发现6个新的显著突变基因(GNAQ, PRG4, RP1, ZNF16, NBEA 和 PTPRC)，我们首次在人类实体肿瘤中验证了ZNF16的表达和功能，证实ZNF16可促进舌鳞癌细胞的恶性表型，其点突变 (p.R452W) 可进一步促进该效应。我们还在舌鳞癌中检出28个染色体区域拷贝数的显著扩增和4个区域拷贝数的显著减少，从一个拷贝数减少的染色体位点，筛选出一个从未有功能报道的新microRNA-MIR585-5p，我们证实MIR585-5p通过调控靶基因SOX9发挥抑癌作用。对所有显著突变基因进行信号通路富集分析，发现这些基因主要集中于RTK-Ras, cell cycle, Wnt, Notch 和AKT信号通路。本研究拓展了我们对口腔癌基因变异谱的认识，为具有病因和部位特异性的舌鳞癌的精准诊治提供了新的潜在靶标。

季铵盐抗菌剂在生物医学领域的应用

陈吉华教授

第四军医大学

微生物感染影响着全世界的人类。季铵盐类化合物同时具有抗细菌、抗真菌、抗病毒和抗基质金属蛋白酶和聚合功能，利用其对生物材料进行改性可以在不影响材料本身理化性能的同时赋予其稳定的生物活性，目前被广泛应用于研制功能性骨科材料，缝合线，敷料和牙科材料。然而，最近的研究发现，季铵盐型抗菌单体具有细胞毒性，因此，探究其细胞毒性机制并在此基础上寻找可能的细胞保护措施对改善抗菌树脂基材料的生物安全性、拓展其临床应用具有重大的意义。

携带紫杉醇的维甲酸纳米粒靶向杀伤肿瘤干细胞研究

孙宏晨教授^{[1][2]}, 孙宾^[2]

1.中国医科大学口腔医学院; 2.吉林大学口腔医学院

肿瘤组织内癌细胞具有异质性, 其中的肿瘤干细胞具有不断增生、多向分化及耐受放化疗的能力, 是肿瘤复发、转移的原动力。因此, 针对肿瘤细胞异质性、联合用药才能受到良好的抗癌效果, 将肿瘤干细胞诱导分化继而利用化疗药物杀死的策略具有良好的前景。维甲酸对肿瘤干细胞具有抑制增生、诱导分化的作用, 为此, 我们将维甲酸分子加以改造, 使其成为可以载药的靶向纳米粒子, 并且保持了原来的功能活性, 对肿瘤细胞内高含量的还原型谷胱甘肽 (GSH) 敏感, 与GSH 相遇即刻发生解离, 发挥靶向作用。体外实验表明纳米粒子对肿瘤干细胞的增生、迁移及耐药能力均具有明显的抑制作用, 可以降低干细胞标志物 *Oct4* 和 *Sox2* 的表达, 诱导肿瘤干细胞的分化。表明所制备的纳米粒子保留了维甲酸的功能活性, 是一种具有抑制肿瘤干细胞诱导其分化的靶向纳米载体。进一步合成了携带紫杉醇的维甲酸纳米粒子, 该纳米粒子平均粒径为 13.86nm, 平均Zeta为22.8mv; 外部是亲水的, 内部疏水核心携带紫杉醇, 最大载药率为16.7%; 在GSH存在的情况下, 即刻解离释放紫杉醇; 在没有GSH的情况下比较稳定。体内外实验证明这种携带紫杉醇的纳米粒子能够发挥协同作用, 具有最强的抑瘤效果, 而且组织器官毒性较小。

人工微环境调控细胞分化

邓旭亮主任

北京大学口腔医院

摘要:

细胞微环境中除了生长因子等化学因素外，物理因素的影响不容忽视。本课题组新构建智能响应性纳米阵列，赋予细胞纳米尺度动态刺激，与细胞感受器纳米运动尺度匹配，激活包括细胞粘附、细胞骨架改建与YAP/RUNX2分子信号在内的细胞机械感受与转导系统，通过精密控制纳米刺激动态节律，实现BMSCs成骨分化的智能调控。提出仿生电位设计理念，采用激光外延生长技术从原子尺度精确控制纳米涂层铁电极化状态，获得与内源性电场匹配的、稳定的电学特性，与缺损骨壁表面电势形成内建电场，显著提升种植体骨整合的速度与质量。构建仿生电位纳米复合膜材料体系，恢复骨缺损的电学微环境，通过溶液浇铸法制备具有仿生电位的纳米复合膜材料，激发体内成骨相关细胞的迁移与分化，促进骨沉积，加快骨修复进程。

RNA可变剪接调控与口腔疾病

贾荣教授

武汉大学口腔医学院 湖北省口腔基础医学重点实验室—省部共建国家重点实验室培育
基地暨口腔生物医学教育部重点实验室（武汉大学）

人类的基因转录后产生的前体mRNA包含内含子和外显子。前体mRNA经过剪接体（spliceosome）的加工去除内含子后成为可以编码蛋白的成熟的mRNA。但前体mRNA的剪接并不总是一成不变的，有些外显子和内含子的剪接位点可变，称为RNA可变剪接。RNA可变剪接是真核细胞调控基因表达的重要方式。一个基因转录后产生的前体mRNA经可变剪接后可以产生2个至上千个不同的成熟的mRNA异构体，并可编码不同的蛋白异构体，从而明显增加了基因组所编码蛋白的多样性。90%以上的人类基因都有RNA可变剪接。同时由于RNA可变剪接经常会改变mRNA所编码的蛋白序列，并对蛋白的功能有明显的影 响，甚至产生功能相反的蛋白。所以细胞对RNA可变剪接有着严谨的调控，以维护细胞生命活动的稳定和可控。目前发现很多口腔疾病都与RNA可变剪接的调控异常有关。比如侵袭性牙周炎与 α 型甘油二酯激酶（diacylglycerol kinase α ）基因的可变剪接有关，口腔癌与CDK2的可变剪接有关。我们在2010年发现可变剪接调控因子SRSF3是原癌基因。针对RNA可变剪接与口腔癌及癌前病变的关系，我们又进行了一系列研究发现：SRSF3与口腔癌及癌前病变的发生发展有密切关系；SRSF3在癌细胞中高表达，其原因是SRSF3的自调控机制受到了破坏；利用反义寡核苷酸恢复SRSF3的自调控可以显著抑制SRSF3的表达和抑制癌细胞的生长；SRSF3参与多种癌相关信号通路的调控，促进多种癌相关基因的表达，包括SRSF1、SRSF5、HnRNP L和HPV病毒的癌基因E6和E7等。因此SRSF3可以作为口腔及癌前病变治疗的重要靶点。

微环境对间充质干细胞再生牙齿组织的影响及表观遗传调控机制

范志朋教授

首都医科大学

调控间充质干细胞功能是促进牙齿组织再生的关键。间充质干细胞功能调控是一个复杂的过程，研究显示在不同细胞因子、药物刺激、支架材料等因素的作用下，通过改变一条或多条信号通路可以将间充质干细胞调控向特定类型的细胞定向分化，但如何实现这个过程还有诸多问题没有解决。而在临床上牙齿组织缺损、缺失的病损多处于炎症、低氧、衰老等微环境条件下，这些临床特定微环境对间充质干细胞定向分化及再生牙齿组织功能的影响、调控机制及临床功能效果都不清楚，更加制约了今后的临床转化应用。因此，进一步从分子水平研究临床条件下牙齿组织再生所面临各种因素对间充质干细胞分化与再生功能的影响及调控机制，阐明宿主免疫防御等全身反应、局部微环境与牙齿组织再生过程的相互作用和机制，是我们今后研究所面临的挑战，将对牙齿组织再生的临床研究及应用有着极为重要的意义。

未来我们期望通过间充质干细胞功能表观遗传调控机制的研究，结合利用不同的策略用以精确地调控并强化间充质干细胞的分化功能等能力，充分调动间充质干细胞再生牙齿组织的潜能，为促进间充质干细胞介导的牙齿组织再生，推进临床转化应用提供依据和有效的方法手段。

细胞纤毛内转运蛋白与硬组织矿化

孙瑶教授

同济大学附属口腔医院

摘要:

初级纤毛 (primary cilia) 是位于细胞表面突起状的细胞器, 几乎存在于所有细胞表面, 是向细胞内传递细胞外的力学、化学和生物信号的关键细胞结构。初级纤毛发育异常对骨骼和牙齿发育及矿化产生重要影响。细胞纤毛转运蛋白 (Intraflagellar transport protein) 是细胞纤毛中一类负责转运关键调控信号的分子, 通过构成正向运输和逆向运输复合体而起作用, 实现对细胞功能的调节以及对组织器官发育的影响。其中, IFT140 (Intraflagellar transport protein 140) 是构成纤毛逆向运输蛋白复合体 (IFT-A) 的重要组分, 其缺乏会导致初级纤毛结构及功能异常, 引起严重的发育性疾病, 包括多囊肾, 骨骼发育异常 (如分叉肋骨, 骨骺端膨大) 以及牙齿发育异常等。我们通过建立IFT140相关的模式动物小鼠, 并建立相关发育和疾病模型, 系统探讨初级纤毛对于硬组织发育和矿化的影响。

三 基础研究论文

唾液腺腺样囊性癌中 *POLQ* 的表达定位及对 DNA 修复的影响

白晗^{1, 2}, 刘涵^{1, 2}, 张曦^{1, 2}, 杨茜^{1, 2}, 陆世龙^{3, 4*} & 肖晶^{1, 2*}

1. 大连医科大学口腔医学院口腔病理系
2. 大连市口腔基础研究重点实验室
3. 大连医科大学肿瘤干细胞研究院
4. 美国科罗拉多大学医学部耳鼻喉头颈外科

目的: 唾液腺腺样囊性癌 (SACC) 是一类发生在头颈部的缓慢生长的高恶性腺上皮来源肿瘤, 易沿神经侵袭, 且易复发、高转移, 目前缺乏有效的治疗措施。所以, 探讨 SACC 的发病机制, 寻找新的治疗靶点, 具有十分重要的意义。本课题组在前期研究中发现 PTEN 在唾液腺肿瘤发生发展中起着关键性作用。所以, 为深入探讨 PTEN 在 SACC 发生发展过程中的潜在作用机制, 我们已通过基因表达谱芯片技术筛选出 PTEN 的新候选靶标 *POLQ*。本研究通过探讨 SACC 组织中 *POLQ* 表达定位及其与 PTEN 表达的相关性和与患者预后的相关性, 以及依托泊甙及下调 *POLQ* 联用对 SACC83 细胞的影响, 为传统抗癌药联合小分子抑制剂疗法提供理论基础。

方法: 利用免疫组化方法检测 *POLQ* 在正常唾液腺和 SACC 组织中的表达分布, 应用 Spearman 等级相关分析研究 *POLQ* 表达与 PTEN 表达的相关性, 并应用 Kaplan-Meier 生存分析研究 *POLQ* 与患者预后的关系。设计 4 条 *POLQ* 干扰质粒并转染 SACC83 细胞, 利用 Real-Time PCR 及 Western blotting 检测 *POLQ* mRNA 和蛋白的表达水平。用 Western blotting 及免疫荧光染色检测 γ H2AX 的表达水平; 利用 Real-Time PCR 检测 DNA 修复相关基因 mRNA 的表达水平。

结果: 在正常唾液腺组织中, *POLQ* 仅表达在导管上皮细胞中, 呈弱的胞浆表达, PTEN 高表达于导管上皮细胞及腺泡周围肌上皮细胞; *POLQ* 在 PTEN 表达的筛状型及管状型 SACC 组织中, 阳性率分别为 6.67% 和 20%, 且均为弱的胞质表达; 在恶性程度相对较高的实性型 SACC 组织中, PTEN 几乎不表达, *POLQ* 阳性率可达 60%, 且均为较强的胞质胞核表达; *POLQ* 与 PTEN 在 SACC 组织中的表达呈负相关性。*POLQ* 高表达的 SACC 患者, 其生存率明显低于其他组患者。shRNA-4848 组 *POLQ* 在 mRNA 及蛋白水平上表达均降低近 70%-80%。450 μ M 依托泊甙作用的 SACC83 细胞中 γ H2AX 表达水平最高; 与依托泊甙和下调 *POLQ* 各自单用组相比, 依托泊甙与下调 *POLQ* 联用组 SACC83 细胞 γ H2AX 表达水平最高、DNA 修复相关基因 H2AFX、RAD51、MSH2、ATR、ATM 及 BRCA1 在 mRNA 水平上表达降低。

结论: *POLQ* 在实性型 SACC 组织中显著高表达, 并与 PTEN 在不同病理分型的 SACC 组织中表达呈负相关性; 高表达 *POLQ* 的 SACC 患者可能存在着较差的预后。此外, 下调 *POLQ* 可促进依托泊甙对 SACC83 细胞的 DNA 损伤作用, 为临床 *POLQ* 的靶向小分子抑制剂与依托泊甙协同治疗 SACC 提供理论依据。

羊膜间充质干细胞中 lncRNA H19 对骨髓间充质干细胞成骨分化影响初探

卞一峰

南京医科大学

实验目的: 目前临床上主要采取各种骨增量技术来修复牙种植术中遇到的术区骨量不足的问题, 主要包括: 自体骨移植、引导骨再生技术、人工骨移植、异体或异种骨移植, 上颌窦底提升术、牵张成骨术等。由于这些骨增量技术存在手术创伤大, 获取骨量有限, 新骨生成率较低, 移植后吸收, 可能有免疫排斥反应及存在伦理问题等缺陷。因此必须寻找更为安全、有效、快速、微创的骨增量方法来解决种植区骨量不足的临床问题。随着组织工程学的发展, 组织工程化骨在牙种植领域的研究取得了令人鼓舞的成就, 可望成为更为安全有效的牙种植骨增量方法。本课题拟运用体外三维共培养体系, 从分子、细胞、大鼠颌骨缺损部位移植三个层面探讨 H19 在 HAMSCs 中对于成骨成血管的影响。通过对血管新生及成骨相关指标的检测, 以进一步明确 HAMSCs 通过 H19 促进种植体周围骨再生的作用机制。

材料与方法: 实验组通过 transwell 在 6 孔板内构建 HAMSC 与 HBMSC 的共培养体系。采用慢病毒构建 H19 低表达和过表达的 HAMSC, 探讨不同分组对 HBMSC 成骨影响。课题组对于成骨早起, 晚期指标进行检测。包括: 碱性磷酸酶 (ALP) 活力测试, 碱性磷酸酶染色。成骨诱导后体外矿化团块的茜素红染色。同时对于成骨诱导后细胞进行 western-blot, RT-pcr 等实验检测成骨指标, runx2, ocn, opn, alp, bsp, collagen1 等等。同时我们建立 SD 大鼠下颌骨缺损模型, 将 H19 过表达, 低表达, 以及正常 HAMSC 分别与 Bio-Oss 骨粉混合植入骨缺损部位。后期通过 Micro-CT, 免疫组化切片染色等方法对新生骨, 血管进行比较分析。

结果: 较正常 HAMSC-MBMSC 共培养体系, H19 过表达组 HBMSC 其在 ALP 活力测试, ALP 染色, 成骨诱导后体外矿化团块的茜素红染色表现出较明显的成骨增强。同时对于 runx2, ocn, opn, alp, bsp, collagen1 等指标的 western-blot, RT-pcr 的检测发现, 过表达组要明显高于正常组与敲低组。我们之前运用 HAMSCs 与 Bio-Oss 骨粉混合修复大鼠下颌骨骨缺损动物实验研究发现, 较单纯使用 HAMSC-Bio-Oss 骨粉, H19 过表达组 HAMSCs, 在植骨后的早期 (4 周) 即出现了较明显的血管新生, 至植骨后 12 周时, 其新生骨量明显多于单纯使用 Bio-Oss 骨粉组。我们通过序列荧光标记发现, 加入 HAMSCs 后, 能更好地促进新生骨组织的矿化。

结论: 本研究的顺利进行, 将对 lncRNA 在干细胞增殖、分化中作用机制的研究具有重要科学意义, 同时将有助于揭示 HAMSCs 作为种子细胞促进血管新生增强新骨形成的作用机制, 对组织工程治疗和预防种植骨缺损具有重要的科学意义和实际应用价值, 为更好地恢复种植体周围骨缺损提供理论和实验依据。

抗坏血酸碳点复合 miR-2861 促骨再生的研究

布文免¹, 张恺³, 王梓霖¹, 孙茂蕾¹, 刘莉莉¹, 陈雨蒙¹, 孙宏晨^{1,2*}

1 吉林大学口腔医学院 2 中国医科大学口腔医学院 3 吉林大学化学学院

目的: 确定抗坏血酸碳点 (Carbon dots, CD) 跨骨髓基质细胞 (Bone marrow stromal cells, BMSCs) 的跨膜途径及细胞内分布, 证实 CD 运载 miR-2861 可以促进骨再生。

材料与方法: 以抗坏血酸与聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI) 为原料, 利用微波法合成 CD 粒子。采用高分辨透射电镜观察粒子形貌, 荧光光谱仪检测荧光性能, 红外光谱仪检测 CD 表面官能基团。利用荧光显微镜观察 CD 的细胞成像作用, 小动物活体成像检测 CD 的体内成像。通过使用不同跨膜途径抑制剂观察对细胞摄取 CD 的影响, 使用透射电镜明确碳点在细胞内的分布。茜素红染色检测 CD 促骨分化作用, 为 western blot 检测内质网应激相关蛋白的表达。琼脂糖凝胶电泳检测 CD 与 miR-2861 的结合能力。利用大鼠胫骨内注射与大鼠颅骨缺损模型, 检测 CD@miR-2861 复合物促骨再生作用。

结果: CD 尺寸为 1.5-4nm, 尺寸均一, 分散性良好, 具有良好的荧光性质, 表面主要有-OH, -NH₂ 等官能团。CD 有良好的细胞成像作用, 在紫外光、蓝光和绿光激发下分别发射出蓝色、绿色和红色荧光; CD 在体内也有良好的成像作用, 静脉注射后主要分布于肝脏和肾脏。CD 主要通过网格蛋白介导的内吞被细胞摄取, 并且碳点可分布在线粒体、内质网、溶酶体以及细胞核内。CD 可促进成骨细胞分化, 这一作用依赖于内质网应激。凝胶电泳成像结果显示, 当 CD 与 miR-2861 质量比为 4:1 及以上时, 与基因完全结合。转染实验结果显示, 相对于商业基因载体 PEI, CD 可以将更多的 miR-2861 转染进 BMSC, 且在转染后 7 天, 仍可在细胞内检测到 miR-2861 的大量表达。动物实验结果显示, CD-miR-2861 可明显促进新骨再生。

结论: 抗坏血酸碳点具有良好的成像能力, 主要通过网格蛋白介导的内吞进入细胞, 并且在细胞质和细胞核内均有分布; CD 可通过促进内质网应激促进成骨细胞分化; 同时该 CD 可以作为一种良好的基因载体, 运载具成骨作用的 miR-2861, 促进骨再生。

小鼠全身放疗后颌下腺腺泡细胞和导管上皮细胞放射损伤差异研究

常世民, 胡亮, 李向春, 徐亿普, 冯晓宇, 王松灵
首都医科大学口腔医学院唾液腺疾病中心

目的: 探讨全身放疗后小鼠颌下腺腺泡细胞和导管上皮细胞损伤水平的差异。

方法: 实验组小鼠给与全身 5Gy 放射, 空白组不给于放射处理。放射后 2h、4h、6h 分批处死小鼠, 取颌下腺组织。免疫荧光染色观察放射性损伤标志物 p-H2AX 和 53BP1 的表达水平。

结果: 与空白组相比, 实验组免疫荧光染色可见颌下腺组织 p-H2AX 和 53BP1 表达均明显增加。实验组在 2h、4h、6h 颌下腺导管上皮细胞 p-H2AX 阳性率略高于腺泡细胞, 统计学差异无显著性; 实验组颌下腺导管上皮细胞 53BP1 阳性率明显高于腺泡细胞, 统计学有显著性差异 ($p < 0.05$)。

结论: 全身放射导致小鼠颌下腺放射性损伤, 其中导管上皮细胞损伤程度略高于腺泡细胞。

氯化钴模拟的低氧环境对小鼠腭突细胞增殖的影响

陈静¹ 杜娟^{1*}

首都医科大学附属北京口腔医院

目的 先天性唇腭裂 (cleft lip and / or palates, CLP) 是人类最常见的先天发育性缺陷之一。全世界的发病率为 1 / 500 ~ 1 / 1000 , 近年来各国报道的唇腭裂发病数字仍有上升的趋势。在我国, 先天性唇腭裂的发生率约为 1% ~ 2%。 , 属于发病率较高的国家。在所有的唇腭裂中, 约有 70%是以非综合征形式存在的, 但其发病机制目前尚未明确, 大多数学者认为是基因和环境的联合作用引起的。低氧 (Hypoxia) 是指生理性氧量不足或组织需氧量不足的一种状态, 氧含量一般为 3%-0.1%。氧是细胞代谢线粒体氧化磷酸化的重要底物, 对细胞的存活具有重要的调节作用。低氧可以分为生理性低氧和病理性低氧两种不同类型。低氧程度的不同对机体产生的影响也不相同, 适度的低氧能诱导机体产生适应性反应, 最终促进细胞的存活, 而严重低氧则会通过激活凋亡等途径, 增加对机体的影响, 如肿瘤, 发育畸形等。氯化钴是一种化学制剂, 应用于体外

模拟细胞低氧环境。本研究通过氯化钴模拟的低氧环境研究低氧对小鼠腭突细胞增殖的影响。**材料与方法** 我们采用胚胎发育 13.5 天的正常胎鼠的腭突细胞作为研究对象。用氯化钴模拟低氧环境处理腭突细胞 1-7 天。将腭突细胞随机分为 6 组，分别是对照组、10 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L、200 μ mol/L 的二氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂), 用 CCK8 法检测小鼠腭突细胞增殖活力。所有实验数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS Statistics 软件包对所得数据进行统计学分析。采用单因素方差分析(SNK 法), 定义 $p < 0.05$ 为显著性差异, GraphPad Prism 7.00 分析图像。**结果** 对照组的腭突细胞增殖率保持稳定不变。200 μ mol/L 组处理后的细胞增殖率 1-7 天一直处于下降趋势。10 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L 组在 24H 增殖率增加, 48H 有轻微下降, 72H 上升后一直维持下降趋势, 且在第四天之后不同浓度氯化钴对细胞增殖的影响均呈下降趋势。**结论** 小鼠腭突细胞增殖受氯化钴形成的低氧影响呈时间和浓度依赖性, 进行化学模拟低氧时, 要考虑氯化钴的作用浓度和时间。

关键词: 腭突细胞; 氯化钴; 低氧; 增殖

颗粒蛋白前体 (Progragulin) 对大鼠炎性牙周骨缺损愈合的影响

陈倩 杨丕山*

山东大学口腔医学院

目的:

颗粒蛋白前体 (PGRN) 已被证实在抗炎和促进骨形成中发挥重要作用, 但 PGRN 对炎性牙周骨缺损的影响尚不清楚。本实验探索 PGRN 是否可以促进炎性环境下的牙周骨再生, 为炎性环境下牙周再生提供新的治疗思路。

材料与方法:

构建大鼠牙周炎模型:

取 54 只 Wistar 大鼠, 随机分为牙周炎组和健康组。牙周炎组在大鼠下颌左侧第一磨牙牙颈部行正畸结扎、高糖饮食; 健康组不做任何处理、正常饮食。两周后行组织病理学观察。

构建牙周炎骨缺损模型:

随机分为三组, 负载 PBS 的膜材料组, 负载 PGRN 的膜材料组, 负载 anti-TNF- α

的膜材料组。在已形成牙周炎的大鼠左侧第一和第二磨牙的颊侧制备 3x2x1 mm 的牙周骨缺损区域，分别将膜材料放在缺损区。术后 1, 4, 6 周处死动物并取材。

采用放射学 (micro-CT) 和组织形态学 (H.E.和 Masson) 染色评估 PGRN 对新生骨的作用。

通过免疫组化检测 ALP, Runx2 的表达以及 TRAP 染色检测破骨细胞的表达来分析 PGRN 的成骨破骨能力。

通过免疫组化检测 TNF- α 的表达来评价 PGRN 的抗炎能力。

运用免疫荧光染色和免疫共沉淀来检测 PGRN 与 TNFRs 的相互作用关系。

结果:

组织学染色显示牙周炎组牙槽骨吸收明显; 健康组无明显骨吸收。

组织学和放射学结果发现 PGRN 组新生骨的体积、质量明显高于 PBS 和 anti-TNF- α 组 ($p < 0.05$)。

ALP, Runx2 免疫组化显示 PGRN 组的表达明显高于 PBS 和 anti-TNF- α 组 ($p < 0.05$)。

TNF- α 免疫组化结果显示 PGRN 和 anti-TNF- α 组的 TNF- α 阳性细胞表达明显低于 PBS 组 ($p < 0.05$)。

TRAP 染色结果显示 PGRN 和 anti-TNF- α 组的破骨细胞表达明显低于 PBS 组 ($p < 0.05$)。

免疫共沉淀证实 PGRN 与 TNFRs 相互结合,免疫荧光染色显示 PGRN 组的 TNFR2 的表达明显高于其余两组 ($p < 0.05$),但 TNFR1 的表达三组间无明显差异。

结论:

实验表明 PGRN 通过抗炎、抑制破骨细胞生成和促进成骨来促进大鼠牙周炎性骨缺损的再生。PGRN 在促进成骨细胞分化及牙周骨再生方面的能力明显优于 anti-TNF- α , 并且 PGRN 主要是通过与 TNFR2 结合来发挥作用的。局部应用 PGRN 可在炎性环境下对牙周骨再生起促进作用, 为炎性环境下牙周再生治疗提供一新思路。

Gingerol 对人口腔鳞癌细胞抑制作用的研究

陈素红 宿颖 张辛燕*

首都医科大学附属北京口腔医院

口腔癌是常见的恶性肿瘤之一，严重威胁着人类的生命和健康。2014 年世界卫生组织和国际癌症研究机构的研究发现，口腔癌发病率位于全身肿瘤的第七位，死亡率位于全身肿瘤的第九位。目前寻找到高效低毒的化疗药物仍是获得良好治疗效果所不可或缺的，其中自然产物的有效成分就是高效低毒药物的最好来源之一。本研究中我们探索自然产物中的化学成分姜辣素（Gingerol）的抗癌作用。生姜（Ginger）不仅是日常调味品，也是一种常用中药材，是人们平时生活中应用较多的药食两用植物。药用部分为新鲜根状茎，新鲜的生姜根茎包含了大量丰富的生物活性组成成分，生姜内服具有抗炎抗菌作用，外用可缓解风湿性疾病，姜辛辣的主要成分姜辣素（Gingerol）是其主要有效成分。**目的：**本研究通过体外细胞学实验检测 Gingerol 对人口腔鳞癌细胞生物学行为的影响。**材料和方法：**选取人口腔鳞癌细胞 SCC-15 细胞系进行培养，用不同浓度的 Gingerol 处理对数期 SCC-15 细胞，通过 MTT 实验检测 Gingerol 对人口腔鳞癌细胞增殖的影响；克隆形成实验检测 Gingerol 对人口腔鳞癌细胞的克隆形成能力影响；划痕实验检测 Gingerol 对人口腔鳞癌细胞的迁移能力的影响。**结果：**结果表明，Gingerol 能有效抑制人口腔鳞癌细胞 SCC-15 的增殖、克隆形成和迁移能力，并呈一定的时间和剂量依赖性。其中，MTT 结果显示，Gingerol 能有效地抑制 SCC-15 细胞的增殖，并且随着药物浓度增高及处理时间的延长，对细胞的抑制作用逐渐增强，呈一定浓度和时间依赖关系。克隆形成实验结果显示，随着 Gingerol 浓度的增高，SCC-15 细胞的克隆形成数逐渐减少，细胞集落也变小，呈剂量依赖性。划痕实验结果显示，随着 Gingerol 浓度的增高和处理时间的延长，SCC-15 细胞向另一侧迁移的距离逐渐缩小，呈一定的浓度和时间依赖性。**结论：**综上所述，姜辣素（Gingerol）对人口腔鳞癌细胞 SCC-15 细胞在增殖、克隆和迁移等恶性生物学行为方面能起到明显的抑制作用，有作为治疗口腔癌药物的应用前景。

镁金属抗炎和促进成骨的作用及分子机制

陈玮, 张旭芳, 陈庆飘, 毛学理
中山大学附属口腔医院

由于镁金属具有良好的生物相容性、可降解性和安全性, 是理想的骨移植材料。课题组前期实验发现, 镁金属能诱导炎症环境下巨噬细胞向 M2 表型转化, 有抗炎效果。本研究通过体外细胞实验将进一步探索镁离子抗炎和促进成骨的效果和分子机制。

目的:

本研究探索镁金属对于骨缺损区抑制炎症和促进成骨的情况以及相关分子机制。

材料与方法:

①提取 5-6 周龄的 SD 大鼠股骨和胫骨 BMSCs, 培养至 P3, 用于后续实验。另采用美国 ATCC 公司的 RAW264.7 细胞用作后续实验。②配置镁离子浓度为 0mg/L、10mg/L、100mg/L 和 500mg/L 的培养基。③培养 RAW264.7, 通过 CCK8 实验检测不同浓度镁离子的细胞毒性。其次, 用终浓度为 1 μ g/ml 的 LPS 刺激 RAW264.7, 然后用②中的培养液分别对 RAW264.7 培养; RT-PCR 检测炎症因子 TNF- α 的表达, 成骨相关基因 BMP2, VEGF 以及 TLRs 信号通路 Myd88, Ticam1, Ticam2 的表达; Western blot 检测 NF- κ B 和 I- κ B 的表达。④收集不同浓度镁离子培养基培养 RAW264.7 24 小时和 48 小时后的细胞上清液, 用于后续实验:ELISA 实验来检测上清液中 BMP2 的分泌量; 用前述细胞上清培养 BMSCs, 收集第 1、3 天的 RNA 和第 3、5 天的蛋白。通过 RT-PCR 检测 Runx-2, ALP, OPN, OCN 成骨基因及 BMP/Smsd 信号通路 SMAD4, SMAD5, BMPR1A 和 SMAD1 基因的表达。Western blot 检测 ALP, Runx-2, SMAD4, BMPR1A 蛋白的表达。

结果:

①不同浓度的镁离子对 RAW264.7 细胞无细胞毒性。②RT-PCR 示, 炎症因子 TNF- α 在镁离子浓度为 10mg/L 和 100mg/L 时, 与空白对照组相比, 其表达下调($P < 0.05$)。抗炎因子 IL-10 和 IL-1ra 的表达明显增加 ($P < 0.05$), 其中 IL-10 在镁离子浓度为 100mg/L 时, 表达最为明显; 随镁离子浓度升高, IL-1ra 在各实验组中的表达情况差异不大。与对照组相比, TLRs 信号通路中 Myd88, Ticam1, Ticam2 的表达均下调, 其中在镁离子浓度为 100mg/L 时尤为明显。成骨相关基因 BMP2, VEGF 在镁离子浓度为 100mg/L 时, 与对照组相比, 表达量明显上调 ($P < 0.05$)。③Western blot 示, I- κ B 蛋白在镁离子浓度为 100mg/L 时, 表达明显上调 ($P < 0.05$)。NF- κ B 蛋白在镁离子浓度为 10 和 100mg/L 时, 表达明显下调 ($P < 0.05$)。④ELISA 结果示, 24 小时上清液中的 BMP2 分泌量随着镁离子浓度含量的增加有上升趋势。⑤RT-PCR 和 Western blot 实验结果示, 在镁离子浓度 100mg/L 时, 成骨相关因子 ALP, OPN, OCN, Runx-2 较对照组表达明显上调, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 同时,

SMAD4, SMAD5, BMPR1A 的表达均明显多于对照组和其余实验组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论:

①炎症状态下, 镁离子促使巨噬细胞向 M2 表型转换, 并通过抑制 TLR 途径下调炎症 NF- κ B 信号通路, 促进活化的巨噬细胞分泌抗炎因子 IL-10 和 IL-1ra, 上调成骨相关基因 BMP2, VEGF 的表达。

②适宜浓度镁离子 (100mg/L) 可促进 BMSCs 成骨分化。其机制可能是镁离子促进巨噬细胞分泌 BMP2, 从而激活 rBMSCs 的 BMP/Smad 信号通路增强其成骨向分化能力来完成的。

可注射温敏型水凝胶缓释 FK506 促进牙周组织再生的研究

陈希¹ 徐晓薇³ 孙茂蕾¹ 布文兔¹ 王梓霖¹ 郑梦丹¹ 孙宏晨^{1, 2}

1 吉林大学口腔医学院 2 中国医科大学口腔医学院

目的: 牙周炎是菌斑微生物与宿主免疫系统间相互作用所致的炎症性疾病, 由牙周炎引起的牙槽骨吸收是成人失牙的首要原因。近年来 FK506 因抗炎促成骨作用受到关注, 本文采用具有较好药物缓释功能的 CS-甘油磷酸钠-GEL 可注射温敏型水凝胶复合 FK506 抑制牙周炎症、促进牙周组织再生。

材料与方法: 本文通过酶消化法提取并培养人牙髓干细胞, 运用 LPS 诱导的同时经 FK506 处理, 通过 real-time PCR, Western blot 检测成骨相关标志物 (ALP、COL I 等) 表达情况。并进行茜素红染色和定量分析, 考察 FK506 对 DPSCs 成骨分化的影响。本文建立大鼠牙周炎模型, 在牙周袋内注入载有 FK506 的水凝胶溶液。建模两周后通过 HE 染色及免疫组化染色观察牙周组织内炎症因子表达情况及各组新生骨量及局部成骨细胞分化的差异。

结果: 经 FK506 处理后, 炎症条件下牙髓干细胞 ALP、COL I 等成骨相关标志物表达明显上调。体内动物实验结果显示可注射温敏型水凝胶缓释 FK506 抑制炎症水平同时抑制牙周炎条件下牙槽骨吸收, 促进牙槽骨再生。

结论: 可注射温敏型水凝胶缓释 FK506 可以促进炎症条件下牙髓干细胞成骨分化能力。本研究为临床运用新型牙周药物治疗体系, 既能控制牙周炎症, 又能促进牙周组织再生提供了依据。

糖胺聚糖链缺失导致小鼠舌肌腱退化

陈晓艳, 冉春泉, 刘静, 周楠, 肖晶*, 刘超*

大连医科大学口腔医学院口腔病理系 大连市口腔医学基础研究重点实验室

目的: 糖胺聚糖 (Glycosaminoglycan, GAG) 是由多个单糖组成的杂多糖, 通过丝氨酸残基与核心蛋白连接形成蛋白多糖。GAG 链能够通过结合细胞外水分子以支撑组织形态, 并富集细胞外的离子、酶类和生长因子, 以维持正常的细胞黏附、迁移、增殖和分化。Fam20B (Family of Sequence Similarity 20 Member B) 是一种木糖激酶, 对蛋白多糖核心蛋白上 GAG 链的连接至关重要。已有研究证明, Fam20B 失活可以导致几乎所有蛋白多糖上 GAG 链的缺失。舌主要由颅神经嵴 (Cranial neural crest, CNC) 来源的间充质细胞和枕部体节来源的肌源性细胞共同发育而成, 其中间充质细胞形成舌的肌腱和结缔组织, 肌源性细胞形成舌肌。本研究中, 我们在 CNC 来源的间充质细胞中特异性敲除 Fam20B, 使舌肌腱和结缔组织中 GAG 链缺失, 进而观察其对小鼠舌发育的影响。

材料与amp;方法: 用 Wnt1-Cre 小鼠与 Fam20B-floxed 小鼠杂交以产生 Wnt1-Cre; Fam20B^{flox}/flox 小鼠 (Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f}), 分别取 E12.5、E13.5、E14.5 和 E16.5 的 Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠和同窝野生型 (Wild Type, WT) 胚鼠, 对组织固定、脱水、包埋和切片后, 进行 Masson 染色、免疫组织化学染色、糖基化染色、BrdU 标记的细胞增殖实验, 分别观察舌体形态变化、舌肌纤维发育状态、糖基化的差异以及细胞增殖状况。取 E12.5 Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f}; β -Gal 胚鼠进行 Lac-Z 染色, 观察 β -Gal 在舌中的表达部位和范围。

结果: 与 WT 胚鼠相比, Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠表现出小颅症、小舌畸形以及 Pierre Robin 序列征等颅颌面畸形, 且小颌畸形随着胚鼠天数增大更加明显。(1) 通过 Masson 染色, 我们发现 Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠舌整体高耸且短小。E12.5-E16.5, 冠状切面均可观察到 Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠舌中隔变窄, 且窄缩趋势随着胚鼠天数的增加更加明显, 肌腱呈退化状态。(2) Myosin 免疫组化染色显示: E13.5 时, Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠舌肌纤维与 WT 相比变化不明显; E16.5 时, Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠舌前部肌纤维减少, 排列紊乱, 舌体部直肌与上纵肌间无明显间隔, 呈杂乱交叉状态, 颞舌肌明显变短且向舌中隔方向倾斜。这提示舌间质中结缔组织明显减少。(3) 阿尔新蓝染色结果示: E13.5 时, WT 胚鼠舌间充质中均可见蓝色表达区域, 在舌后部舌背黏膜下方以及横肌周围间充质中表达尤为明显, 而 Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠舌前部未见蓝色区域, 在舌后部间充质中有较弱的表达, 表达强度和范围都低于 WT 组。这提示舌间充质中 GAG 链的含量明显减少。(4) BrdU 标记法显示: E13.5 时, Wnt1-Cre; Fam20B^{f/f} 胚鼠舌肌细胞增殖数量明显低于 WT 组, 提示 GAG 链介导了肌肉与结缔组织间的相互作用。(5) Lac-Z 染色结果显示: 与

WT 组相比, Wnt1-Cre; Fam20Bf/f; β -Gal 胚鼠舌后部间充质及中隔区域蓝色表达范围及强度均明显减小。这提示 Wnt1-Cre; Fam20Bf/f; β -Gal 胚鼠舌中 Wnt 经典信号通路受到抑制。

结论: 胚鼠 CNC 来源的间充质细胞中 Fam20B 缺失使蛋白多糖的 GAG 链明显减少, 导致舌肌腱退化, 提示 GAG 链是维持肌腱及结缔组织的发育所必需的, 该过程可能通过 Wnt 经典信号通路发挥作用; 而退化的肌腱通过影响肌肉-肌腱相互作用影响舌肌的发育。

Toll 样受体 9 依赖的 p38MAPK 信号通路的抑制在原发性舍格伦综合征中的作用机制

曹宁宁, 郑凌艳, 俞创奇, 石欢, 高绮曼, 陈婵

上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院 口腔外科, 上海市口腔医学重点实验室

【摘要】

目的: 在动物模型 NOD 鼠中, 观察研究 Toll 样受体 9 (Toll Like Receptor 9, TLR9) 依赖的 p38MAPK 信号通路的抑制在原发性舍格伦综合征发病机制中的作用, 从而为疾病的治疗提供一种新思路。**方法:** 实验选取 5 周龄的雌性 NOD 小鼠, 分别给予 3 种抑制剂: ODN2088、VX-792、羟氯喹。利用流式细胞学技术检测小鼠外周血淋巴细胞的情况。利用免疫组化检测小鼠下颌下腺 TLR9 及 p-p38 MAPK 的表达情况。利用酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测小鼠外周血血浆抗体的表达。利用 TUNEL 方法检测小鼠下颌下腺上皮细胞的凋亡。同时, 观察小鼠刺激性唾液流率的改变以及下颌下腺病理学改变。**结果:** 和未接受治疗的 NOD 小鼠相比, 只有 ODN2088 组的 NOD 小鼠的唾液流率显著增加。在所有接受羟氯喹的 NOD 鼠和未接受治疗的 NOD 鼠中, 均有下颌下腺的淋巴细胞浸润灶的出现。在 ODN2088 组中, 只有 1 只 NOD 小鼠出现下颌下腺的淋巴细胞浸润灶。在 VX-702 组中, 所有 NOD 小鼠均未发现淋巴细胞浸润灶。流式细胞学技术检测显示, 所有实验组的外周血

淋巴细胞的数目显著减少。ODN2088 组 NOD 小鼠的抗 SSA/Ro 抗体和抗 SSB/La 抗体的浓度是所有实验组中最低的。**结论：**TLR9 依赖的 p38MAPK 信号通路的抑制能一定程度上减轻原发性舍格伦综合征动物模型 NOD 鼠的临床表现，这可以为原发性舍格伦综合征的将来的治疗提供一种新思路。同时，进一步证实 TLR9 依赖的 p38MAPK 信号通路的激活在原发性舍格伦综合征中发病机制中起着非常重要的作用。

【关键词】 原发性舍格伦综合征; NOD 鼠; TLR9; p38 MAPK; 流式细胞术; 抑制剂

破骨细胞靶向递送 miR-141 对老年恒河猴骨质疏松症的治疗作用

蔡明洋, 王晓刚*, 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的：老年性骨质疏松症是一种严重的老年代谢性疾病，大约 30%的绝经后妇女患有骨质疏松症，其中 40%以上的妇女因骨质疏松症有骨折的风险。虽然多种药物已被广泛应用于治疗骨质疏松症，但由于药物治疗效用不足和不良反应，当前骨质疏松症治疗药物仍不理想。以小核酸 miRNA 为基础的基因治疗是一种快速发展的疾病治疗策略，具有生产规模大、安全性高、疗效快等优点。到目前为止，miRNA 药物已被用于癌症治疗的研究中。然而，在灵长类动物中，miRNA 药物尚未被报道为治疗以破骨细胞为靶点的骨质疏松症的候选药物。此外，由于选择性给药效率低下、对细胞的靶向递送水平不足以及意外副作用等，其疗效受到了限制。本研究通过探讨 miR-141 对破骨细胞骨吸收功能的抑制作用，并靶向递送 miR-141 至破骨细胞，研究其在老年恒河猴骨质疏松症中的治疗作用，为靶向递送小核酸药物在骨质疏松症治疗的临床应用方面提供信息。

材料与方法：采集老年恒河猴和骨质疏松患者样本，检测骨密度及 miR-141 的表达水平。利用破骨细胞靶向递送系统(Asp)8-PU 递送 miR-141 至老年恒河猴。利用激光细胞切割验证破骨细胞递送效果；通过 CT，切片 H&E，Trap 染色等评价骨量变化与破骨细胞的功能；通过血清学检测及主要器官切片评价药物安全性；利用 qPCR，Western Blot 等探讨 miR-141 的作用机制。

结果: 本研究中, 我们发现 miR-141 是破骨和骨吸收的关键抑制因子。在老年恒河猴和骨质疏松患者中, miR-141 的表达水平与骨密度呈正相关, 与骨骼老化呈负相关。选择性地通过核酸传递系统将 miR-141 导入老年恒河猴破骨细胞, 使骨量逐渐增加, 而对初级器官的健康行为和功能没有显著影响。此外, 我们还发现 miR-141 的作用机制是抑制两种破骨细胞分化调控分子 Calcr 和 EphA 2。

结论: 我们的研究表明, miRNA(如 miR-141)在抑制灵长类动物骨吸收方面起着重要作用, 破骨细胞靶向递送小核酸 miR-141 在恒河猴骨质疏松症的治疗中有显著效果。为靶向递送 miRNA 在骨质疏松症治疗中的临床应用提供了可靠的实验依据。

抗菌肽 GL13K 修饰钛表面对巨噬细胞极化状态的影响

陈旭晞^{1,2}, 周麟¹, 陈江¹

1. 福建医科大学附属口腔医院种植科 2. 福建省高校口腔医学重点实验室

目的: 研究经抗菌肽 GL13K 修饰经硅烷化处理后的钛表面对巨噬细胞极化状态及抗炎、促炎因子分泌的影响。

材料与方法: 巨噬细胞 RAW264.7 培养后接种于纯钛及抗菌肽 GL13K 修饰钛表面, 通过流式细胞术检测表面标记物 CD197, CD86, CD206 及 CD163, 确定极化分型。巨噬细胞 RAW264.7 经脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 及白介素 4 (interlukin 4, IL4) 诱导极化为 M1/M2 型巨噬细胞, 接种于纯钛及抗菌肽 GL13K 修饰钛表面, 通过 CCK8 检测不同极化类型的巨噬细胞在不同材料表面的增殖能力; 通过 RT-qPCR 检测促炎因子 TNF α , IL6, IL1 β , iNOS 及抗炎因子 IL10, IL1ra, Arginase, TGF β 1, TGF β 3 的 mRNA 表达量, 通过 ELISA 实验检测促炎、抗炎细胞因子蛋白水平。

结果:

[1] 流式细胞仪检测结果显示, 与纯钛表面相比, GL13K 修饰钛表面 M2 极化巨噬细胞比例增加, M1 极化巨噬细胞比例减少, GL13K 修饰钛表面促进巨噬细胞向 M2 型极化状态转变, 抑制巨噬细胞的 M1 向 M2 型极化状态转变。

[2] CCK8 实验结果显示相比纯钛组, GL13K 修饰钛组表面 M1 型巨噬细胞增殖水平相近, M2 型巨噬细胞增殖水平增加。GL13K 修饰钛表面具有良好的生物相容性, 且能够促进巨噬细胞向 M2 型极化状态转变。

[3] RT-qPCR 检测结果显示, 接种于 GL13K 修饰钛表面的 M1 型巨噬细胞相比纯钛表面促炎细胞因子 TNF α , IL6, IL1 β , iNOS 的 mRNA 表达量下降。接种于 GL13K 修饰钛表面的 M2 型巨噬细胞相比纯钛表面抗炎细胞因子 IL10, IL1ra, Arginase, TGF β 1, TGF β 3 的 mRNA 表达量上升。GL13K 修饰钛表面能够促进抗炎因子的分泌, 抑制促炎因子的分泌, 具有良好的抗炎作用。

[4] ELISA 检测结果显示, 接种于 GL13K 修饰钛表面的 M1 型巨噬细胞相比纯钛表面促炎细胞因子 TNF α , IL1 β 蛋白水平平均下降。接种于 GL13K 修饰钛表面的 M2 型巨噬细胞相比纯钛表面抗炎细胞因子 IL10, IL1ra 蛋白水平平均上升。GL13K 修饰钛表面能够促进抗炎因子的分泌, 抑制促炎因子的分泌, 具有良好的抗炎作用。

结论: 抗菌肽 GL13K 修饰钛表面能够促进巨噬细胞向抗炎、引导组织修复的 M2 型极化状态转变, 一定程度上抑制巨噬细胞的经典炎症 M1 型极化, 具有良好的抗炎作用, 有助于机体由炎症向骨再生方向发展, 具有潜在的研究和临床价值。

关键词: 巨噬细胞, 抗菌肽, 炎症, 钛种植材料

初级纤毛转运蛋白 140 阳性细胞在小鼠磨牙及切牙发育过程中的分布和转归

陈雨贝, 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海牙组织修复与再生工程技术中心

目的: 初级纤毛是突出于细胞膜表面的细胞器, 它可以感受外界的信号刺激并将信号传递到细胞内, 对于机体的生长发育有重要作用。纤毛的信号传递功能主要由纤毛转运蛋白(intraflagellar transport proteins, IFTs) 复合体来完成。IFT140 是一种关键的转运蛋白, 课题组前期研究已经证实 IFT140 与牙本质形成有关, 在成牙本质细胞中特异性敲除 IFT140 的小鼠出现牙本质发育不良的表型。然而, IFT140 阳性细胞在牙的发育过程中的具体分布及作用尚不十分明确。本研究旨在探究 IFT140 阳性细胞在牙齿中的表达(短期)和转归(长期)以及 IFT140 在牙齿分化中扮演的角色和起作用的细胞类型。

材料与方法: 将 IFT140CreER 小鼠与 Rosa26 TD-tomato 小鼠交配所生的后代注

射 tamoxifen 后, 表达 IFT140 的细胞将显现红色荧光, 在小鼠出生后三天注射 tamoxifen 激活 cre 酶, 并在出生后第 4 天、第 14 天、第 21 天及第 31 天收取下颌骨样本。同时给另一组小鼠在相同收样时间的前一天注射 tamoxifen, 荧光显微镜下观察不同时间段及时间点 IFT140 阳性细胞及其后代在小鼠下颌第一磨牙与切牙中的分布情况。使用干细胞标记物 PRX1、成牙本质细胞标记物 OSX 免疫荧光复染, 观察不同类型 IFT140 阳性细胞的状态及其转归。

结果: 在下颌磨牙中, 出生后四天 IFT140 阳性细胞在尖端区域以下的成牙本质细胞中高表达。综合各个时间点的观察结果, IFT140 阳性细胞主要为出生后 14 天的下颌磨牙的成牙本质细胞。在下颌切牙中, IFT140 阳性细胞主要位于切牙根端颈环的唇侧与舌侧之间的干细胞龛中, 与多数 Gli1 阳性和 PRX1 阳性细胞共定位, 随切牙生长间断分布于成牙本质细胞层, 参与切牙牙本质的形成。

结论: 本研究通过使用细胞谱系示踪技术, 构建 IFT140-CreER+Rosa26 TD-tomato 转基因小鼠, 在不同时间点定位了 IFT140 的表达。发现了 IFT140 阳性细胞可分化为成牙本质细胞, 揭示了 IFT140 阳性细胞在小鼠切牙及下颌第一磨牙发育过程中的作用。

RA-RA receptor-DMD 的作用轴在腭裂伴发舌发育畸形中发挥作用

丛蔚^{1*} 吴小源¹ 刘超² 李楠² 肖晶² 王如³

1. 大连医科大学口腔医学院 2.大连医科大学口腔医院 3.大连医科大学附属第一医院

目的: 考察维甲酸诱导的腭裂伴舌肌肉发育异常的机制。

方法: 孕鼠灌胃维甲酸, 诱导胎鼠腭裂及舌畸形。HE 染色检测表型的变化。透射电镜检测超微结构变化。免疫组织化学和免疫蛋白沉淀检测相关蛋白的表达变化。

结果: 舌组织发育的早期 E14.0, 维甲酸 (RA) 诱导的腭裂组腭突较对照组较小, 并且双侧腭间距很大, 舌体的高度较高, 颊舌肌异常纤细薄弱, 胎鼠出生前 E18.5 RA 处理组的透射电镜超微结构显示, 舌体组织肌节结构无法识别; 颊舌肌肌节结构无法识别, 细胞核有核内包含物, 染色质边集, 线粒体肿胀, 表明舌肌发育不良, 出现坏死。免疫蛋白印迹显示, RA 的细胞核内受体 RAR-a 在 E14.5, E15.5 都下降, RAR-beta 在 E14.5 下降, E15.5 上升, 在出生前 RAR-a 及 RAR-beta 表达无明显变化。免疫组

织化学染色结果显示, 胎鼠出生前, 在舌体及颊舌肌中, dystrophin (DMD) 蛋白在肌细胞膜中表达, 实验组的舌体及颊舌肌里, DMD 蛋白表达明显下降或表达缺失。Wnt 通路成员 Fzd3 蛋白以及 beta-trcP 蛋白在 RA 处理组的舌体里表达均下降。

结论: RA 诱导的舌肌畸形表型的进一步研究提示, 该模型与人类杜氏肌营养不良症非常相似, 均发生肌肉萎缩以及肌纤维细胞坏死, 以及肌纤维膜中 dystrophin 蛋白表达下降或缺失。RA-RA receptor-DMD 的作用轴在腭裂伴发舌发育畸形以及人类杜氏肌营养不良症中发挥作用。

沙利度胺引发兔胚胎面部血管发育障碍继发 HFM 的病理学变化

代杰文

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科

目的: 第一、二腮弓综合征也称为半侧颜面短小畸形 (hemifacial microsomia, HFM), 由 Gorlin 和 Pindborg 于 1964 年提出的, 是仅次于唇腭裂畸形的最常见先天性颅面畸形, 发生率大约为 1/3 500 ~ 1/5 600 活婴, 大多为散发, 男女发病率及左右侧发病率无明显差异。大多数患者存在不同程度的面部不对称, 从婴儿或小儿开始即可出现, 但是随着生长发育越加明显, 患者的病变多在单侧, 个别累及双侧, 涉及颅面骨骼、肌肉、软组织、面神经及外耳的发育不良, 半侧颜面短小畸形的发病机理多认为是因为胚胎时期第一、二腮弓的发育过程中出现了血肿和神经嵴的发育移行过程中的异常所导致。沙利度胺作为一种新型的抗血管生成药物, 具有抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 与成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的表达, 促进新生血管内皮的凋亡, 从而可能会引发相应的组织发生血肿, 因此我们通过对怀孕家兔静脉注射沙利度胺制作哺乳动物胚胎颜面部血肿模型, 为接下来进一步研究第一、二腮弓综合征的发病机制打下基础。

材料与方法: 将怀孕 7 天的 4 只新西兰大白兔通过耳缘静脉注射沙利度胺, 注射剂量为 300mg/kg/天, 连续注射两天, 作为实验组。另外, 将怀孕 7 天的 4 只新西兰大白兔通过耳源静脉注射生理盐水, 注射的体积与实验组相当, 作为对照组。并在怀孕第 10 天时空气栓塞法处死全部孕兔, 剖腹取出胚胎, 用生理盐水冲洗干净后, 将其中的每组两只孕兔的胚胎置于体式显微镜下观察颜面部, 腮弓, 耳部的组织变化。其余的每组两只孕兔胚胎依次进行中性的福尔马林溶液的固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 来观

察组织学中颜面部，腮弓，耳部的变化。

结果：在体视显微镜下可以观察到，实验组的兔胚胎颜面部，四肢甚至是颅顶部出现不同程度的血肿，尤其初步形成的手臂和耳前区的腮弓部位的出血情况较为严重。在 HE 染色的片子中观察到，实验组的兔胚胎腮弓部的染色较深，呈现高密度的蓝色深染，对照组的蓝色较浅。

结论：沙利度胺作为一种血管活性药物，对家兔胚胎的面部血管发育有一定的影响，从而可能对于兔胚胎的整个颌面部的软骨，骨甚至是软组织等的发育产生影响，从而导致面畸形，如 HFM 的发生。

沙利度胺导致兔胚胎面部出血及继发下颌骨发育不足的病理学观察

代杰文，赵彦，陈启铭，沈国芳

上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔颌面科，上海市口腔医学重点实验室，
国家口腔疾病临床研究中心

目的：半侧面发育不全是仅次于唇腭裂的常见先天性颌面畸形。胚胎时期第一、二鳃弓发育过程中出血和血肿是其可能致病机制。沙利度胺具有抗血管生成作用，可引起局部组织出血和血肿，本研究拟探讨沙利度胺对兔面部发育的影响。

材料与方法：怀孕 7 天的 4 只新西兰大白兔通过耳缘静脉注射沙利度胺，作为实验组。将怀孕 7 天的 4 只新西兰大白兔通过耳源静脉注射相同量的生理盐水作为对照组。并在怀孕第 10 天时空气栓塞法处死全部孕兔，剖腹取出胚胎，用生理盐水冲洗干净后，将其中每组两只孕兔的胚胎置于体式显微镜下观察下颌骨和耳部的变化。其余每组两只孕兔胚胎进行中性福尔马林固定和石蜡切片及 HE 染色，观察下颌骨和耳部的组织学变化。

结果：大体观察显示实验组的兔胚胎颜面部，四肢和颅顶部出现不同程度的出血和血肿，尤其初步形成的手臂和耳前区的部位的出血情况较为严重。与对照组相比，实验组小鼠下颌骨发育不足，部分小鼠双侧下颌骨发育不足的程度存在差异。HE 染色结果显示，实验组的下颌骨较对照较小，Meckel 软骨发育不足。

结论：应用沙利度胺成功建立了下颌骨发育不足（半侧面发育不全）的动物模型。

沙利度胺对家兔胚胎面部血管和下颌骨发育有一定的影响，可能是半侧颜面发育不全的一种致畸剂。

猪恒磨牙牙胚发育阶段的放射学分析评价

代晓华 邹慧儒

南开大学附属口腔医院暨天津市口腔医院中心实验室

目的：尽管大多数口腔诊疗操作针对已经完全萌出的牙齿，然而，对于处于不同发育阶段的未萌或未完全萌出的牙齿情况在诊疗过程中也需要综合考虑，并根据具体情况进行相应处置。在上述诊疗过程中，系统性评估并准确预测未萌或未完全萌出的牙齿的发育阶段、钙化程度等情况十分重要。目前，临床常用的评估牙齿发育及钙化程度的参考指标仍主要基于放射学 X-线片影像。放射学 X-线片影像可一定程度地提供信息辅助临床诊疗。然而，由于 X-线片成像分辨率较低、各组织易发生影像重叠、对软组织结构显示较差，有可能影响或干扰诊断及鉴别诊断，客观上存在漏诊、误诊的可能性。本研究旨在通过提取与人牙胚生长较为接近的不同发育阶段的猪恒磨牙牙胚，观察不同发育阶段牙胚的组织学结构及相应的放射学 X-线片影像特点，分析评价 X-线片评估牙胚发育及钙化程度的准确性。

材料与方法：****收集 5 至 9 个月月龄健康猪新鲜离体的下颌骨标本，通过硬组织切片机将其自中间矢状面切为左右镜面对称的两部分。进行下颌骨 X-线片投照并依次编号。成像后，将下颌骨标本置于 10%福尔马林中固定，20%的 EDTA 溶液浸泡脱矿。五天换液一次，直至脱矿完全。取材，将样本分切成含有恒磨牙牙胚 M2 和 M3 的组织块，进行后续的脱水、包埋、切片及 HE 染色。分别由三位资深口腔颌面 X 线影像诊断专家及口腔病理学专家就上述牙胚 X-线片及 HE 组织学染色结果进行双盲判读，参照 Nolla 分级法判定牙胚的发育等级，并行统计学分析。

结果：初步研究显示 5 至 9 个月月龄猪下颌恒磨牙 M2 与 M3 的 X-线片呈现牙齿不同发育阶段分级，分别包括 0 级，无牙囊；1 级，牙囊存在，但仅存在囊状陷窝；2 级，牙冠开始钙化；3 级，牙冠形成 1/3；4 级，牙冠形成 2/3；5 级，牙冠接近形成；6 级，牙冠形成；7 级，牙根形成 1/3；8 级，牙根形成 2/3。未发现牙胚显示为 9 级，牙根接近形成，根尖孔较大或 10 级，牙根形成，根尖孔缩小。组织学 HE 染色观察到牙胚不同阶段形态变化，分别包括蕾状期、帽状期、钟状期，各期均具有明确的特征。X-线片显示为 1 级的牙胚，HE 染色已可见牙本质及釉质形成，并存在一定程度的钙化。

结论：本研究结果显示在判断牙胚不同发育阶段时，X-线片提供的资料由于成像分辨率较低以及影像重叠等问题，结果判读可能出现偏差，在临床评价中，需结合其它临床资料加以综合判断。

环二鸟苷酸在牙周组织中发挥促炎作用研究

丁小函,岳轶云,刘东宁,王柳然,孟阳
吉林大学口腔医院

目的: 探讨牙龈卟啉单胞菌毒力因子环二鸟苷酸 (c-di-GMP) 在体外的促炎作用。
材料与方法: 体外实验使用不同质量浓度 (0.25、1、4、16、64 μg / mL) 的 c-di-GMP 分别处理 RAW264.7 细胞 3、6、12、24h, 采用实时定量 RTPCR、ELISA 及流式细胞术检测炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL) -6 的表达。**结果:** RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平随 c-di-GMP 的浓度和时间的变化均有不同程度的增高, 具有剂量和时间依赖性; ELISA 结果与实时定量 RT-PCR 结果基本相同。**结论:** 体外实验证明 c-di-GMP 可明显促进 RAW264.7 促炎因子的表达。

口腔细菌对新型牙科充填材料和传统牙科充填材料体内粘附的比较

段铸辉, 陈晖, 李晓东
浙江大学医学院附属口腔医院

目的: 研究在体内环境下, 比较新型口腔充填材料与传统口腔充填材料表面菌斑中的微生物多样性, 以及粘附口腔细菌种类和数量的差异。**材料和方法:** 本研究采用 3M Z350 树脂 (ZR)、磷酸锌水门汀(ZPC)、3M 玻璃离子(GI)、Icon 渗透树脂(IPR)四种口腔充填材料制备材料片(n=24), 使用新型菌斑采集装置, 将四种不同的充填材料分别放置在模型的四个象限中, 选择 6 名志愿者口内佩戴 48h。48h 后, 样本取下进行 Miseq 测序, 获知模版 DNA 片段。将所得片段与多个数据库比对, 进行微生物多样性分析, 得到不同材料表面的细菌种类和数量。运用非参数检验的统计学方法, 对细菌在四种材

料之间的粘附差异进行统计检验。**结果:**实验共得到 850378 条序列用于后续的生物信息学分析,与 Silva 数据库比对,定位于 12 个门, 19 个纲, 28 个目, 43 个科, 75 个属。 α 多样性分析显示, ZPC 表面的微生物多样性显著低于 GI 和 IPR。物种差异分析显示, 在门水平, 厚壁菌门在 ZPC 表面的丰度显著高于 GI 和 IPR。在属水平, 链球菌属在 ZPC 表面的丰度显著高于 GI 和 IPR, 卟啉单胞菌属在 ZPC 表面的丰度显著低于 GI, IPR 和 ZR。 ($P < 0.05$)。结论: GI 和 IPR 在减少革兰氏阳性细菌的粘附方面优于 ZPC, 相反, ZPC 在减少革兰氏阴性细菌的粘附方面优于 GI 和 IPR。细菌在材料表面的粘附差异, 为临床应用提供了一定的参考价值。

关键词: 牙菌斑, 牙科充填材料, Miseq 测序, 口腔微生态

细胞纤毛转运蛋白 IFT140 在骨折愈合中的作用

范琪琪, 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的:骨折是人类常见的创伤性疾病之一, 其愈合时间的长短是决定患者康复和治疗费用的重要因素。骨折愈合是一种由多种细胞和细胞因子参与的复杂的修复过程, 其中成骨细胞的成骨作用作为关键性环节受到多种细胞因子的调控。细胞纤毛是一种以微管为基本结构的突出于细胞表面的细胞器, 几乎存在于所有的真核细胞表面。成骨细胞对多种信号的感知都依赖于细胞纤毛, 当其结构和功能受到损伤时, 会导致骨骼发育异常。细胞纤毛的结构和功能依赖于纤毛转运蛋白的介导, Ift140 是细胞纤毛上转运蛋白复合体的亚基之一。同样, 我们推测细胞纤毛在骨折愈合的过程中也起着重要作用。因此, 本研究使用成骨细胞特异性敲除细胞纤毛转运蛋白 Ift140 的小鼠, 建立股骨骨折模型, 探究成骨细胞的纤毛在骨折愈合过程中的作用及其机制。

材料与方法:分别采用 Ift140^{f/f}, sp7-cre (实验组) 以及 Ift140^{f/f} (对照组) 的 8 周龄雄性小鼠, 建立右侧股骨骨折模型。于术后 1 周、2 周、3 周、4 周分别收取右侧股骨样本, 组织学观察骨折愈合情况及骨痂区新形成骨量; 分析骨折愈合过程中成骨、成软骨及细胞纤毛相关基因及蛋白的表达; 细胞培养观察成骨细胞纤毛形态及其在骨折愈合过程中的变化, 探讨其作用形式。

结果: (1)野生型 (C57BL/6J) 小鼠 Ift140 的表达在骨折愈合初期到两周有所下降,

骨折后三周开始上升，并且在骨折愈合完成后恢复到正常水平；(2)骨折后 4 周，实验组较对照组愈合延迟，骨痂密度较低，有较明显的骨折线；成骨相关标志物 DMP1、OCN、BMP2 等表达较低；组织学分析可见骨折后四周敲除组未形成连续的皮质骨；(3) *Ift140*^{f/f}, *sp7-cre* 原代成骨细胞培养可见成骨能力较对照组明显减弱，有纤毛成骨细胞减少。

结论：本研究通过构建在成骨细胞中特异性敲除细胞纤毛转运蛋白 *Ift140* 的小鼠模型，发现成骨细胞中敲除 *Ift140* 后小鼠的骨折愈合能力减弱，证实了细胞纤毛参与骨折的愈合过程。

HAMSCs/HBMSCs 共培养体系在纠正高糖高脂诱导骨损伤中的作用

付钰 侯韵雯 王羽立 王瑞霞

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室

目的：糖尿病是世界上对于健康影响最大的疾病之一。对于需要牙种植体恢复口颌功能的患者，糖尿病是影响种植成功率的重要全身因素之一。糖尿病所引起的骨损伤不仅限制了种植体的长期稳定性，并且缺乏有效的控制方法。因此，寻找有效的手段治疗糖尿病引起的骨质损伤具有重要意义。本研究的目的是探讨 HAMSCs/HBMSCs 共培养体系在治疗糖尿病 (DM) 引起的骨质损伤中所起的作用。

方法与材料：共培养体系由人羊膜来源的间充质干细胞 (HAMSCs) 和人骨髓间充质干细胞 (HBMSCs) 组成，并分为两个体外共培养模型：接触式共培养及非接触式共培养。在每个共培养体系中设定了不同的 HAMSCs/HBMSCs 比例 (1/1, 2/1, 3/1)。之后收集每个共培养体系中的培养液上清用于纠正 HBMSCs 和人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 受到高糖高脂 (GP) 诱导而产生的损伤。通过对共培养体系中活性氧产生与超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、人脐静脉内皮细胞形成和血管内皮生长因子、相关 RNA 的表达水平，比较其细胞增殖、血管形成等能力以及成骨能力的改变。

结果：GP 所致的糖脂毒性可显著抑制 HBMSC 的细胞增殖、成骨分化以及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性，并且上调其活性氧 (ROS) 水平。同样，糖脂毒性也可抑制 HUVECs 的细胞增殖、成管能力和血管生成潜能。HAMSCs/HBMSCs 共培养体系可以通过其抗氧化特性和促进血管生成能力来纠正 HUVECs 和 HBMSC 的功能障碍。以 3/1 比例接触式共同培养的 HAMSCs/HBMSCs 体系对于 HUVECs 以及 HBMSCs 在细胞增

殖、抗氧化性、成骨和血管分化能力上具有最佳的促进作用。

结论: HAMSCs/HBMSCs 共培养体系可以作为一种治疗高糖高脂诱导下骨损伤的潜在治疗手段。

KCNQ1/Ras/MAPK/AP-1 信号轴调控牙龈纤维化的研究

高倩, 杨赫璨, 杨凯, 孟柳燕, 边专*

武汉大学口腔医学院

目的: 牙龈增生主要分为三种类型: 遗传性牙龈纤维瘤、原发性牙龈增生和药物性牙龈增生, 目前关于其发病机制尚不明确。多项研究报导钾离子通道相关基因 KCNQ1、KCNH1、KCNJ6、KCNJ8、ABCC9 激活突变导致的综合征中都伴有牙龈增生的表型, 提示钾离子通道激活可能是牙龈增生的致病机制之一。本研究选取 KCNQ1 电压依赖性钾离子通道研究其在牙龈纤维化中发挥的作用, 并探索其中机制, 以期为牙龈纤维化疾病的治疗提供新的思路和方法。

材料与方法: 通过组织免疫荧光、免疫组化检测 KCNQ1 在人牙龈组织中的表达。选取 KCNQ1 特异性激动剂 ML277 和阻断剂 Chromanol 293B 刺激人牙龈成纤维细胞 (human gingival fibroblasts, HGFs), 用 WB、细胞免疫荧光和 Whole-cell patch clamp 技术检测 KCNQ1 的表达和电流密度的变化。ML277 刺激 HGFs 3、6、9、12、15 天后, 分别用 WB 和 Sircol Soluble Collagen Assay 技术检测细胞内 COL1A1、FN 和细胞培养基上清中可溶性胶原的变化。用 WB、ELISA 和 Whole-cell patch clamp 方法检测 HGFs 中 TGF- β 1 与 KCNQ1 之间的相互关系。通过生物素标记细胞膜蛋白 pull-down、Ras-GTP pull-down、WB 和细胞免疫荧光技术检测 Ras 在 HGFs 细胞膜上的积聚成簇和激活, 分别用 JNK-IN-8 和 GDC-0094 抑制 JNK 和 ERK 信号通路, WB 检测 MAPK/AP-1 信号通路以及 COL1A1、FN 的表达变化。

结果: KCNQ1 在正常人和遗传性牙龈纤维瘤病人的上皮和结缔组织中都表达。HGFs 表达功能性的 KCNQ1, ML277 和 Chromanol 293B 可以特异性地激活和阻断 KCNQ1 离子通道。ML277 刺激 HGFs 导致细胞内 COL1A1、FN 和细胞培养基上清中可溶性胶原显著增加。在体外培养 HGFs 中, TGF- β 1 与 ML277 彼此发挥正向调控效应, Chromanol 293B 不仅抑制内源性可溶性胶原, 而且可以缓解 TGF- β 1 诱导的 FN 和可溶性胶原的升高。机制研究表明, ML277 刺激 HGFs 5min 后, Ras 在 HGFs 细胞膜内侧积聚成簇, Ras-GTP 表达显著升高; 2h 后, p-ERK 和 p-JNK 表达显著升高, 并伴随 ERK 入核增多; 4h 后, Fra-2 和 p-c-Jun 表达显著升高。JNK-IN-8 和 GDC-0094 不仅抑制 ML277 引起的 Fra-2 和 p-c-Jun 的表达升高, 而且阻断 ML277 诱导的 COL1A1、FN 的表达上调。

结论: KCNQ1 离子通道激活具有显著的促进牙龈纤维化的效应, 并与 TGF- β 1 形成正反馈调节通路, 阻断 KCNQ1 离子通道活性可以部分缓解 TGF- β 1 诱导的 HGFs 细胞外基质合成和积聚。KCNQ1 离子通道激活导致 Ras 在 HGFs 细胞膜内侧积聚成簇和激活, 启动下游 MAPK/AP-1 信号通路级联反应, 引起 HGFs 细胞外基质合成和积聚增多。

牙胚上皮对间充质分泌骨保护素 OPG 的调控作用

高鑫 项露赛 曾融生*

中山大学光华口腔医学院附属口腔医院

目的: 牙发育是牙胚上皮和间充质互相诱导的过程, 细胞外液是两者共同接触的环境, 在牙发育过程中牙源性上皮分泌的特异性信号通过该环境促使牙源性间充质向牙本质而非牙槽骨方向分化。前期我们提取了帽状期整体牙胚发育细胞外液和单独间充质发育外液进行蛋白芯片分析, 发现 OPG, 这一经典的骨发育相关因子在单独间充质培养外液中高表达, 而在整个牙胚的培养环境中表达很低。既往研究显示, 成牙信号和成骨信号表达趋势基本一致, 蛋白芯片的结果却截然相反。本研究主要关注 OPG 在牙发育过程的时空表达, 并通过体内外实验初步探索牙源性上皮对间充质分泌 OPG 的调控作用及 OPG 在牙发育中的作用。

材料与方法: 分离 E14.5 和 E16.5 小鼠胚胎组织, P1、P3、P5 和 P7 小鼠下颌骨组织, 制作石蜡切片, 免疫组化法检测 OPG 在小鼠下颌第一磨牙中时空表达情况。分离 E14.5 和 P7 的下颌第一磨牙牙胚于 transwell 板上室, 在下室培养基中加入不同浓度的 OPG (100ng/ml, 200ng/ml) 体外器官培养 7 天。通过免疫组化和 RT-qPCR 分析外源性 OPG 对出生前和出生后牙胚发育的影响。取 E14.5 小鼠下颌第一磨牙牙胚, 分离上皮和间充质, 将牙胚和间充质置于 transwell 板上室体外培养 7 天和裸鼠肾被膜下体内培养 3 周。通过免疫组化和 RT-qPCR 分析牙胚上皮对间充质成牙向分化的调控作用。

结果: 牙发育帽状期时, OPG 仅在牙胚上皮中表达, 后在间充质表达逐渐增加。在牙发育早期, 高浓度 OPG (200ng/ml) 使牙发育异常, 未见明显牙本质细胞层且牙胚中 DSPP mRNA 表达显著减低, 成骨相关信号表达增加, 牙乳头细胞出现 OCN 表达。牙发育后期, 各浓度 OPG 均促进牙胚中 DSPP 和 OCN 表达, 以 100ng/ml 促进作用最为明显。经牙胚和牙源性间充单独体内外培养, 牙胚在肾被膜下可以正常成牙, 且 DSPP 表达明显较高, 而间充质在相同环境下发育成骨样组织且成骨信号表达较高。

结论: 高浓度 OPG 在牙发育早期抑制牙本质生成, 但在牙发育后期对牙本质的生成和矿化起促进作用。早期牙发育过程中牙源性上皮通过抑制间充质分泌 OPG 促进牙胚的成牙向分化。

臭氧化油对牙周致病菌的体外抑菌作用

葛舒^{1,2}, 李璐^{1,2}, 徐艳^{1,2}

1.南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室;2.南京医科大学附属口腔医院牙周科

目的: 探究臭氧化油对牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌、具核梭杆菌的体外抑菌作用。

材料与方法:

材料: 厌氧培养箱(OXOID 公司, 英国); 微孔板分光光度计(Spectramax, 美国); 激光共聚焦显微镜(蔡司 710, 德国); Brain Heart Infusion (BHI, OXOID 公司, 英国); 臭氧化油 (90mg/ml, 上海氧趣生物科技有限公司); 氯己定 (0.12%, 福建维真园医药科技有限公司); 碘甘油 (1%, 上海运佳黄浦制药有限公司); 结晶紫溶液 (0.1%, 北京雷根生物技术); LIVE/DEAD BacLight™ 细菌活性测试试剂盒(L7012) (Thermo, 美国); 96 孔板(Thermo, 美国)。本实验所用标准株如牙龈卟啉单胞菌(ATCC 33277)、伴放线聚集杆菌(ATCC 29523)、具核梭杆菌(ATCC 23726) 均由南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室提供。

方法: 采用琼脂打孔扩散法通过测量和比较抑菌环直径评估臭氧化油 (90mg/ml) 对牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌、具核梭杆菌的抑菌作用; 采用微量肉汤稀释法测定臭氧化油对上述三种常见牙周致病菌的最小抑菌浓度(MIC)及最小杀菌浓度(MBC); 通过结晶紫染色法研究臭氧化油对三种细菌生物膜的形成及发展作用。运用激光共聚焦显微镜 (CLSM) 及扫描电镜(SEM)观察臭氧化油对三种细菌形态及生物膜形成的影响。上述实验均重复三次, 并以磷酸盐缓冲液(PBS)作为阴性对照, 以 0.12%氯己定(CHX)、1%碘甘油作为阳性对照。

结果: 臭氧化油对牙龈卟啉单胞菌、伴放线聚集杆菌、具核梭杆菌的抑菌环直径 (mm) 分别为 77.3 ± 2.91 、 16.0 ± 0.38 、 25.1 ± 0.18 , 且对牙龈卟啉单胞菌和具核梭杆菌的抑菌环直径明显大于 0.12%CHX、1%碘甘油, 差别有统计学意义 ($P < 0.001$); 臭氧化油对牙龈卟啉单胞菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 均为 0.0439mg/ml, 臭氧化油对具核梭杆菌的 MIC 和 MBC 均为 0.1758mg/ml, 对伴放线聚集杆菌的 MIC 和 MBC 分别为 5.6250mg/ml、11.2500mg/ml; 同时结晶紫染色法表明臭氧化油对上述三种细菌生物膜的形成及发展均有抑制作用; 激光共聚焦显微镜和扫描电镜观察到臭氧化油对生物膜形成及细菌生物膜形态的破坏作用。

结论: 臭氧化油对三种常见牙周致病菌均有明显的抑制作用,且对牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌的抑菌效果优于 0.12%氯己定及 1%碘甘油,在牙周病的防治中具有潜在的应用前景。

重组人甲状旁腺素 1-34 对人牙髓干细胞牙/骨向分化的影响

葛兴云, 陆嘉敏, 李泽汉, 潘引, 李娜, 庞希瑶, 于金华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学口腔医学院

【摘要】

目的 研究重组人甲状旁腺激素[recombinant human parathyroid hormone 1-34, rhPTH(1-34)]间断处理对人牙髓干细胞增殖以及牙/骨向分化的影响,进一步探讨 rhPTH(1-34) 促进牙/骨形成的机制。

材料与方法 经江苏省口腔医院口腔外科患者的知情同意后,收集完整拔除的 17~20 岁健康人阻生第三磨牙,无菌条件下获取牙髓,酶消化法分离培养多克隆来源的牙髓干细胞,传代培养,取第三代用于实验。实验分组为:对照组和 rhPTH(1-34) 干预组,通过碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性检测、ALP 染色法并结合相关文献确定甲状旁腺素对人牙髓干细胞作用的最佳浓度。用 CCK-8、EdU、流式细胞术方法对细胞增殖情况及细胞周期分布分析。DPSCs 成骨诱导后,分别在 0,3,7 天通过实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹试验 (Western blot) 及免疫荧光试验 (immunofluorescence assay, IFA) 检测牙/骨向分化相关基因蛋白的表达情况;成骨诱导后 14 天,通过茜素红染色观察矿化结节的形成情况。采用 Western blot 的方法检测 NF- κ B 信号通路蛋白磷酸化水平。

结果 通过酶消化法获得纯化的人牙髓干细胞,体外培养呈现成纤维细胞,具有较快的增殖能力,属于间充质来源的成体干细胞。确定 rhPTH(1-34)对人牙髓干细胞的最佳作用浓度为 10^{-9} mol/L。CCK-8 法显示:对照组和 rhPTH(1-34)干预组对人牙髓干细胞增殖无明显影响($P>0.05$);EdU 细胞增殖检测显示:对照组和 rhPTH(1-34)干预组对人牙髓干细胞增殖无明显影响($P>0.05$);流式细胞术检测细胞凋亡情况显示:对照组和 rhPTH(1-34)干预组对人牙髓干细胞增殖无明显影响($P>0.05$);流式细胞术检测细胞周期显示:对照组和 rhPTH(1-34)干预组计算增殖指数分别为 9.57%、9.49%,差异无统计学差异($P>0.05$);实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹试验结果显示:rhPTH(1-34)刺激后相关的基因蛋白 (DSPP/DSPP,Col-1/Col-1,RUNX2/RUNX2,OSX/OSX,OCN/OCN) 表达上调;茜素红染色结果显示:rhPTH(1-34)刺激后可见矿化结节形成,CPC 定量分析钙离子含量升高。蛋白免疫印迹试验结果显示:rhPTH(1-34)激活人

牙髓干细胞 NF- κ B 信号通路。

结论 rhPTH(1-34) 对人牙髓干细胞增殖能力无明显影响, rhPTH(1-34) 可能是通过激活 NF- κ B 信号通路促进人牙髓干细胞的牙/骨向分化能力。

【关键词】 rhPTH(1-34), DPSCs, 牙/骨向分化。

D-Mannose Enhanced Immunomodulation of Periodontal Ligament Stem Cells via Inhibiting IL-6 Secretion

Lijia Guo¹, Yanan Hou², Liang Song³, Siying Zhu⁴, Feiran Lin⁴, Yi Liu⁴

1.Department of Orthodontics School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing, China;2.Department of Orthodontics, Peking University School of Stomatology, The Third Dental Center, Beijing, China;3.Department of Stomatology, The Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai, China;4.Laboratory of Tissue Regeneration and Immunology and Department of Periodontics, Beijing Key Laboratory of Tooth Regeneration and Function Reconstruction, School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing, China

Periodontal ligament stem cell- (PDLSC-) mediated periodontal tissue regeneration has recently been proposed for the new therapeutic method to regenerate lost alveolar bone and periodontal ligament. It was reported that both autogenic and allogeneic PDLSCs could reconstruct damaged periodontal tissues but the regeneration effects were not consistent. The effective methods to improve the properties of PDLSCs should be further considered. In this study, we investigated if D-mannose could affect the immunomodulatory properties of hPDLSCs. After being pretreated with D-mannose, hPDLSCs could inhibit T cell proliferation and affect T cell differentiation into Treg cells. We found that less IL-6 could be detected in D-mannose-pretreated hPDLSCs. In the D-mannose pretreatment group, induced Treg cell number would decrease if increased IL-6 levels could be detected. Our data uncovered a previously unrecognized function of D-mannose to regulate the immunomodulatory function of PDLSCs and that IL-6 might play a key role in this process. The results provided a property method to improve PDLSC-based periodontal regeneration

组蛋白去甲基化酶 KDM4B 促进根尖牙乳头干细胞成骨和成牙本质分化的研究

韩笑² 姚睿¹ 范志朋^{2*}

1.天津医科大学天津市口腔医院儿童口腔科; 2 首都医科大学附属北京口腔医院研究所, 全牙再生及口腔组织功能重建北京市重点实验室

【摘要】

目的 研究组蛋白去甲基化酶 KDM4B 对根尖牙乳头干细胞定向分化能力的影响。
方法 人重组骨形成蛋白 4(BMP4)刺激根尖牙乳头干细胞后检测 KDM4B 的表达;利用慢病毒转染过表达或者基因敲除 KDM4B进行获得性或丧失性功能研究。通过检测碱性磷酸酶 (ALP) 活性、茜素红染色、钙离子定量分析研究根尖牙乳头干细胞体外成骨和成牙本质分化能力。**结果** BMP4 促进根尖牙乳头干细胞 KDM4B 的表达。基因敲除 KDM4B抑制根尖牙乳头干细胞 ALP 活性及体外矿化能力、促进转录因子 PPAR- γ 的表达。过表达 KDM4B 增强根尖牙乳头干细胞 ALP 活性和体外矿化能力。**结论** 组蛋白去甲基化酶 KDM4B 具有促进根尖牙乳头干细胞成骨和成牙本质分化的潜能。

【关键词】 组蛋白去甲基化酶;根尖牙乳头干细胞;成骨和成牙本质分化;KDM4B

Histone demethylase KDM4B enhanced the osteogenic and dentinogenic differentiation potential of stem cells from apical papilla

HAN Xiao,YAO Rui, FAN Zhi-peng.

Beijing Institute of Dental Research, Beijing Key Laboratory of Tooth Regeneration and Function Reconstruction, Capital Medical University School of Stomatology

【Abstract】 Objective To investigate the role of histone demethylase KDM4B (

lysine (K)-specific demethylase 4B) on the osteogenic and dentinogenic differentiation potential of stem cells from apical papilla (SCAPs).

Methods Human recombinant bone morphogenetic protein 4 (BMP4) was used to stimulate the SCAPs. Lentivirus mediated FlagKDM4B or KDM4B ShRNA was used to over-express or knock-down the KDM4B for Gain-of-function or Loss-of-function study. ALP activity assay, Alizarin-red staining and quantitative analysis of calcium were detected to investigate the osteogenic and dentinogenic differentiation capacity of SCAPs in vitro. Results BMP4 stimulated the expression of KDM4B in SCAPs. Depletion of KDM4B inhibited ALP activity and mineralization in SCAPs, and increased the expression of PPAR-gamma. Over-expression of KDM4B enhanced ALP activity and mineralization in SCAPs. **Conclusion** Histone demethylase KDM4B promoted osteogenic and dentinogenic differentiation potential of SCAPs.

【Key words】 Histone demethylase; Stem cells from apical papilla (SCAPs); Osteo and dentinogenic differentiation; lysine (K)-specific demethylase 4B (KDM4B)

极性蛋白 PAR3 在小鼠下颌磨牙成牙本质细胞中的表达浅析

郝新青^{1,2}, 周怡君¹, 胡月¹, 刘苍维¹, 闫广兴¹, 张雪¹, 史册¹, 孙宏晨^{1,3}

1. 吉林大学口腔医学院病理科; 2. 吉林大学口腔医学院儿童口腔科; 3. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室

目的: 本文通过检测极性蛋白 PAR3 在出生后 2 天小鼠下颌磨牙的成牙本质细胞中的表达, 初步探讨其在成牙本质细胞分化晚期对极性的作用。

方法: 选取出生后 2 天的 C57 小鼠, 剪全头, 去除皮毛及软组织, 沿颅中缝切开成半头, 4%多聚甲醛固定一天, 经过 15%的 EDTA 脱钙一周、梯度酒精脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 对左侧半头进行极性蛋白 PAR3 免疫组织化学染色, 观察其在下颌第一磨牙、第二磨牙成牙本质细胞中的表达。

结果: 出生后 2 天的 C57 小鼠下颌第一磨牙牙冠发育较好, 成牙本质细胞呈高柱状, 栅栏状排列, 排列紧密, 细胞核远离基底膜, 胞浆内 PAR3 染色呈现褐色颗粒状阳性染色, 相邻细胞间分隔明显, 细胞核染色呈阴性。下颌第二磨牙牙冠未完成分化, 为

前成牙本质细胞, 靠近第一磨牙的近中尖远中面的成牙本质细胞无高柱状典型结构, 细胞无栅栏状排列, 胞浆及胞核内 PAR3 染色呈现阴性染色, 近中尖的近中面牙尖呈现栅栏状排列, 但高柱状结构尚不明显, 呈现矮柱状, 栅栏状排列, 此时胞浆内 PAR3 染色呈现弱阳性, 胞核 PAR3 染色呈现阴性染色。

结论: 极性蛋白 PAR3 是紧密连接蛋白, 作为顶端极性蛋白复合体在上皮细胞的胞浆顶部呈现阳性表达。本实验中出生后 2 天的小鼠, 下颌第一磨牙和第二磨牙牙冠仍在发育中, 成牙本质细胞也表现出不同的分化状态, 第一磨牙的成牙本质细胞进入分化终末期, 出现典型的高柱状极化结构, PAR3 呈现褐色阳性结果, 表明极性蛋白在已经极化的成牙本质细胞中存在; 第二磨牙成牙本质细胞处于分化早期, 未出现典型极化结构, PAR3 呈现阴性染色或弱阳性结果, 表明极性蛋白此时未建立或正在建立紧密连接, 极化过程刚刚开始, 本实验猜测 PAR3 可能伴随成牙本质细胞的分化过程, 并在分化发育的过程中发挥一定作用。

luxS 基因在变异链球菌和嗜酸乳杆菌混合生物膜形成中的作用

何智妍, 周薇

上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔微生态与系统性疾病实验室, 上海市口腔医学重点实验室/上海市口腔医学研究所, 国家口腔疾病临床研究中心

[摘要]

目的: 研究 luxS 基因在口腔细菌变异链球菌和嗜酸乳杆菌混合培养形成牙菌斑生物膜中的作用。**材料与方法:** 将变异链球菌野生株(UA159)及其两种 luxS 基因突变株(luxS 基因高表达株和 luxS 基因缺陷株)与口腔细菌嗜酸乳杆菌(ATCC4356)按照 1:1 的比例接种于牛心脑浸液培养基, 体外混合培养不同时间, 包括生物膜形成过程中的初期(4 h)、中期(14 h)、晚期(24 h), 通过 MTT 法检测混合菌在生物膜形成的量。通过激光共聚焦显微镜观察混合细菌生物膜的结构, Real time PCR 检测变异链球菌相关基因(ftf, smu630, brpA, gbpB, gtfB, vicR, comDE 和 relA)的表达。**结果:** 变异链球菌野生株及其两种 luxS 基因突变株与嗜酸乳杆菌混合培养 14 h 后, 生物膜的量分别为 0.481 ± 0.024 , 0.591 ± 0.023 和 0.279 ± 0.019 ; 24 h 后混合细菌形成生物膜的量趋势与该时间点一致, 变异链球菌高表达株高于野生株, 而缺陷株明显降低; 但 4 h 后形成的生物膜组间没有差异。激光共聚焦显微镜的结果也表明高表达株和野生株的集

聚程度更高,形成生物膜的结构更加紧密;而缺陷株生物膜菌间结构比较稀疏。以变异链球菌野生株和嗜酸乳杆菌混合形成的生物膜中相关基因的表达为标准,结果发现高表达株相关基因的表达均增加,缺陷株表达均降低,且各组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

结论: luxS 基因会影响变异链球菌和嗜酸乳杆菌混合培养形成的牙菌斑生物膜,为进一步研究该基因在生物膜中的作用及其调控机制提供了基础。

[关键词] luxS 基因; 生物膜; 变异链球菌; 嗜酸乳杆菌

MiR-20a 对破骨细胞分化的影响及其作用机制研究

侯玉帛¹ 王惠宁^{1*}

温州医科大学附属口腔医院 牙周科 浙江省 温州市 325000

目的: 探究 MiR-20a 对破骨细胞分化的影响及相关机制,以期通过靶向基因治疗这一新角度,为治疗牙周炎牙槽骨吸收开辟新的方向。**材料与方法:** 体外细胞模型实验: 1. 通过瞬时转染 MiR-20a mimics 及 inhibitor 后进行破骨诱导,构建 MiR-20a high/low 表达破骨细胞分化细胞模型,应用 CCK-8 及流式细胞术检测 THP-1 细胞增殖和凋亡的影响; 2. 应用 PMA、M-CSF 和 RANKL 诱导 THP-1 破骨细胞分化,检测胞内 MiR-20a 的表达水平; 3. 在确认成功构建 MiR-20a 转染 THP-1 细胞模型后,进一步将实验分为 3 组: Control、miR-20alow 和 miR-20ahigh 等,并加入 M-CSF 和 RANKL 预处理,共培养 3-5d 后,应用 TRAP 染色确定破骨细胞分化水平;应用 qRT-PCR 和 Western blot 方法检测各组:TRAP、NFATc1、PPAR γ 和 PTEN 等相关基因和蛋白的表达水平。**结果:** 1. miR-20a high/low 表达组均可抑制 THP-1 细胞的增殖水平,且该抑制作用与细胞凋亡无关; 2. 在破骨细胞分化过程中,miR-20a 的表达水平在 24h 达到高峰,随后逐渐下降; 3. 与 Control 组相比,miR-20a high/low 表达组 TRAP 染色阳性细胞数显著下降; 4. miR-20ahigh 表达组,靶标基因 PPAR γ 及破骨细胞转录相关 TRAP 和 NFATC1 基因和蛋白水平均明显降低;而对调控破骨细胞前体分化成熟蛋白 PTEN 的表达无明显影响。**结论:** miR-20a 可通过不同途径影响 THP-1 细胞的增殖和凋亡;miR-20a 通过抑制靶基因 PPAR γ (而非 PTEN)及破骨细胞转录相关 TRAP 和 NFATc1 的表达水平,进而抑制破骨细胞分化,提示 miR-20a 对骨组织重塑中的特异性基因表达起到重要的调控作用。

I 型 BMP 受体 ACVR1 介导的 BMP 信号通路在鼠下颌骨发育中的

作用

胡月¹, 史册¹, 王小萌², 刘苍维¹, 闫广兴¹, 郝新青², 周怡君¹, 孙宏晨^{1,3,*}
1.吉林大学口腔医院病理科;2.吉林大学口腔医院儿童口腔科;3.中国医科大学口腔医学院

目的: 下颌骨发育异常会导致进食、发音及美观等问题,严重影响患者身心健康,因此明确下颌骨发育过程中的分子机理具有重要的理论意义。研究表明,在神经嵴细胞中特异性敲除 BMP 配体及受体可导致颅颌面发育异常, ACVR1 作为 I 型 BMP 受体参与 BMP 信号通路的下游转导。本实验旨在研究成骨细胞中 ACVR1 介导的 BMP 信号通路在下颌骨发育中的作用机理。

材料与方法: 首先本实验利用 Cre-Loxp 系统构建的基因敲除小鼠动物模型,杂交得到 Acvr1 条件性基因敲除小鼠 (cKO), 在小鼠早期分化的前成骨细胞及成骨细胞中敲除 I 型 BMP 受体 Acvr1, 于出生后 21 天 (PN21) 收集标本。采用 X-gal 染色证实 Osx-Cre 在前成骨细胞及成骨细胞中表达;采用 micro-CT 观察小鼠下颌骨形态及矿化情况;采用组织形态学观察骨小梁、成骨细胞和破骨细胞的改变;采用免疫组化染色和 real time PCR 方法分别从基因和蛋白水平观察小鼠成骨分化相关指标。

结果: 我们发现前成骨细胞及成骨细胞中 X-gal 染色阳性,证实 Osx-Cre 在细胞中表达激活。出生后 21 天的 Acvr1 基因敲除后小鼠体型减小、体重减轻。Micro CT 和组织形态学测量结果显示小鼠下颌骨骨量减少,骨皮质变薄,骨小梁数量减少。Real time PCR 结果显示 Acvr1 基因敲除的小鼠下颌骨中成骨相关基因 Col 1、BSP、OPN 表达降低。免疫组化结果显示 Acvr1 基因敲除的小鼠下颌骨中表达成骨相关蛋白 Col 1、BSP 阳性率较低。

结论: ACVR1 介导的 BMP 信号通路在成骨细胞的分化中起到重要作用,参与调控下颌骨的发育过程。然而,其与 BMP 受体在股骨中表型有较大差异,因此股骨与下颌骨发育过程中不同的分子机理需要进一步研究阐明。

不同肥胖水平及不同结扎时间点对牙周组织炎症及牙槽骨吸收的影响

黄馨¹ 余挺² 林正梅¹ 轩东英^{3*} 章锦才^{3*}

2018全国口腔生物医学学术年会

CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

1.中山大学光华口腔医学院, 附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室 2.广州医科大学
附属口腔医院, 广州口腔疾病研究所, 口腔医学重点实验室, 牙周科 3.杭州市口腔医
院, 中国科学院大学

目的: 建立不同程度的饮食诱导型肥胖 (DIO16w,30w) 伴实验性牙周炎(P5d, 10d)的小鼠模型, 纵向探讨不同水平肥胖及不同结扎时间点对牙周组织内炎症水平及牙槽骨吸收的影响。

材料与amp;方法: 160 只小鼠随机分为高脂饲料组 (HFD) 和常规饲料组 (ND) 各 80 只, 分别喂以标准的 60 kcal%高脂饲料和 10 kcal%常规饲料; 诱导时间分别为 16 w、30 w, 每组 40 只。诱导时间结束时, 再随机将每组分为结扎 5d 组 (P5d) 和结扎 10 天组 (P10d), 每组 20 只, 进一步细分为真性结扎组 (P 组) 和假性结扎组 (C 组) 各 10 只。P 组采用带菌丝线结扎法诱导实验性牙周炎, C 组做对照处理。诱导期间每周测量小鼠体重, 于 0w、16w、30 w 测量小鼠空腹血糖, 牙周结扎 5 d 或 10 d 处死时测量小鼠睾周、肾周、肠系膜脂肪等内脏重量及系数。亚甲基蓝染色法测量小鼠颌骨垂直性骨丧失。MSD 法检测血清炎症因子水平。RT-PCR 及 IHC 检测小鼠牙龈组织内炎症指标的 mRNA 及蛋白质表达水平。

结果: 从 0w 到 30 w, 小鼠的体重、空腹血糖及内脏重量系数不断升高。在 16w 及 30w 各自时间点, HFD 组小鼠的体重、空腹血糖及内脏重量及系数、睾周脂肪 (EWAT)、肾周脂肪 (PWAT)、肠系膜脂肪 (MWAT) 的重量 (g) 及系数 (%) 均显著性高于 ND 组 ($P < 0.05$); 且 P 组的垂直性骨丧失显著高于 C 组 ($P < 0.05$)。16w 与 30w 相比, P 组的垂直性骨丧失未出现明显加重 ($P > 0.05$), 但结扎 10d 组与结扎 5d 组相比, P 组的垂直性骨丧失呈显著性加重 ($P < 0.05$)。

对相关炎症因子进行检测发现, 在 16w 及 30w 各自时间点, P 组的牙龈组织内 NLRP3, Caspase1, IL1b, IL6, TNFa, NFkb 表达水平均显著高于 C 组, 且结扎 10d 组显著高于结扎 5d 组 ($P < 0.05$), 然而并未发现上述因子在 HFD 组显著高于 ND 组 ($P > 0.05$); 16w 与 30w 相比, 并未发现 HFD 组的牙龈组织 NLRP3 等炎症因子水平随肥胖诱导时间显著性升高 ($P > 0.05$)。

结论: 本研究成功建立了不同程度的饮食诱导型肥胖复合牙周炎的小鼠模型。饮食诱导型肥胖模型的肥胖特征在实验性牙周炎后依然保存, 并且分配均匀; 在牙周感染早期, 肥胖可能对牙周炎导致的硬组织破坏及炎症因子表达水平无显著性不利影响。

Identification of accessible chromatin landscape in the murine odontoblasts

Zhen Huang¹, Jue Xu², Chensheng Lin¹, YiPing Chen^{1,2}, Yanding Zhang^{1*}
¹Fujian Key Laboratory of Developmental and Neuro Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University; ²Department of Cell and Molecular Biology, Tulane University

Abstract

The differentiation of odontoblasts requires unique sets of genes being turned on and off in a differentiation-specific manner. Recent delineation of chromatin modifications at activated gene loci provides new tools to investigate the mechanism of cell differentiation. The transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-Seq) is a fast and sensitive method for assaying chromatin accessibility changes during differentiation. ATAC-Seq has even been performed on single cell, so the high-purity lineage is critical to the quality of the ATAC-Seq results. During odontoblast differentiation, the presumptive odontoblast that is underneath inner enamel epithelium divides into two cells, a daughter cell, induced by the epithelial cells and molecules they produce, differentiates into an odontoblast. Another daughter cell, not exposed to this epithelial signal, persists as a subodontoblast cell. Obviously, odontoblasts were hard to separate from subodontoblasts for analysis of chromatin modifications. In order to precisely isolate the odontoblasts, we cross transgenic mice carrying Cre allele, respectively, with fluorescent Cre reporter mice (*ROSA^{mTmG}*) to label and distinguish odontoblasts from subodontoblasts. Our results show that only *OC^{Cre};ROSA^{mTmG}* mice specifically express Cre-recombinase in odontoblasts, enabling precisely labeling and tracing the fate of presumptive odontoblasts during differentiation. We further use FACS to sort mGFP-expressing odontoblasts from dental pulp of new-born *OC^{Cre};R26R^{mTmG}* mice and then performed ATAC-Seq to detect genomic chromatin accessibility in odontoblasts. In total, 23,204 high-confidence open chromatin peaks were identified. GO enrichment analysis of the nearest neighbor genes in the vicinity of these

odontoblast-specific peaks shows that peaks are enriched for odontoblast differentiation, dentin secretion, dentin mineralization et al. In this study, we establish a method for precisely sorting of murine odontoblasts and identifying the odontoblast-specific chromatin landmarks for elaborating the underlying mechanisms of odontoblastic differentiation.

Keywords: accessible chromatin landscape; odontoblasts; differentiation; ATAC-Seq

生物医学材料

季骏, 童昕, 黄晓峰, 王天丛, 林梓桐, 曹亚洲, 胡勤刚
南京大学医学院附属口腔医院

摘要 HAP (羟基磷灰石) 是人骨组织和骨组织工程支架的重要组成部分, 目前已经合成了很多组织工程支架, 包括酶切寡聚透明质酸/壳糖酸/凝胶, 细胞接种, 干细胞, 尤其是引导性的多能干细胞最近成为组织工程新兴细胞来源。但是, 不同羟基磷灰石纳米粒对来自人类牙周膜成纤维细胞的多能干细胞的分化产生的影响是未知的这项研究的目的是探索接种在两种不同形状 (杆形和球形) 的 HA 纳米粒上的多能干细胞的骨组织分化。首先, 牙周膜成纤维细胞要转化成多能干细胞。其次, 将多能干细胞接种至杆形和球形 HA 纳米粒支架上, 将细胞与支架的复合体进行体外培养。在电子显微镜下, HE 染色, 马松染色, 聚合酶链反应用来检测多能干细胞的形态, 增殖和在不同形状支架上的分化。最后, 体外培养的多能干细胞与支架的结合物移植到皮下 12 周; 空白支架也移植至皮下作为空白对照组。HE 染色, 马松染色和免疫组化染色被用于检测新生骨的再生能力。结果表明, 球形支架对牙周膜成纤维细胞诱导成为多能干细胞并增殖和在体外成骨分化有重要的作用。球形支架与干细胞的结合物能分化成大量骨组织, 然而杆形支架与干细胞结合物则分化成少量骨组织。另外, 空白对照组不能产生骨组织。我们的研究通过使用牙周膜成纤维细胞和球形支架得到了一种有潜力的新的组织工程方法。

参考文献:

[1] Overman J R, Helder M N, ten Bruggenkate C M, Schulten E A, Klein-Nulend J and Bakker A D 2013 Growth

- factor gene expression profiles of bone morphogenetic protein-2-treated human adipose stem cells seeded on calcium phosphate scaffolds *in vitro Biochimie* **95** 2304–13
- [2] Farre-Guasch E *et al* 2013 Human maxillary sinus floor elevation as a model for bone regeneration enabling the application of onestep surgical procedures *Tissue Eng. B* **19** 69–82
- [3] Chai Y C *et al* 2012 Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies *Acta Biomater.* **8** 3876–87
- [4] Spector M 2006 Biomaterials-based tissue engineering and regenerative medicine solutions to musculoskeletal problems *Swiss Med. Weekly* **136** 293–301
- [5] Ikada Y 2006 *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications* 1st edn (Boston, MA: Academic)

脂质体/转化生长因子 $\beta 1$ 促进人牙髓干细胞

成牙本质向分化的实验研究

姜力铭, 宋戈, 陈旭*

中国医科大学附属口腔医院儿童口腔科

目的 研究脂质体 (liposome) 能否携带并缓释转化生长 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 促进人牙髓干细胞 (human dental pulp stem cells, hDPSCs) 的成牙本质向分化, 为牙本质再生提供新方法。

材料和方法 将卵磷脂、丝氨酸、胆固醇按照 7:2:1 的比例溶于氯仿溶液中, 采用真空旋转蒸干法得到 liposome 薄膜, 分别加入去离子水或者 TGF- $\beta 1$ 溶液震荡混匀 15 分钟, 经 Avanti Mini-extruder 逐级过滤得到尺寸为 100 nm 的 liposome 或者 liposomal TGF- $\beta 1$ 微囊泡溶液。利用激光粒子分析仪检测 liposome 和 liposomal TGF- $\beta 1$ 微囊泡的尺寸和电势。ELISA 试剂盒检测游离 TGF- $\beta 1$ 的浓度, 计算 liposome 对 TGF- $\beta 1$ 的包封率和缓释速率。采用 MTT、RT-PCR 和茜素红染色研究 liposome 和 liposomal TGF- $\beta 1$ 对 hDPSCs 增殖和成牙本质向分化的作用。

结果 四种粒子 (liposome, liposomal TGF- $\beta 1$ (1 ng/mL, 5 ng/mL 和 10 ng/mL)) 的粒径约为 100-120 nm, Zeta 电势在 -17~-20 mV 之间。通过 ELISA 法检测 liposome 对 TGF- $\beta 1$ 的包封率分别为 25%, 39.4%和 44.8%, 载药率分别为 2.52 ng/mg, 19.7 ng/mg, 44.85 ng/mg。缓释实验数据表明 liposomal TGF- $\beta 1$ 和单纯 TGF- $\beta 1$ 的初始浓度分别为 9.62 ng/mL 和 7.25 ng/mL, liposomal TGF- $\beta 1$ 组的蛋白

浓度在第 1 小时降低为 6.34 ng/mL, 在随后 9 个小时内浓度呈波动性变化: 经历升高至 9.06 ng/mL (3 小时), 降低为 7.8 ng/mL (6 小时), 再升高至 8.6 ng/mL (9 小时), 而 TGF- β 1 组的蛋白浓度随时间逐渐降低, 该结果证明了 liposome 可以缓慢释放 TGF- β 1, 并在早期可保持其在细胞微环境中的浓度。MTT 结果显示四种粒子生物相容性良好, TGF- β 1 对细胞增殖有促进作用。RT-PCR 结果表明: 第 7 天时, liposomal TGF β 1 (1 ng/mL 组、5 ng/mL 组) 的 Runx-2 水平接近, 约为对照组的 1.9 倍; 单纯 TGF β 1 (5 ng/mL) 的 Runx-2 表达水平约为对照组的 1.3 倍。单纯 TGF β 1 (5 ng/mL) 组 Collagen I 表达最高, 比对照组高 6.1 倍, liposomal TGF β 1 (1 ng/mL 组、5 ng/mL 组) 的 Collagen I 表达是对照组的 2 倍和 3.8 倍。Liposomal TGF β 1 (1 ng/mL 组) 的 DMP-1 和 DSPP 的表达约为对照组的 3 倍, Liposomal TGF β 1 (5 ng/mL) 的 DMP-1 和 DSPP 表达分别为对照组的 3.7 倍和 2.2 倍, Liposomal TGF β 1 (10 ng/mL 组) 对 hDPSCs 的成牙本质分化作用不明显。茜素红染色结果显示 5 ng/mL 的 liposomal TGF- β 1) 钙结节形成量最显著。

结论 Liposome 可以缓释 TGF- β 1 并维持其在细胞外微环境中的浓度, Liposomal TGF β 1 具有促进 hDPSCs 的成牙本质向分化的作用。

碳点介导的内质网应激激活 PERK-eIF2 α -ATF4

信号通路促进成骨细胞分化

金年强¹ 孙宏晨教授^{1,2*}

1. 吉林大学口腔医学院; 2. 中国医科大学口腔医学院

目的: 探究抗坏血酸碳点 (Carbon dots) 促进成骨细胞分化的作用效果及其作用机制;

材料和方法: 以抗坏血酸作为碳源, 用微波法合成了具有荧光性质的且粒径在 1.5-4 nm 之间的抗坏血酸碳点。选取小鼠颅骨来源的 MC3T3-E1 细胞系作为目标细胞。通过体外的茜素红染色、real-time PCR 和 Western Blot 等实验对碳点的促成骨能力进行检测。通过激光显微镜和 Western Blot 实验对碳点的作用机制进行探究。

结果: 通过钙结节形成数量以及成骨 Marker 基因和蛋白水平的表达情况, 表明碳点能够促进成骨细胞的分化。通过对内质网应激 Marker 基因水平和蛋白表达情况的检测以及透射电镜实验, 证明碳点引起了内质网应激并激活 PERK 信号通路。

结论: 我们制备的抗坏血酸碳点具有低毒性、易于制备、价格低廉等优点, 经过实验检验, 抗坏血酸碳点的生物安全性良好, 促骨形成的能力尤为突出, 可应用于临床骨组织疾病的治疗。

组蛋白乙酰化酶 GCN5 降低引起骨质疏松中成骨-成血管偶联紊乱的 机制研究

景欢

中国人民解放军白求恩国际和平医院

目的: 绝经后骨质疏松是老年人中最常见的原发性骨质疏松, 常伴有骨量下降和骨折风险增加, 严重影响了老年人群的生存率和生活质量。骨质疏松的发生基础是骨形成和骨吸收的平衡失调, 之前的研究主要致力于抑制骨吸收, 但是不能从根本上恢复骨形成和骨吸收的平衡。骨血管对于骨内稳态的维持发挥了关键作用, 但是骨血管在骨质疏松发生过程中的作用尚不清楚。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是成骨细胞的前体细胞, 并能产生很多生长因子促进骨血管的形成。研究发现BMSCs的功能在骨质疏松发生过程中受损, 但是具体机制不清楚。因此, 本研究的目的是阐明引起骨质疏松过程中BMSCs功能紊乱的分子生物学机制。**材料和方法:** 在C57BL/6小鼠中, 实施双侧卵巢切除术 (OVX) 建立雌激素缺乏诱导的骨质疏松模型。分离假手术组 (SHAM) 和骨质疏松小鼠 (OVX) 的BMSCs进行体外功能学实验。应用人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 进行血管相关实验。使用实时定量RT-PCR筛选BMSCs成骨分化过程中差异表达的表观遗传学酶GCN5。构建慢病毒载体进行GCN5的功能学实验。使用染色质免疫共沉淀 (ChIP) 实验检测GCN5调控BMSCs成骨和促血管能力的分子机制。骨髓腔注射过表达GCN5的慢病毒载体, 评价GCN5对于骨质疏松小鼠骨量、骨血管和内源性BMSCs功能的影响。**结果:** 骨质疏松过程中, 骨量下降, 骨血管数量减少, BMSCs的成骨分化和促血管形成能力降低。BMSCs的GCN5表达随着成骨诱导时间的延长而逐渐上升, 而在骨质疏松过程中下降。过表达GCN5促进了BMSCs的体外和体内的成骨分化能力和促进血管形成能力。抑制GCN5的表达则降低了BMSCs的成骨和促血管能力。GCN5直接结合到Wnt配体和VEGF的启动子上, 通过增加H3K9ac的水平, 促进了Wnt配体和VEGF的转录, 从而上调了BMSCs的成骨分化和促血管能力。骨髓腔局部注射浓缩的过表达GCN5慢病毒载体, 增加了骨质疏松小鼠的骨量、骨血管数量以及骨髓上清液中骨钙素 (OCN) 和VEGF的水平。骨髓腔注射慢病毒提高了内源性BMSCs中GCN5的表达, 以及BMSCs的成骨分化能力和促血管形成能力。**结论:** 骨质疏松过程中, 成骨-成血管偶

联被扰乱。BMSCs的成骨分化和促进血管形成能力下降。GCN5通过促进Wnt配体和VEGF的转录上调了BMSCs的成骨分化和促血管形成能力。恢复骨质疏松中BMSCs的GCN5表达,可以提高骨质疏松来源BMSCs的成骨分化和促血管能力,预防骨质疏松中的骨量下降和骨血管数量减少。

具核梭杆菌对牙龈成纤维细胞及牙龈基质干细胞生物学活性的影响

康文燕, 冯强

山东大学口腔医学院, 山微生态实验室

摘要:

背景与目的: 慢性牙周炎是口腔流行性疾病, 具核梭杆菌 (*F.nucleatum*) 是其主要致病菌。牙龈组织是病原微生物入侵的第一道防线。牙龈成纤维细胞 (GFs) 及牙龈基质干细胞(GMSCs)是构成牙龈组织的主要结构性细胞。 *F. nucleatum* 对人类口腔组织及口腔细胞的影响及其作用机制还没有被完全评估。本研究旨在研究 *F. nucleatum* 刺激作用下, 牙龈成纤维细胞及牙龈基质干细胞增殖, 炎症反应, 成骨分化等生物学活性的变化, 并对其作用机制进行深入探讨。

材料及方法: 通过 *F. nucleatum* 刺激GFs, 构建体外牙周炎症模型。利用全转录组学测序方法 (RNA-seq) 分析比较 *F. nucleatum* 不同作用时间 (2, 6, 12, 24, 48h) 刺激GFs后细胞内所有基因变化, 并对差异基因从时间序列维度进行比较分析, 对其共有差异基因进行富集分析, 并对其对应通路及相互作用关系进行网络富集分析。利用细胞计数, 流式细胞仪, 实时荧光定量PCR (qRT-PCR), Western blot, 荧光酶标仪, 细胞免疫荧光法检测不同浓度 *F. nucleatum* (*F. nucleatum*: GFs=10, 50, 100, 200, 400) 作用对GFs增殖, 凋亡, 细胞内活性氧 (ROS) 产生, 炎症因子分泌及细胞内信号通路激活的影响。通过碱性磷酸酶 (ALP) 活性测定法, 茜素红染色法, qRT-PCR及Western blot检测 *F. nucleatum* 对GMSCs表面标志物及成骨分化能力的影响。

结果: *F. nucleatum* 能调控GFs基因表达变化, 随着刺激时间的延长, 差异基因表达数目不断增加。 *F. nucleatum* 以剂量依赖性方式抑制GFs增殖, 并促进其凋亡。 *F. nucleatum* 促进细胞内ROS产生, 上调炎症因子 (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α) 的产生, 同时激活NF- κ B, MAPK, AKT信号通路。 *F. nucleatum* 通过增加p65蛋白磷酸化及促进其由细胞质向细胞核内转位来促进NF- κ B信号通路的激活。此外, *F. nucleatum* 对GMSCs干性维持没有影响, 但明显地降低了GMSCs成骨分化能力。

结论: *F. nucleatum* 促进GFs及GMSCs的生物学活性改变并诱导其分子学机制异常。本研究将为深入理解牙周致病菌对口腔免疫系统的影响提供新的思路。

关键词: 牙周病, 具核梭杆菌, 牙龈成纤维细胞, 牙龈基质干细胞

牙龈卟啉单胞菌精氨酸牙龈素保守结构域

cd10913 基因的克隆表达及纯化

雷芳草, 陈敏愨, 王祥柱, 谢晓莉, 张剑英

中南大学湘雅口腔医学院·湘雅口腔医院

[摘要] 目的: 构建牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 精氨酸牙龈素中保守结构域cd10913基因原核表达系统并鉴定表达产物。材料与方法: 提取 *P. gingivalis* ATCC 33277基因组DNA, 聚合酶链反应扩增精氨酸牙龈素保守结构域cd10913基因, T-A克隆后测定核苷酸序列。采用pET-30a(+)质粒构建cd10913基因原核表达载体pET30a-cd10913, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) BL21(DE3)宿主菌中用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导目的重组融合蛋白peptidase_C25_N_gingipain的表达 (N端带有6个组氨酸标签)。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白质印迹法 (Western blotting) 进行分析, 透射电镜观察包涵体结构, 镍离子金属亲和层析法 (Ni-NTA) 提纯表达产物, Bradford法定量纯化蛋白的浓度。**结果:** 成功克隆目的基因cd10913片段, 约为1035 bp, 测序结果与GeneBank中国际标准株 *P. gingivalis* ATCC33277的Arg-gingipain等位基因序列100%一致 (GenBank: D64081.1)。所构建的表达载体pET30a-cd10913经双酶切和琼脂糖凝胶电泳后, 在预期位置上可见目的条带, 插入的目的基因序列和方向正确。SDS-PAGE和Western blotting结果表明, 1 mM IPTG能有效诱导重组融合蛋白peptidase_C25_N_gingipain的表达, 最佳诱导条件为37°C、4 h; 表达产物主要以包涵体形式存在, 分子量大小约为39 kDa, 与预期蛋白分子量相符; 蛋白包涵体在透射电镜下表现为中等电子密度聚合体。通过变性-复性最终得到可溶性蛋白, Bradford法测定纯化后目的蛋白的浓度为0.8 mg mL⁻¹, 纯度约为85%。**结论:** 本实验成功构建了牙龈卟啉单胞菌精氨酸牙龈素保守结构域cd10913基因的原核表达载体pET30a-cd10913, 并在大肠杆菌中获得表达和纯化, 为进一步制备单克隆抗体和研制开发预防牙周炎的亚单位蛋白疫苗奠定了实验基础。

[关键词] 精氨酸牙龈素; 重组蛋白表达; 包涵体; 牙周炎

Cloning, expression and purification of the conserved domain *cd10913* of arginine-specific gingipains from *Porphyromonas Gingivalis* ATCC33277

[Abstract] Objectives: To construct prokaryotic expression system of the conserved domain *cd10913* of arginine-specific gingipains (Arg-gingipain) from *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and to identify, purify the products.

Methods: The genomic DNA of *P. gingivalis* ATCC33277 was isolated and the target fragments of *cd10913* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR). After being inserted into a T-A cloning vector and sequenced, the correct fragments were linked with a prokaryotic expression vector pET-30a(+) to construct the recombinant expression plasmid pET30a-*cd10913*. The pET30a-*cd10913* was confirmed by proper restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis, and then transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) competent cells. Expression of the recombinant protein peptidase_C25_N_gingipain (N-terminus 6×His tag) was induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), and further purified using a Ni²⁺-NTA affinity chromatography. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), western blotting and transmission electron microscopy (TEM) analysis were utilized to examine the fusion protein and its inclusion bodies. Protein concentrations were determined by Bradford method.

Results: A 1035 bp fragment of *cd10913* was amplified successfully and verified by sequencing. Results showed that the homology of the nucleotides reached to 100% between the target fragments and the sequences of *P. gingivalis* strain ATCC33277 Arg-gingipain reported in Genebank (GenBank: D64081.1). The restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis results demonstrated that the target fragments from the constructed expression vector pET30a-*cd10913* was located at the expected positions with correct sequences and directions. SDS-PAGE and Western blotting analyses illustrated IPTG at a dosage of 1 mM could efficiently induced expression of peptidase_C25_N_gingipain. The optimal temperature and time interval for induction was at 37°C for 4 h. The fusion proteins were about 39 kD in size and expressed mainly in the form of inclusion bodies (IB), which showed up as

polymers with moderate electron density under TEM observation. Soluble proteins were obtained by a denaturation-renaturation method, and the purified recombinant proteins reached a purity of about 85% at a concentration of 0.8 mg mL⁻¹. **Conclusion:** The recombinant prokaryotic expression vector of pET30a-cd10913 was constructed and was expressed successfully in *E. coli* BL21 (DE3). This study laid solid foundation for further preparing monoclonal antibodies of Arg-gingipain of *P. gingivalis* and developing the subunit protein vaccine to prevent periodontitis.

[Key words] Arginine-specific gingipains; Expression of recombinant protein; Inclusion body; Periodontitis

煅烧牙本质通过 ERK/P38 MAPK 信号通路促进 骨髓基质细胞的成骨分化

雷港 于金华[#]

南京医科大学口腔医学院 江苏省口腔疾病研究重点实验室

【摘要】目的: 主要探讨煅烧牙本质 (DA) 对大鼠骨髓基质细胞的成骨诱导分化能力, 并检测MAPKs信号通路在其分化过程中的作用。**方法:** 利用CCK-8法、流式细胞术分析、Edu检测DA对大鼠骨髓基质细胞增殖能力的影响; 通过碱性磷酸酶活性测定, 碱性磷酸染色, 茜素红染色, RT-PCR 及Western blot 检测DA对细胞的成骨诱导分化作用及相关成骨基因/蛋白的表达情况; 制备大鼠颅骨缺损模型 (5mm缺损, 双侧各一), 使用DA进行缺损修复, 4周、8周、12周后进行Micro-CT检测, HE染色及IHC染色检测新骨形成情况, 组织形态及相关成骨蛋白的表达。利用Western blot检测DA诱导后骨髓基质细胞MAPKs信号通路磷酸化水平; RT-PCR及Western blot检测MAPKs信号通路被特异性抑制后, DA对细胞的成骨分化相关基因及蛋白的表达情况。**结果:** DA作用后骨髓基质细胞的增殖能力没有影响, 而细胞的碱磷酶活性增高, 碱磷酶染色增强, 茜素红染色增强。RT-PCR及Western blot显示DA作用后*RUNX2/RUNX2*, *OSX/OSX*,

OCN/OCN, OPN/OPN, COL-1/COL-1, DSPP/DSPP表达上调。Micro-CT及HE染色显示DA可以促进大鼠颅骨缺损的修复；IHC染色可见RUNX2, OSX, OCN 阳性表达均强于未刺激组。此外，Western blot结果显示DA可以激活基质细胞的P38 MAPK 信号通路，而RT-PCR结果表明ERK/P38 MAPK通路被特异性抑制后(U0126及SB203580)，DA均不能上调RUNX2/RUNX2, OSX/OSX, OCN/OCN的表达水平。**结论：**DA可促进骨髓基质细胞的成骨向分化，促进骨组织缺损的修复，且ERK/P38 MAPK 信号通路在其分化过程中发挥重要作用。

关键词：骨髓基质细胞；MAPK 信号通路；煅烧牙本质

Dentine ash (DA) enhance osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells via ERK and P38 MAPK pathways

Lei gang Yu jinhua[#]

Key Laboratory of Oral Diseases of Jiangsu Province and Stomatological Institute of
Nanjing Medical University

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; MAPK pathways; dentin ash;

Abstract

Objective: To assess the effects of DA on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). And identify the effect of P38/ERK MAPK pathways in the osteogenic differentiation. **Methods:** Effects of DA on the proliferation of BMMSCs were investigated by CCK-8, cell cycle analysis and Edu analysis. ALP activity, ALP stain, alizarin red stain, RT-PCR and western blot were evaluated *in vitro* to analyze the effects of DA on the osteogenic differentiation of BMMSCs and the expression of osteogenic genes/proteins. DA was transplanted into preformed 5-mm calvarial defects (two per rat). All retrieved tissues at 4, 8 and 12 weeks post-transplantation were processed for Micro-CT, HE staining and immunohistochemical staining for detecting the mineralization, morphological characteristics and the expression of osteogenic proteins. The levels of phosphor-P38, phosphor-ERK1/2 and phosphor-JNK in DA treated cells were elucidated by western blot. The expression of osteogenic genes and proteins were studied by RT-PCR and western blot when the P38, ERK and JNK MAPK were inhibited. **Results:** ALP activity, ALP stain, alizarin red stain, and osteogenic genes/proteins expression

included *RUNX2/RUNX2*, *OSX/OSX*, *OCN/OCN*, *OPN/OPN*, *COL-1/COL-1*, *DSPP/DSPP* were evaluated when treated with DA. *In vivo* transplantation illustrated that DA treated calvarial defects generated more mineralized tissues, and presented stronger expression of *RUNX2*, *OSX* and *OCN* than Control group. Western blot results showed that the levels of phosphor-P38 and phosphor-ERK in DA treated cells were upregulated. However, the level of phosphor-JNK was not affected and realtime RT-PCR results showed that DA cannot upregulated the expression of *RUNX2*, *OSX* and *OCN* mRNA when the ERK MAPK and P38 MAPK were inhibited. **Conclusion:** DA may enhance the osteogenic differentiation of rat BMMSCs via ERK and P38MAPK pathways and has a high osteoconduction capacity, suggesting that it is a useful bone substitute.

仿生矿化材料牙粉对牙周膜干细胞的成骨向分化的影响及机制研究

李娜, 李泽汉, 潘引, 雷港, 于金华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学口腔医学院

目的: 观察仿生矿化材料牙粉对牙周膜成骨向分化能力的作用, 并且对其机制进行研究, 为牙周病的治疗提供一种新的治疗方法。

方法: 选用成人完整的牙齿, 去除表面软组织及牙结石等自然烘干后, 在300°C的条件下煅烧30分钟后, 研磨成粉, 制成仿生矿化材料牙粉。利用仿生矿化材料牙粉制作浸提液后配制成不同浓度, 与牙周膜干细胞共培养, 通过碱性磷酸酶ALP活性测试筛出最佳浓度, 然后利用此浓度对牙周膜干细胞进行诱导, 并且利用ALP染色进行验证。利用CCK-8和流式细胞分析技术研究其对牙周膜干细胞增殖能力的影响, 用细胞划痕实验和Transwell 实验研究煅烧牙粉对牙周膜干细胞迁移能力的影响, 利用蛋白质免疫印迹技术western blot, 实时定量聚合酶链式反应RT-PCR和免疫荧光染色检测其对牙周膜干细胞成骨指标*OCN*, *OPN*, *RUNX2*, *OSX*, *COL-1*表达的影响, 利用茜素红染色检测其对牙周膜干细胞的矿化能力的影响, 通过western blot检测牙粉对NF- κ B通路的作用, 加入NF- κ B通路抑制剂通过蛋白质免疫印迹技术, 实时定量聚合酶链式反应RT-PCR, 碱性磷酸酶染色和茜素红染色来检测牙周膜干细胞的成骨向分化能力的影响。

结果: ALP活性测试筛选出仿生矿化材料牙粉的最佳刺激浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CCK-8和流式细胞分析技术结果显示牙粉对牙周膜干细胞增殖能力没有影响, 细胞划痕实验和Transwell 实验结果表明仿生矿化材料牙粉对牙周膜干细胞迁移没有明显影响, western blot, RT-PCR和免疫荧光染色结果显示仿生矿化材料牙粉上调牙周膜干细胞OCN, OPN, RUNX2, OSX, COL-1的表达量, western blot结果显示仿生矿化材料牙粉激活了NF- κ B通路, 使用NF- κ B通路抑制剂BMS345441抑制NF- κ B通路后, 蛋白质免疫印迹技术western blot, 实时定量聚合酶链式反应RT-PCR验证牙周膜干细胞成骨指标OCN, OPN, RUNX2, OSX, COL-1的表达量下调, 碱性磷酸酶染色结果显示加入抑制剂后, 牙周膜干细胞的碱性磷酸酶活性下降, 茜素红染色结果显示牙周膜干细胞矿化结节形成明显减少, 显示抑制NF- κ B通路后牙周膜干细胞成骨能力下降。

结论: 仿生矿化材料牙粉通过激活NF- κ B通路促进牙周膜干细胞成骨向分化

CD10 是头颈部鳞状细胞癌的一种潜在预后标志物

李庆祥, 王逸飞, 郭玉兴, 郭传斌
北京大学口腔医学院 口腔颌面外科

研究目的: 明确CD10的表达情况与头颈部鳞状细胞癌患者预后的关系, 并初步探索其可能的内在机制。

研究方法: 从癌症基因组图谱TCGA数据库和人类肿瘤相关基因表达汇编GEO数据库中, 获取头颈部鳞状细胞癌相关数据集, 筛选CD10基因表达谱及相应患者的临床信息, 分析CD10的表达与临床病理学参数的相关性及其对预后的影响。利用上述数据进行基因集富集分析, 寻找CD10的表达相关基因, 绘制富集分析网络图。收集北京大学口腔医院有详细随访资料的头颈部鳞状细胞癌切除标本28例, 应用免疫组织化学染色方法检测肿瘤组织中CD10的表达情况, 并根据文献中报道的评分标准进行打分, 分析CD10的表达情况与相应患者临床病理参数及预后的相关性。选用人舌鳞癌细胞系WSH-HN6, 利用磁珠分选将之分为CD10阳性 (+) 及CD10阴性 (-) 两群细胞。分别通过CCK-8实验、划痕愈合实验、Transwell侵袭实验和平板克隆形成实验, 检测两群细胞的增殖、运动、侵袭和克隆形成能力。通过流式分析检测两群细胞的周期比例。将两群细胞以不同数量植于BALB/c裸鼠背部皮下, 3周后观察成瘤效果。

研究结果: GSE58911、GSE107591等与头颈部鳞状细胞癌相关的GEO芯片数据显示,在肿瘤组织中CD10的mRNA表达均高于癌旁组织 ($p < 0.05$)。TCGA数据分析显示,在522例头颈部鳞状细胞癌组织样本中,CD10的表达量是44例正常组织样本的2.3倍 ($p < 0.05$)。此外,在结直肠癌、食管癌等多种实体肿瘤中,CD10的表达量亦高于正常组织。经过数据筛选和过滤,得到517例临床信息完整的样本。依据受试者工作特征曲线(ROC曲线),划定CD10表达量临界值,517例样本中342例为CD10高表达,175例为CD10低表达。通过卡方检验得出,肿瘤组织中CD10的表达量与患者的生存状态高度相关 ($p = 0.007$),也与患者的HPV感染状态(p16试验)高度相关 ($p < 0.001$)。生存分析显示,肿瘤组织中CD10的表达量与患者的整体生存时间相关 ($p = 0.011$),同时,单因素及多因素分析显示,前者是后者的非独立影响因素。细胞实验中,CD10(+)细胞的侵袭能力明显强于CD10(-)细胞,且更多的细胞处于静止期,体现出干细胞特性。体内实验中,植入细胞数量为 5×10^5 时,两群细胞的成瘤率均为8/8;植入细胞数量为 5×10^4 时,CD10(+)细胞成瘤率为5/8,CD10(-)细胞成瘤率为0/8;此外,CD10(+)细胞的植入数量达到 1×10^4 时,仍能成瘤。

研究结论:

- 1.CD10在头颈部鳞状细胞癌组织中表达量高于癌旁或正常组织。
- 2.CD10在头颈部鳞状细胞癌组织中表达量与患者的生存状态相关,可以作为一种潜在的预后标志物。
- 3.CD10可以促进肿瘤的形成。

口腔扁平苔藓癌变中组织原位 T 淋巴细胞特征的初步研究

李群星 房娟 程斌* 王智*

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院·广东省口腔医学重点实验室

摘要:

目的: 通过检测口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OLP)及其癌变组织中组织原位T淋巴细胞特征变化,探究OLP转变为口腔鳞癌过程中可能的免疫机制。**方法:** 收集35例OLP及其癌变的组织标本并制备石蜡切片。利用免疫荧光染色技术对T淋巴细胞亚群(CD4、CD8)、活化分子CD69、增殖标记Ki67、耗竭性分子(PD-1、CTLA-4)进

行染色，并根据染色结果进行定量分析。利用配对T检验分析OLP及其癌变区中不同指标的表达差异。**结果：**与OLP相比，OLP癌变区域CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞比例（CD4⁺/CD8⁺）无明显差异（ $p>0.05$ ）；活化的T淋巴细胞（CD69⁺T细胞）在OLP癌变后增加（ $p<0.001$ ）；耗竭的T淋巴细胞（PD-1⁺T细胞、CTLA4⁺T细胞）在OLP发生癌变后数量均增加（ $p=0.012$ ； $p<0.001$ ）；T淋巴细胞增殖（ki67⁺细胞）能力在OLP癌变前后无明显差异（ $p>0.05$ ）。**结论：**口腔扁平苔藓组织原位T淋巴细胞活化及耗竭参与了口腔扁平苔藓癌变过程。

关键词：口腔扁平苔藓；癌变；T淋巴细胞活化；T淋巴细胞耗竭；

The study of tissue-resident T cells in Oral lichen planus and its malignant transformation

Li Qunxing, Fang Juan, Cheng Bin, Wang Zhi.

Department of Oral Medicine, Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology

Abstract

OBJECTIVES: To identify and analyze the characteristics of Infiltrating T lymphocytes in oral lichen planus and its malignant transformation. **METHODS:** The expression of CD4, CD8, CD69, Ki67, PD-1, CTLA-4 was examined using immunofluorescence (IF) in serial sections of paraffin-embedded tissue samples from 35 OLP patients with malignant transformation. The number of positive lymphocytes was evaluated. Using matched t test to compare the expressions of the immune cells between OLP and its malignant transformation. **RESULTS:** When OLP progressed to OSCC, there is no significant difference on the CD4⁺/CD8⁺T cells ratio and the number of T-cell proliferation (Ki67⁺ T cells); The number of activated T lymphocytes(CD69⁺T) increased($p<0.001$); The proportion of exhausted T (PD-1⁺T、CTLA4⁺T) cells increased($p=0.022$; $p<0.001$). **CONCLUSIONS:** The activation and depletion of tissue-resident T cells in the oral lichen planus are involved in the malignant transformation of oral lichen planus

KEY WORDS: Oral lichen planus, malignant transformation, Activated T cells, T cell Exhaustion,

重度牙周炎牙齿牙骨质微观结构及牙髓组织学变化

李向春, 胡亮, 王松灵

首都医科大学附属北京口腔医院牙再生与口腔组织功能重建北京市重点实验室

目的: 关于慢性牙周炎和牙髓/牙骨质变化的关系鲜有报道。本研究旨在探讨慢性重度牙周炎对牙髓/牙骨质组织病理学状态的改变。

方法: 收集80颗因慢性重度牙周炎拔除的磨牙作为实验组, 以50颗第三磨牙作为正常对照。通过扫描电子显微镜观察牙骨质的微观结构, 用苏木精/伊红 (HE) 对牙髓进行组织学染色。同时, 通过免疫组织化学染色 (IHC) 和蛋白质印迹检测IL-17的变化。检测氧化应激指标, 活性氧自由基 (ROS) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 等的变化。同时检测Caspase3、TUNEL、LC3B和P62水平的变化。

结果: 牙骨质表面上部及中部呈皲裂状态, 牙髓处于炎症和氧化应激状态。重度牙周炎牙齿牙髓组织中IL-17的表达水平增加, 并且ROS、Caspase3、TUNEL等氧化应激及凋亡标志物表达高于正常牙髓, SOD1水平明显下降。然而, 自噬标志物LC3B和P62含量在牙周炎牙髓中表达均明显上升。

结论: 慢性重度牙周炎影响牙骨质的微观结构和牙髓的组织学状态。牙髓处于炎症和氧化应激状态, 与正常牙髓相比, 细胞凋亡水平升高, 自噬水平异常。

关键词: 慢性重度牙周炎, 牙髓, 牙骨质, 炎症, 氧化应激, 细胞凋亡, 自噬

人根尖牙乳头干细胞成骨分化相关的环状 RNA 表达谱特征

李泽汉, 潘引, 汪延秋, 李娜, 闫明, 于金华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学口腔医学院

【摘要】

目的 观察人根尖牙乳头干细胞(Stem cells from apical papilla, SCAPs)成骨分化过程中环状RNA(Circular RNA, circRNA)的表达谱变化, 为基于干细胞的牙根组织工程再生提供实验和理论依据。

材料与方法 经江苏省口腔医院口腔外科患者的知情同意后, 收集完整拔除的17-20岁健康人阻生第三磨牙, 牙齿表面灭菌处理后, 无菌条件下取出根尖牙乳头, 酶消化法及有限稀释法分离培养多克隆来源的根尖牙乳头干细胞, α -MEM 培养, 流式细胞术(FCM)检测 STRO-1、CD73、CD90、CD105 等间充质干细胞标志; 以普通完全培养基及成骨诱导分化培养基培养7d后的SCAPs为研究对象, qRT-PCR检测 *OCN*、*RUNX2*、*OSX*、*ALP*的表达, 同时结合茜素红染色和cpc定量法证实矿化诱导成功。分别提取两组(每组设置3个生物学重复)总RNA, 经探针去除rRNA, RNase R去除线性RNA后, 构建环状RNA文库。通过组间比对筛选出成骨诱导分化前后2倍变化幅度的差异circRNA。并通过KEGG Pathway 和Gene Ontology (GO) 对表达量有差异的环状RNA的亲本基因进行分析。

结果 成功构建矿化诱导7d的SCAPs模型。通过测序分析, 我们在对照组中共检测到27630个circRNA, 在实验组中共检测到26926个circRNA。这些环状RNA长度主要分布在200-1000bp的长度范围内。其中300-400bp占的比值最高。通过组间对比, 我们一共发现了36835个差异表达的circRNA。进一步, 以 $P < 0.05$ 、Fold Change > 2 为条件进行筛选, 我们发现共有650条差异显著的circRNA: 与对照组相比, 矿化诱导组中有333个circRNA是高表达的; 217个circRNA是低表达的。通过GO分析, 我们发现这些差异表达的circRNA宿主基因主要参与细胞的代谢过程以及生物调控。同时, 通过KEGG分析, 这些宿主基因与肌动蛋白细胞骨架调节、MAPK信号通路、细胞内胞吞作用等有密切的关系。

结论 经鉴定, 分离出的多克隆根尖乳头细胞为间充质来源干细胞。SCAPs成骨诱导分化前后, circRNA表达谱发生显著变化, 提示差异表达的circRNA可能与SCAPs成骨向分化密切相关。

【关键词】 人根尖牙乳头干细胞; 成骨分化; 环状RNA; circRNA

bFGF 与 BMP-2 序贯应用人牙周膜干细胞成骨分化的影响

背景与目的: 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)能促进干细胞增殖、迁移并维持其干细胞特性, 但抑制干细胞成骨分化。骨形态发生蛋白-2(BMP-2)能促进干细胞成骨分化。人牙周膜干细胞(hPDLSCs)在骨再生中起重要作用, 促进内源性hPDLSCs成骨分化是组织再生研究的热点。bFGF及BMP-2联合应用具有一定的促进骨再生作用, 但这两种生长因子序贯应用于hPDLSCs的效果尚未见报道。本研究通过体外实验探讨bFGF和BMP-2序贯应用对hPDLSCs增殖、迁移和成骨分化的影响, 并在此基础上构建共载bFGF和BMP-2的纳米纤维支架序贯释放体系, 实现bFGF和BMP-2序贯应用。

材料与amp;方法: 通过有限稀释法分离培养hPDLSCs。通过细胞计数法、细胞迁移法、碱性磷酸酶(ALP)活性测定法、茜素红染色法、定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白印迹分析法检测以不同方式应用bFGF和BMP-2对hPDLSCs增殖, 迁移和成骨分化的作用。根据序贯应用结果通过同轴静电纺丝技术制备共载bFGF和BMP-2的壳-芯结构纳米纤维支架。通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定bFGF和BMP-2的释放曲线。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)表征纳米纤维的化学结构。通过扫描电镜(SEM)观察纳米纤维支架结构及其负载的hPDLSCs形态。通过细胞计数法、碱性磷酸酶(ALP)活性测定法, qRT-PCR检测共载bFGF和BMP-2的纳米纤维支架对hPDLSCs的增殖、成骨分化的作用。

结果: 序贯应用25ng/ml bFGF和50ng/ml BMP-2组可以上调hPDLSCs的ALP活性, 促进其钙盐沉积。此外, 序贯组中ALP, 骨涎蛋白(BSP), runt相关转录因2(*Runx2*), 骨钙蛋白(OCN)和骨桥蛋白(OPN)基因表达均显著上调。蛋白印迹分析进一步证明, 序贯应用上调了ALP和Runx2的蛋白表达水平。bFGF和BMP-2的释放曲线表明bFGF于前8天释放近80%, 达到平台期, 而BMP-2前8天释放则少于30%, 28天释放达70%。FT-IR证明纳米纤维保留原材料的化学性质。SEM观察发现支架材料为光滑的纳米纤维, 细胞于其表面呈三维结构生长。共载bFGF和BMP-2的纳米纤维支架组可以上调hPDLSCs的ALP活性, 该组ALP, BSP, *Runx2*, OCN和OPN基因表达均显著上调。

结论: bFGF和BMP-2序贯应用促进了hPDLSCs的成骨分化。据此制备的同轴静电纺丝可实现bFGF和BMP-2的序贯释放, 并促进hPDLSCs的成骨分化, 其在制备过程中未改变原材料的化学性质, 同时长时间保留了因子的生物学活性。支架材料为hPDLSCs提供了一个三维生长的网状支架, 更有利于细胞黏附、增殖、分化。bFGF和BMP-2的序贯应用将为牙周再生提供新的方法与策略。

载 rhAm 介孔羟基磷灰石/壳聚糖对 hPDLCs 成骨作用的研究

廖悦¹, 周薇², 宋忠臣^{1#}

1.上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周病科;2.上海交通大学医学院附属第九人民医院上海口腔医学研究所口腔微生态与系统性疾病实验室

目的: 牙周炎是常见的口腔疾病,也是导致我国成人失牙的主要原因。经过牙周治疗后,炎症可以得到一定控制,但是造成的牙周缺损却很难恢复。近年来学者们希望通过组织工程技术达到牙周组织再生,恢复其组织结构和完整的功能。本研究旨在通过合成介孔羟基磷灰石/壳聚糖(mesoporous hydroxyapatite/chitosan, mHA/CS),并观察载重组人釉原蛋白(Recombinant human amelogenin, rhAm)的介孔羟基磷灰石/壳聚糖(rhAm/mHA/CS)对人牙周膜细胞的成骨作用,为该组织工程技术的临床应用提供实验依据。

材料与方法: 利用水热法制备mHA/CS支架,并通过傅里叶红外光谱(FI-TR)、透射电子显微镜(TEM)及比表面积(BET)等检测验证其理化性能;将mHA/CS粉末加入人牙周膜细胞(hPDLCs)的培养基中,检测hPDLCs活性变化;通过ALP染色、PCR及Western blot技术检测载rhAm的mHA/CS支架对hPDLCs成骨作用的影响。

结果: 本实验利用水热法成功制备出mHA/CS支架, mHA颗粒为短棒状介孔结构,宽约20~30 nm,长约50~100 nm。mHA与CS复合交联后,形成球状团聚体,直径约为2 μm。而介孔结构直径为7 nm,孔径均一,其比表面积为33.95 m²/g。MTT法结果表明4.5 mg/ml的mHA/CS对hPDLCs无细胞毒性。ALP染色结果表明载20 μg/ml rhAm能显著提高碱性磷酸酶活性,促进hPDLCs在体外的成骨分化。PCR及Western blot结果表明载20 μg/ml rhAm的mHA/CS支架能显著上调hPDLCs的RUNX-2、OPN、DLX-5的基因及蛋白的表达,能够促进hPDLCs的成骨作用。

结论: mHA/CS作为牙周组织再生的支架材料不仅具有良好的理化性能,而且对人牙周膜细胞(hPDLCs)无细胞毒性。载20 μg/ml rhAm的mHA/CS支架能显著促进hPDLCs的成骨分化,上调hPDLCs的成骨基因及蛋白的表达,在体内促进新骨形成,有利于牙周组织再生。

糖尿病骨髓间充质干细胞自噬，衰老及成骨分化特征

林佳琳¹ 张平^{1, 2} 沈想¹ 徐荣耀¹ 朱伟文¹ 傅瑜^{1, 2} 江宏兵^{1, 2, *}

1南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室

2南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

目的: 糖尿病骨髓间充质细胞(DM-BMSCs)功能受损是糖尿病骨再生修复障碍的主要原因,为了探索DM-BMSCs成骨分化障碍的机制, 对比研究DM-BMSCs和正常BMSCs自噬, 衰老及成骨分化的特征, 为下一步研究DM-BMSCs成骨分化障碍的调控机制提供实验依据。

方法: (1) 体外分离培养DM-BMSCs和正常BMSCs, 其中DM-BMSCs培养基采用DMEM高糖培养基, 正常BMSCs培养基采用DMEM低糖培养基, 细胞传代至第三代, 显微镜下观察细胞形态; (2) DM-BMSCs和正常BMSCs无血清培养6小时后利用Western Blot检测自噬蛋白LC3-I和LC3-II的表达,半定量分析LC3-II/LC3-I比值,细胞免疫荧光技术分析LC3表达(RA,雷帕霉素; Cq,氯喹); (3) SA- β -gal染色检测DM-BMSCs和BMSCs衰老表型,定量分析阳性细胞数; (5) DM-BMSCs和正常BMSCs成骨诱导7天后茜素红染色分析钙结节形成量并且半定量分析结果。

结果: (1) 镜下可见DM-BMSCs细胞较大, 核浆比小, 而BMSCs胞浆小, 核浆比大; (2) 与BMSCs相比, DM-BMSCs无血清培养环境下自噬激活能力明显下降, 通过应用自噬激动剂雷帕霉素和抑制剂氯喹分析LC3-I, LC3-II 以及P62的表达, DM-BMSCs自噬激活早期即自噬体形成阶段受到了抑制(RA,雷帕霉素; Cq,氯喹); (3) 与BMSCs相比, DM-BMSCs衰老表型明显增强, 表现为阳性细胞数增多; (4) 与BMSCs相比, DM-BMSCs 成骨分化能力下降, 表现为钙结节形成能力下降, 成骨相关基因呈现低表达。

结论: 与BMSCs相比, DM-BMSCs自噬能力下降, 衰老表型增强, 成骨分化能力下降。

自噬对上颌窦黏膜间充质干细胞成骨分化的影响

林彦君^{1,2}, 吴东¹

目的:

研究不同自噬水平对上颌窦黏膜间充质干细胞(maxillary sinus mesenchymal stem cells, MSMSCs)成骨能力变化的影响。

材料与方法:

分离培养3周龄SPF级SD大鼠上颌窦黏膜间充质细胞,使用第3代MSMSCs加入含有1nM、10nM、50nM、100nM的雷帕霉素(RAPA, rapamycin)诱导MSMSCs48小时,电镜检测自噬小体形成数量,MDC染色法检测自噬水平。自噬诱导48小时后成骨诱导液14天,碱性磷酸酶(ALP, alkaline phosphatase)定量检测ALP活性,茜素红染色检测钙化结节,实时荧光定量PCR检测诱导后细胞成骨相关基因的表达差异,Wetern blot检测诱导后成骨相关蛋白表达的差异。

结果:

- [1] RAPA诱导48小时后,1nM、10nM、100nM、1000nM组透射电镜下形成数量相比对照组依次增加。MDC染色法荧光倒置显微镜下可见1nM、10nM、100nM、1000nM组着色依次增加。
- [2] 成骨诱导14d后,碱性磷酸酶活性结果为1nM组(0.992 ± 0.283),10nM组(1.398 ± 0.312),100nM组(1.193 ± 0.245),1000nM组(0.488 ± 0.384),对照组(0.985 ± 0.211)。10nM组和100nM组ALP活性较对照组表现明显促进($p < 0.05$),1000nM组ALP活性较表照组出现明显抑制($p < 0.05$)。矿化结节数量10nM组 > 100nM组 > 1nM组 > 1000nM组,1nM组矿化结节数量和对照组相近。
- [3] Runx-2基因相对表达量1nM组(1.103 ± 0.243),10nM组(1.462 ± 0.154),100nM组(1.282 ± 0.223),1000nM组(0.652 ± 0.218),其中10nM组较对照组(1.0 ± 0.0)显著表达($p < 0.05$),1000nM组较对照组显著抑制($p < 0.05$);OPN基因相对表达量1nM组(1.378 ± 0.295),10nM组(3.632 ± 0.312),100nM组(2.865 ± 0.303),1000nM组(0.237 ± 0.288),其中10nM组较对照组(1.0 ± 0.0)显著表达($p < 0.05$),1000nM组较对照组显著抑制($p < 0.05$);OCN基因相对表达量1nM组(1.034 ± 0.198),10nM组(1.948 ± 0.217),100nM组(1.865 ± 0.204),1000nM组(0.366 ± 0.281),其中10nM组较对照组(1.0 ± 0.0)显著表达($p < 0.05$),1000nM组较对照

组显著抑制 ($p < 0.05$)

[4] RUNX2蛋白相对表达量10nM组 > 100nM组 > 1nM组 > 1000nM组; OPN蛋白相对表达量10nM组 > 100nM组 > 1nM组 > 1000nM组; OCN蛋白相对表达量10nM组 > 100nM组 > 1nM组 > 1000nM组。

结论:

研究结果显示自噬具有调节大鼠MSMSCs成骨分化的能力。低浓度的RAPA (10nM、100nM) 促进大鼠MSMSCs的成骨分化; 高浓度的RAPA (1000nM) 抑制大鼠MSMSCs的成骨分化。这提示在上颌窦提升术的过程中可以通过调节上颌窦黏膜内的间充质干细胞的自噬水平改变上颌窦内的骨生成量。

【关键词】: 上颌窦黏膜间充质干细胞; 雷帕霉素, 自噬; 成骨分化

ACVR1 通过调控根端复合体的增殖分化参与小鼠牙根发育的研究

刘苍维¹, 史册¹, 胡月¹, 孙宏晨^{1,2*}

1吉林大学口腔医学院病理科; 2.中国医科大学口腔医学院

目的: 观察野生型小鼠牙根发育过程, 并利用条件性基因敲除模型, 研究*Acvr1*基因在小鼠牙根发育过程中对根端复合体的增殖和分化的作用。

方法: 选取出生后7/10/14/18 d的SFP级C57野生型小鼠及基因敲除小鼠, 分离下颌骨, 经micro-CT扫描测量后, 浸入4%多聚甲醛固定过夜, 15%EDTA脱钙7-14 d (根据标本天数确定), 一部分经乙醇梯度脱水及二甲苯透明, 石蜡包埋, 3-5 μ m连续切片; 另一部分经蔗糖脱水, OCT包埋, 12 μ m冰冻切片。制得石蜡切片及冰冻切片后分别放于4 $^{\circ}$ C冰箱和-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱内保存。切片行X-gal染色、HE染色、免疫组化 (IHC-K14/Ki67) 染色及免疫荧光 (IF-P-SMAD1/5/8) 染色, 并用普通显微镜或激光共聚焦显微镜观察、拍照。

结果: micro-CT测量结果可见, 随时间点延长, 野生型小鼠的牙根逐渐形成, 与对照组相比, 基因敲除组小鼠下颌第一磨牙牙根长度缩短, 冠根比增大。出生后7天的小鼠下颌骨切片, X-gal染色可见, 阳性细胞位于磨牙及切牙的成牙本质细胞层中, 并且越靠近牙尖部位阳性细胞越多, 越靠近颈环处阳性细胞越少, 此外上皮根鞘内未见阳性细

胞。HE染色可见，随着时间点的延长，野生型小鼠的牙根逐渐延长；与对照组相比，出生后18天的基因敲除组小鼠下颌第一磨牙牙根长度缩短，冠根比增大。免疫组化染色可见，随着牙根长度的延长，野生型小鼠K14阳性细胞先是聚集在颈环处后逐渐向根方延伸并发生断裂，阳性细胞逐渐减少，Ki67阳性细胞始终聚集在根尖部稍内侧，但阳性细胞也逐渐减少；与对照组相比，出生后18天的基因敲除小鼠根尖区K14及Ki67阳性细胞无明显差异，但根间区细胞牙骨质层内K14阳性细胞明显增多。免疫荧光染色可见，与对照组相比，出生后18天的基因敲除小鼠根尖区P-SMAD1/5/8表达量未见明显下降。

结论：出生后7天至18天，小鼠牙根逐渐形成。ACVR1通过调控根端复合体的增殖和分化参与小鼠牙根发育。

高浓度碳点对口腔菌株的体外抑菌实验研究

刘东宁¹ 岳轶云¹ 丁小涵¹ 孟阳¹ 王柳然¹ 于维先^{1,2*}

1. 吉林大学口腔医学院牙周病科 2. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室

目的：探讨高浓度碳点对口腔菌株的抑制作用，为研制一种可观察细菌形态变化的抑菌剂奠定基础。**材料与方法：**采用经典水热法合成色氨酸碳点，用TEM检测所得碳点的形貌、粒径分布、分散度；用FT-IR检测碳点的表面基团和元素组成；利用荧光光谱仪测定碳点的光谱和荧光强度阈值。将细菌培养至对数期，实验分为阴性对照组与实验组，实验组采用四组高浓度碳点，浓度分别为500mg/L、1000mg/L、1500mg/L、2000mg/L，与上述变异链球菌UA159和牙龈卟啉单胞菌ATCC33277培养，24h、48h、72h，于各时间点利用比色计测定各组菌液的吸光度值，以此绘制出两种细菌在各浓度碳点作用下的生长曲线。取上述菌液离心弃上清，PBS冲洗，10%甲醛固定10分钟，PBS再冲洗3次，在激光共聚焦显微镜下观察细菌的形态变化。**结果：**TEM观察显示制备的碳点形态为球形颗粒，分散度好，粒径大小约为3.35nm；FT-IR检测合成后碳点具有羧基和氨基基团，分子结构仅由碳、氧、氢和氮元素组成。荧光光谱结果显示在不同激发波长下，碳点可以呈现不同的颜色，具有激发依赖性。根据比色计获得的吸光度值显示：1000mg/L浓度的碳点在48h后，变异链球菌UA159及牙龈卟啉单胞菌ATCC33277菌液浓度均有下降趋势，后期将进行其它浓度碳点的抑菌效果测定并对各时间细菌形态变化进行成像观察。**结论：**成功制备高荧光量子产率的色氨酸碳点，在较高浓度时对细菌有一定的抑制作用，并可观察相应细菌形态变化，作为抑菌剂有着良好的应用前景。

CKIP-1基因对小鼠颅颌面软骨影响的研究

刘富伟 胡奥 张浚睿 侯燕 赵芝鹤 薄斌 孔亮*

第四军医大学附属口腔医院/空军军医大学口腔医院颌面外科整形科

【摘要】

目的: 颅颌面发育畸形及软骨相关性疾病的病因及调控机制是口腔医学领域的热点和难点之一, 对其基因的研究越来越受到重视, 我们发现酪蛋白激酶2相互作用蛋白1 (Casein kinase 2 interaction protein 1, CKIP-1) 在其中起关键调控作用并作进一步探讨。

材料与方法: 在CKIP-1 KO小鼠模型基础上, 系统地从动物水平大体观察 (显微外科、Micro CT)、组织学水平染色评估 (HE染色、甲苯胺蓝染色、番红固绿染色、免疫组化)、细胞学水平功能检测 (利用慢病毒感染低表达CKIP-1、扫描电镜、MTT、细胞骨架染色、细胞划痕实验等) 及分子水平机制探索 (QPCR、Western blot) 等四个不同层面, 层层递进地研究CKIP-1对软骨的作用。

结果: 首先, 动物表型观察可见, CKIP-1 KO小鼠表现为颅颌面部小耳畸形, 耳廓挛缩不伸展; 同时鼻翼弹性软骨呈现缩窄、缩小改变, 更贴近鼻骨; 气管软骨环呈现增宽改变, 气管环色泽更白、弹性增加; 腰椎间盘间隙明显缩窄, 部分区域出现相邻椎骨融合情况, 提示CKIP-1对于软骨表型的影响呈现区域特异性, 但整体呈现CKIP-1敲除软骨量减低趋势。其次, 组织学染色可见, CKIP-1敲除后可引起咽喉颅面部软骨细胞层次紊乱, 但早期细胞增加, 细胞基质增加、矿化减低等软骨保护作用, 而四肢及椎骨等处表现为明显的细胞减少、基质减少、矿化加重等不利影响, 且随年龄增加逐渐加重。再者, 细胞功能检测可见, CKIP-1敲低后软骨细胞分化进程加快, 细胞骨架改变、伸展范围及运动能力提高, 但生存能力及基质分泌功能均有所下降等, 提示CKIP-1对于软骨细胞生存、迁移、基质分泌、矿化、分化等能力均具有影响, 且具有阶段特异性。最后, 分子机制探索发现, CKIP-1对不同分化阶段软骨细胞内关键标志物, 如Sox9、Col X等调节因子均有作用, 细胞内分化指标增加符合组织学中四肢、椎骨表现及细胞学实验结论, 另外CKIP-1可激活BMP与WNT信号通路促进软骨细胞分化进程, 提示CKIP-1对于软骨细胞及组织稳态有重要调控作用, 可能通过多种信号通路共同传递软骨细胞对CKIP-1的应答。

结论: CKIP-1基因在小鼠颅颌面软骨发育过程中, 对软骨表型及软骨细胞功能有着重要的影响, 可能起维持稳态的作用, 为进一步认识该基因在软骨相关性疾病中的作用提供实验依据。

【关键字】 CKIP-1；基因敲除小鼠；软骨表型；软骨增殖；软骨分化。

HIV-1 蛋白酶抑制剂沙奎那韦对颅骨缺损愈合的作用 以及其作用机制的探索

刘海霞

上海市第十人民医院

实验背景及意义：骨组织缺损是临床上的常见问题。虽然目前自体 and 异体的骨移植材料已经广泛应用于临床，并取得了一定的疗效，但是仍然存在着损伤供区组织、局部血管化不足等缺点。其疗效与预期尚有一定的差距。因此在现有的基础上，如何最大程度地发挥机体自身的成骨潜力，是一个关键而有研究价值的问题。要解决这一问题，就需要进一步研究创伤后炎症反应在骨组织再生的作用及其机制，寻找能够调节炎症反应、促进骨再生的药物。这对于解决临床实际问题，促进公共卫生体系的发展有着重要的意义。炎症反应在骨再生的过程中扮演了相当重要的作用。局部的急性炎症是骨再生的重要始动因素，而病理状态下的慢性炎症抑制骨再生甚至导致骨吸收。有文章研究HIV-1蛋白酶抑制剂沙奎那韦 (SAQUINAVIR, SQV) 能抑制HMGB1与TLR4的相互作用，从而调节炎症反应。所以本课题研究SQV对于骨再生的作用以及其作用机制。

实验方法：体内建立小鼠颅骨缺损的动物模型并注射SQV药物，通过microCT影像和组织计量学检测不同降解速度的纤维蛋白载体携带的SQV对小鼠颅骨缺损愈合的影响；通过组织切片观察SQV用药后小鼠颅骨缺损的愈合模式是否发生变化；通过Q-PCR检测SQV用药后小鼠颅骨缺损处RANKL和OPG表达情况；体外通过破骨细胞培养检测，SQV对破骨细胞生成的影响。

实验结果：术后7天，microCT影像结果显示，SQV组相对与对照组，骨生成量显著高于对照组；H & E统计结果显示，SQV组相对与对照组，骨生成量显著高于对照组，

说明颅骨愈合早期注射SQV能促进新骨生成，加速颅骨愈合。Q-PCR结果显示，SQV用药组中OPG和RANKL的表达量都显著的高于对照组；体外诱导破骨细胞，TRAP染色显示，SQV能够促进破骨细胞的诱导分化，说明颅骨愈合早期使用SQV能促进破骨细胞的生成。从以上结果得出，在鼠颅骨愈合的早期，HIV-1蛋白酶抑制剂沙奎那韦能促进小鼠颅骨缺损的愈合，并且促进颅骨愈合是通过促进破骨细胞形成造成的。SQV可能是通过抑制HMGB1与TLR4的相互作用，从而影响体内的炎症反应，促进破骨细胞的形成，在破骨细胞和成骨细胞的相互作用下，促进骨生成和颅骨愈合。

强啡肽/阿片受体 kappa 信号抑制关节创伤后的炎症反应 以及对骨关节炎发生的影响

刘海霞

上海市第十人民医院

背景及意义：关节炎（Arthritis）主要是指关节的软骨退化或者结缔组织发炎，导致关节疼痛从而干扰关节功能的正常行使，关节炎是临床上常见的慢性病。创伤后引起的炎症反应是诱发骨关节炎的重要因素。研究相关信号通路如何调控炎症反应，对缓解关节疼痛，预防和治疗骨关节炎，具有重大意义。我们的前期研究证实， κ 阿片受体及配体强啡肽广泛表达于软骨及滑膜发育的各个时期。小鼠膝关节创伤后 κ 受体表达上调。激活 κ 受体可抑制TNF- α 诱发的分解代谢，还可促进细胞合成软骨基质。本实验将阐明强啡肽/ κ 阿片受体信号对骨关节炎发生的分子调控机制，为骨关节炎的临床用药与新药开发提供理论依据。

实验目的：本实验研究目的为激活 κ 阿片受体，检测该受体在骨关节炎中所起作用以及其作用机制。

实验方法：取4-6周小鼠的肋软骨消化并培养原代细胞，采用TNF- α 诱导炎症模拟骨关节炎模型，化合物U50,488H作为KOR的激动剂。用PCR和WB检测KOR激活后，软骨细胞炎症模型中软骨合成相关基因*Sox9*, *Col2a1*, *Aggrecan*和软骨降解相关基因*MMP3*, *MMP13*, *ADAMTS4*, *ADAMTS5*的表达情况，WB检测NF- κ B信号通路的变化情况。

实验结果：Q-PCR结果显示激活KOR能够有效的降低炎症模型中促炎症因子IL-6和软骨降解相关基因的表达，并结合WB结果显示KOR激活后，软骨炎症模型中软骨降解相关蛋白MMP3和MMP13随着U50,488H浓度的增高而降低；其作用机制研究演示，激活KOR后P-p65和P-ikB α 的表达与炎症组相比，显著下降。

实验结论: 激活KOR, 能够降低软骨细胞炎症模型中炎症反应, 抑制软骨细胞表达软骨降解相关蛋白, 从而降低炎症对软骨细胞的破坏, 保护软骨; 机制研究表明, 激活KOR缓解炎症并保护软骨主要是通过NF- κ B信号通路起作用, KOR激活后能抑制P-p65和P- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的表达, 减少P-p65进入核转录炎症因子从而缓解炎症反应。本研究为治疗骨关节炎提供了新的思路和新的作用靶点。深入研究现有靶向作用于KOR的临床药物对于骨关节炎的新功能, 对于临床用药的选择以及新药开发具有重大的理论指导意义。

TGF- β 2 诱导小鼠腭突细胞成软骨分化的研究

刘惠娜 杜娟

首都医科大学附属北京口腔医院研究所

【摘要】目的: 探讨TGF- β 2诱导小鼠腭突细胞成软骨分化的作用。**方法:** 取胎龄13.5天的小鼠分离培养腭突细胞, 并分别加入不同的细胞因子进行成软骨诱导培养。A组为空白对照组, B组为TGFBR1受体抑制剂——SD208组, C组为加入TGF- β 2组, D组SD208+TGF- β 2组。通过比较蛋白聚糖(阿尔新蓝染色), 蛋白聚糖半定量, 以及软骨标志基因的表达水平(实时定量RT-PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR))来评价各组细胞因子诱导腭突细胞成软骨能力大小及作用。**结果:** 在TGF- β 2作用下腭突细胞向软骨细胞分化, TGF- β 2组蛋白聚糖及软骨相关基因表达量最高, 显著高于A,B,D组($P < 0.01$), B,D组蛋白聚糖及软骨相关基因的表达量较A组明显降低($P < 0.01$)。**结论:** 腭突细胞在TGF- β 2诱导下具有成软骨分化能力。

【关键词】 TGF- β 2; SD208; 腭突细胞; 成软骨分化; 小鼠

经典 BMP 信号通路调节腭板颊舌侧间充质细胞的模式形成

刘静, 周楠, 肖晶*, 刘超*

大连医科大学口腔医学院口腔病理系、大连市口腔基础研究重点实验室

目的: 腭裂是最常见的新生儿疾病, 而腭板上抬障碍是形成腭裂的最主要原因。目前流行的观点腭板的上抬是细胞从颊侧向舌侧迁移形成的, 但颊舌侧间充质细胞标记物尚不明确, 因此本实验要寻找能特异性标记腭板间充质颊舌侧的标记物, 探讨颊舌侧间充质细胞身份的变化是否影响腭板的上抬, 从而为进一步研究细胞迁移和腭板上抬打下基础。

材料与方法: 使用 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 转基因小鼠, 获得在腭间充质中过表达 *Noggin* 从而抑制 BMP 信号通路的动物模型。侧面观和骨染色观察小鼠的下颌有无小颌畸形, 利用 Masson 染色进行形态学分析, 通过 BrdU 标记比较腭板细胞增殖情况, 器官培养观察腭板上抬情况, 免疫组织化学分析 BMP 经典或非经典信号中的蛋白表达分布情况。

结果: (1) E13.5、E14.5、E16.5 天侧面观和 E16.5 股染色可见 *Osr2-cre;pMes-Noggin* (实验组) 与 WT (对照组) 相比无小颌畸形。(2) Masson 染色结果发现: E13.5 天, WT 组和 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组两侧侧腭突沿着舌呈垂直向生长, 未发生融合; E14.5 天, WT 组两侧侧腭板上抬并开始融合, 但 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组两侧侧腭突依旧垂直向生长; 在 E16.5 天, 与 WT 相比, *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组两侧侧腭突已经翻转并在舌的表面呈水平向生长但未发生融合形成腭裂。提示抑制 BMP 信号通路可以导致腭板上抬延迟, 从而形成腭裂。(3) BrdU 标记实验显示, 在胚胎 E13.5 天, *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组腭前部舌侧间充质、颊侧上皮、颊侧间充质的增殖细胞数比 WT 组显著减少, 舌侧上皮未见细胞增殖差异; 而在腭后部各部位未发现细胞增殖差异。说明抑制 BMP 信号通路只对腭前部细胞增殖有影响。(4) 器官体外培养结果显示: E13.5 天, WT 组小鼠两侧侧腭突有明显的翻转趋势, 而 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组两侧侧腭突呈垂直向生长。说明抑制 BMP 信号通路使腭板上抬障碍。(5) 免疫组织化学显示: E13.5, p-Erk、p-p38 和 p-Samd2/3 在 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组的腭前部和腭后部, 与 WT 组相比无明显差别; p-Samd1/5/8 在 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组的腭前部与 WT 组相比没有差异, 但在腭后部, p-Samd1/5/8 在 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组相比于 WT 组在舌侧间充质中表达范围显著缩小, p-Samd1/5/8 在 *Osr2-cre;pMes-Noggin* 组和 WT 组颊侧间充质中无表达。以上结果说明 p-Samd1/5/8 可以作为腭板舌侧间充质的标记物, 而 p-Samd1/5/8 的减少代表着腭板舌侧间充质身份的丧失, 从而导致腭板上抬障碍。

结论: 在后部腭板舌侧间充质特异表达的 p-Samd1/5/8 可以作为后部腭板舌侧间充质的标记物; p-Samd1/5/8 降低所预示着的腭板舌侧间充质身份丧失和腭板上抬障碍相关, 推测这种上抬障碍可能是腭板颊侧细胞向舌侧迁移发生障碍所致。

抗坏血酸-聚乙烯亚胺复合碳点促牙髓干细胞分化及膜片形成的研究

刘莉莉¹ 布文旻¹ 陈希¹ 孙茂蕾¹ 郑梦丹¹ 孙宏晨^{1,2*}

¹吉林大学口腔医学院²中国医科大学口腔医学院

目的:探究抗坏血酸-聚乙烯亚胺复合碳点(AA-PEI CDs)对于牙髓干细胞成牙成骨向分化及膜片形成的作用,从而发现AA-PEI CDs对于牙髓再生的重要意义。

材料与方法:选择抗坏血酸和聚乙烯亚胺作为反应物,按照一定的比例,用微波法合成抗坏血酸-聚乙烯亚胺复合碳点(AA-PEI CDs)。经患者知情同意后,收集就诊患者(17-28岁)完整拔除的健康下颌第三磨牙,提取原代人牙髓干细胞,适宜条件下培养,取第三代细胞用于各项实验。CCK8法测定AA-PEI CDs对牙髓干细胞增值能力的影响;凋亡试剂盒通过流式细胞术检测AA-PEI CDs对牙髓干细胞凋亡的影响;AA-PEI CDs作用于牙髓干细胞7天后,RT-PCR检测矿化相关基因,Western Blot检测矿化相关蛋白和细胞外基质相关蛋白的变化;AA-PEI CDs作用于牙髓干细胞10天后,细胞刮刮下形成的细胞膜片,HE染色观察其细胞层数及细胞外基质的丰富度。

结果:AA-PEI CDs作用于牙髓干细胞,低浓度AA-PEI CDs在第3天即可抑制牙髓干细胞的增殖,具有时间依赖性和浓度依赖性,在1天、7天、10天、15天检测对牙髓干细胞的凋亡没有明显影响;加入AA-PEI CDs培养7天后,RT-PCR检测矿化相关基因、Western Blot检测矿化相关蛋白和细胞外基质相关蛋白表达量明显升高,且具有统计学意义;HE染色示牙髓干细胞细胞膜片由5-8层细胞组成,与对照组(4-6层)相比较厚,细胞外基质更加丰富。

结论:AA-PEI CDs能够促进牙髓干细胞成牙/成骨向分化,促进细胞外基质的分泌和膜片的形成,从而为进一步研究牙髓再生奠定基础。

细胞松弛素 D 对 MC3T3-E1 骨向分化能力的影响

刘庆成 庄瑜 于洪波

上海交通大学医学院附属第九人民医院

目的: 探讨细胞松弛素D (cytochalasin D, Cyto D) 对小鼠胚胎成骨前体细胞 MC3T3-E1骨向分化能力的影响。

材料与方法: 采用不同浓度梯度细胞松弛素D(0.0001ug/ml、0.001ug/ml、0.01ug/ml、0.1ug/ml、1ug/ml) 对MC3T3-E1细胞进行刺激, 通过碱性磷酸酶(ALP)染色检测7天和14天时细胞碱性磷酸酶活性, 采用实时荧光定量PCR检测1、4、7天, CytoD对成骨相关基因Runx2、OPN、OCN表达的影响, 应用CCK-8试剂盒检测1、4、7天细胞增殖情况,从而确定促进MC3T3-E1骨向分化的最适浓度。再使用最适浓度配制完全培养液进行细胞培养, 采用实时荧光定量PCR和Western blot免疫印迹法检测CytoD对成骨指标Runx2、OPN、OCN表达的影响,通过Western免疫印迹法检测CytoD对成骨相关磷酸化通路P-AKT的影响。后续加入P-AKT磷酸化抑制剂, 重复上述实时荧光定量PCR、碱性磷酸酶(ALP)染色和Western blot免疫印迹法对成骨指标和AKT通路进行检测, 探索CytoD促进骨向分化能力与AKT通路的关系。采用SPSS 17.0软件包对数据进行单因素方差分析。

结果: 筛选出能够促进MC3T3-E1骨向分化, 同时对细胞形态、增殖没有影响的CytoD最适浓度为0.01ug/ml。使用此浓度CytoD刺激细胞, 可以显著上调Runx2、OPN、OCN等成骨相关基因的表达, 提高磷酸化P-AKT水平 ($p < 0.05$)。磷酸化抑制剂能显著降低P-AKT磷酸化水平 ($p < 0.01$), 并抑制MC3T3-E1细胞成骨指标的表达 ($p < 0.05$)。ALP染色显示,CytoD浓度为0.01ug/ml的完全培养液培育细胞后ALP染色较对照组细胞染色显著加深 ($p < 0.05$)。

结论: CytoD能够通过增强AKT磷酸化水平,从而上调Runx2、OPN、OCN成骨标志物表达水平、提高碱性磷酸酶活性,最终显著促进MC3T3-E1细胞成骨分化的能力。

人根尖牙乳头干细胞在牙髓再生中的潜在免疫调节作用研究

刘雪梅^{1,2,3}, 刘尧^{1,2,3}, 余思¹, 陈旭^{1,2,3}

1. 中国医科大学口腔医学院儿童口腔科, 2.辽宁省口腔疾病重点实验室, 3.辽宁省口腔疾病转化医学研究中心

目的: 牙髓再生治疗是基于组织工程原理,用于年轻恒牙感染牙髓治疗的生物学治疗方法。根尖牙乳头干细胞 (apical papilla stem cells, SCAP) 是参与牙髓再生最重要的种子细胞之一。除干细胞外,根尖部免疫微环境在组织再生中同样发挥重要作用。调节性T细胞 (regulatory T cells, Treg) 是CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T细胞, Treg细胞比例的升高有助于创造适宜免疫微环境促进组织再生。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 能够通过上调Treg调节免疫炎症反应促进组织再生。课题组前期大动物实验研究发现,在根管内新形成的组织周围有大量淋巴细胞浸润。本研究构建年轻恒牙根尖周炎大动物模型,检测牙髓再生后新形成组织周围Foxp3阳性细胞表达,并用体外共培养实验探讨SCAP对Treg的诱导形成作用,目的在于从免疫调节角度出发,探讨牙髓再生中的潜在生物学机制,以期进一步揭示牙髓再生的分子生物学机制。

材料与方法: 动物实验: 选取3只6月龄比格犬, 9颗双根前磨牙被随机分为实验组和对照组, 构建年轻恒牙根尖周炎模型并进行牙髓再生治疗, 3个月后处死并制备组织学切片, 进行Foxp3免疫荧光染色, 观察新形成组织周围Foxp3阳性细胞表达。细胞实验: 分离培养人SCAP和小鼠脾脏CD4⁺CD25⁻ T细胞, 应用细胞直接接触和transwell两种共培养方式将两者体外共培养24h和72h, 以单独培养的CD4⁺CD25⁻ T细胞为对照, 流式细胞术检测Treg细胞比例。动物实验研究应用Fisher精确检验, 细胞实验研究应用方差分析 (LSD-*t*检验), 采用SPSS17.0软件进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果: 在动物实验中, 组织学切片免疫荧光染色发现大量新生组织周围的淋巴细胞呈Foxp3阳性表达, 提示Treg作为局部免疫微环境的重要组成部分参与牙髓再生。在体外共培养实验72h后, SCAP促进CD4⁺CD25⁻ T转化为Treg, 细胞与细胞的接触在共培养24h时发挥重要作用, 共培养72h时可溶性因子也参与Treg诱导形成。

结论: 本研究结果提示, 在牙髓再生治疗后, 除直接参与组织再生外, SCAP能够促进CD4⁺CD25⁻ T细胞转化为Treg。MSCs能够在牙髓再生治疗根管内创造适宜的免疫微环境促进牙髓组织再生。

宿主 T 细胞调控以脱落乳牙干细胞为基础的骨组织再生研究

刘尧, 戴璐, 刘雪梅, 陈旭

1.中国医科大学口腔医学院儿童口腔科, 2.辽宁省口腔疾病重点实验室,
3.辽宁省口腔疾病转化医学研究中心, 辽宁, 沈阳 110002,

目的: 宿主免疫微环境在组织再生过程中发挥重要作用, 很大程度上调控干细胞功能, 参与组织再生。但宿主免疫微环境, 特别是T细胞对移植干细胞的调控作用及相关机制尚不清楚。本课题研究宿主T细胞对以脱落乳牙干细胞 (Stem cells from exfoliated deciduous teeth, SHED) 为基础的骨组织再生的调控作用及相关机制, 为明确免疫微环境在组织再生中的作用提供依据, 为提高以干细胞为基础的骨组织再生疗效寻求新靶点。

材料与方法: 体内裸鼠皮下细胞种植模型, 研究系统性回输CD4⁺ T细胞对SHED体内成骨能力的影响, 检测局部促炎症因子IFN- γ 、TNF- α 、IL17的表达水平。体外SHED与T细胞共培养体系, 研究T细胞及促炎症因子对SHED细胞增殖和成骨分化能力的影响及相关机制。

结果: 1.系统性回输CD4⁺T细胞, SHED体内成骨能力明显降低, 细胞种植体内IFN- γ 、TNF- α 、IL17的表达水平均升高, 以IFN- γ 变化最为显著。2.在体外共培养环境中 CD4⁺T细胞明显诱导SHED凋亡, 且IFN- γ 能够促进T淋巴细胞诱导SHED凋亡; IFN- γ 能够直接抑制SHED成骨向分化, 且呈浓度依赖趋势。3. IFN- γ 能够促进T细胞对SHED生物学性能的抑制作用, 与上调Fas表达相关。

结论: 宿主T细胞直接诱导SHED凋亡, 且通过促炎性细胞因子IFN- γ 上调其对SHED细胞增殖和成骨向分化, 从而降低以SHED为基础的骨组织再生疗效, 其分子机制与Fas

信号通路相关。调控宿主免疫微环境是提高以干细胞为基础的骨组织再生疗效新的重要靶点。

Sulforaphane (SFN) 抵抗肥胖的作用机制研究

刘耀励 季耀庭 边专

武汉大学口腔医学院 口腔生物医学教育部重点实验室 (武汉大学)

目的: 抗氧化在肥胖抵抗中起着非常重要的作用, 但其中的作用机理还不是很清楚。本研究主要通过抗氧化小分子化合物Sulforaphane, 通过构建动物肥胖模型研究其在抵抗肥胖过程中的可能作用机制。

材料与方法: 正常饲料实验组: 8周龄C57BL/6J雌性小鼠随机分成2组, 正常饲料喂养, 实验组小鼠腹腔注射SFN (10mg/1 Kg/Day), 对照组小鼠腹腔注射等量PBS, 28天后处死小鼠。高脂饲料实验组: 8周龄C57BL/6J雄性和雌性小鼠随机分成2组, 每组雌雄数量相同, 分别为处理组1 (高脂饲料) 和处理组2 (高脂饲料+腹腔注射SFN (10mg/1 Kg/Day)), 28天后处死小鼠。实验过程中, 间隔一天记录小鼠的体重变化情况以及摄取食物的量。实验终止期, 取小鼠腹股沟区的皮下脂肪组织, 内脏脂肪组织和肩胛间区的棕色脂肪组织。分别进行mRNA和蛋白质提取, 部分组织固定石蜡包埋。采用实时荧光定量法 (QPCR) 检测不同组织内PPAR γ , FAS, CEBP α , CEBP β , LPL, LEP, CHOP, CIDEA, UCP1 α , PGC1 α , CPT1 α 基因表达量的变化。采用western blot检测相关蛋白表达量的变化。收集血清样本检测血清总胆固醇, LDL, HDL, 甘油三酯, LEP的含量变化。组织切片HE染色法观察小鼠皮下脂肪, 内脏脂肪和棕色脂肪组织内脂肪细胞形态学变化。

结果: 正常饲料实验组中实验组小鼠的体重增加率明显低于对照组。高脂饲料实验组中处理组2的体重增加率明显低于处理组1。正常饲料实验组中, 与对照组相比, 实验组小鼠皮下脂肪与内脏脂肪中脂肪细胞分化核心相关基因表达量显著下降, 而棕色脂肪

中棕色脂肪分化相关基因的表达显著上升。组织切片结果显示，与对照组相比，实验组小鼠皮下脂肪与内脏脂肪中脂肪细胞大小明显减小。

结论：SFN抵抗肥胖的可能机制是抑制白色脂肪细胞分化，促进白色脂肪向棕色脂肪细胞的转分化。

iRoot BP Plus 对大鼠骨髓间充质干细胞骨向/牙向分化的影响

陆嘉敏，葛兴云，雷港，李泽汉，潘引，李娜，于金华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室，南京医科大学口腔医学院

目的 研究iRoot BP Plus 对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow derived stroma cell, BMSCs)骨向/牙向分化的影响。

材料与方法 取4周龄SPF级SD大鼠(由南京医科大学动物中心提供)，无菌条件下分离双下肢，用 α -MEM冲出骨髓，采用全骨髓贴壁法分离培养大鼠BMSCs。制备iRoot BP Plus的浸提液，配置浓度为0.02 mg/ml, 0.2 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml的条件培养基。通过碱性磷酸酶(ALP)活性检测筛选诱导BMSCs分化的最佳浓度；采用CCK-8实验绘制BMSCs的生长曲线；用流式细胞术(FCM)检测细胞周期分布，以计算细胞的增殖指数(PI)；通过实时定量逆转录聚合酶链式反应实验(RT-PCR)和蛋白免疫印迹试验(Western blot)检测骨向/牙向分化相关基因和蛋白的表达情况；通过ALP染色实验观察iRoot BP Plus浸提液对BMSCs分化的影响；通过茜素红S染色观察各组细胞矿化结节的形成情况，并用10%氯化十六烷基吡啶(CPC)溶液溶解钙离子定量实验佐证。

结果 ALP活性检测显示，使用不同浓度iRoot BP Plus条件培养基诱导BMSCs 5 d时，1 mg/ml的条件培养基抑制细胞ALP活性，0.02 mg/ml和0.2 mg/ml的条件培养基促进细胞ALP活性，0.2 mg/ml组的细胞ALP活性最高。CCK-8实验及流式细胞术细胞周期分析后的PI值均显示，0.2 mg/ml的iRoot BP Plus条件培养基对BMSCs的增殖没有明显影响。RT-PCR实验显示，用0.2 mg/ml的iRoot BP Plus条件培养基诱导BMSCs 3 d和7 d后，*DSPP*、*COL-1*、*OPN*、*DMP-1*、*OSX*、*OCN*等基因的表达明显高于未

诱导组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 可见, 相应蛋白的表达情况与基因表达一致。ALP染色实验显示iRoot BP Plus 条件培养基诱导组的细胞ALP表达高于未诱导组。茜素红S染色可见iRoot BP Plus 条件培养基诱导组较未诱导组有更多的矿化结节, CPC实验显示诱导组钙离子浓度高于非诱导组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论 低浓度的iRoot BP Plus浸提液可以促进大鼠骨髓间充质细胞牙向/骨向分化, 0.2mg/ml 为最佳诱导浓度。该浓度iRoot BP Plus条件培养基对BMSCs的增殖能力无明显影响, 同时可以促进BMSCs的矿化能力。

黄连素对人牙髓干细胞成牙本质分化作用的初步研究

Effect of berberine on odontogenic differentiation of human dental stem cells

马兰 李欣聪 苗雷英*
南京市口腔医院

目的: 组织工程三要素为干细胞, 支架, 生长因子, 生长因子能够诱导干细胞多向分化, 有研究已证明黄连素能促进干细胞骨向分化, 我们探究黄连素能否诱导HDPSCs成牙本质向分化。本研究通过体外实验探究的黄连素对HDPSCs成牙本质分化的影响。

材料和方法: 本实验采用改良的组织块酶消化法分离培养人牙髓干细胞, 传代至P3-5代使用。将HDPSCs与分别含1 μ M、3 μ M, 10 μ M, 30 μ M的黄连素的培养基共培养, 利用CCK-8检测试剂盒测试细胞增殖。用含不同浓度黄连素的成牙本质诱导培养基诱导培养一定的时间, 用RT-PCR, ALP定量, 茜素红染色等方法观察黄连素对HDPSCs ALP活性、成牙本质相关基因表达和矿化等成牙本质分化各项指标的影响。

结果: CCK-8结果表明, 与对照组相比, 在1-30 μ M浓度范围内, 培养1、3、5、7天均未观察到黄连素抑制HDPSCs的增殖, 即在该浓度范围内, 黄连素对HDPSCs没有细胞毒性。成牙本质诱导培养基培养 HDPSCs细胞7天, ALP 活性检测显示黄连素组 ALP活性明显高于对照组, 其促进作用在该浓度范围内不呈现浓度依赖性, 1 μ M浓度时效果最为显著。成牙本质矿化诱导14天后, 茜素红染色结果显示1、3 μ M处理组有大量钙化结节形成。成牙本质诱导7天后, 提取细胞总RNA进行实时定量PCR, 检测OPN, DPSS,

ALP等成牙本质相关基因的表达水平。1 μ M、3 μ M、10 μ M 黄连素处理组，成牙本质相关基因 OPN, DPSS, ALP的表达均显著升高 ($P < 0.05$)，30 μ M 黄连素处理组的成牙本质相关因子DPSS 与对照相比也明显升高。由此，黄连素在 1-10 μ M 浓度时具有促进HDPSCs成牙本质分化的作用。

结论：低浓度范围内黄连素对HDPSCs无细胞毒性，不影响HDPSCs细胞增殖，且能够促进HDPSCs成牙本质相关基因的表达，诱导成牙本质向分化，可能代替牙髓组织工程中细胞因子的作用。

CXXC5 通过多种信号通路参与调控 Pg 抑制的成牙骨质细胞分化

马莉, 王晓璇, 曹正国*

口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室, 武汉大学口腔医学院

目的：牙周疾病作为一种常见感染性疾病，与革兰阴性厌氧菌如牙龈卟啉单胞菌Pg关系紧密，而其特征性的病理变化以慢性炎症反应和牙周组织破坏（包括牙骨质降解）最为典型。本实验致力于了解生活状态的Pg对成牙骨质细胞（可形成牙骨质）分化及矿化能力的影响，并研究该过程中目的基因Cxxc5的表达情况及其中的信号转导机制。

方法：①使用不同MOI值的Pg活菌刺激体外培养的成牙骨质细胞系OCCM-30一定时间，或使用MOI值为0和100的Pg活菌刺激OCCM-30不同时间（3h,6h,12h,24h）后，利用real-time PCR检测Osterix、Ocn、IL-6、MCP-1、RANTES等的表达变化；②采用矿化诱导液诱导OCCM-30矿化，同时给予MOI值为0和100的Pg活菌刺激，连续培养4天、7天后通过real-time PCR、western blot的方法检测Osterix、OCN、BSP、IL-6、CXXC5的表达变化，14天后进行茜素红染色及半定量分析；③使用丝线结扎诱导的大鼠牙周炎动物模型，通过组织化学染色观察正常组及牙周炎组成牙骨质细胞中CXXC5的表达情况；④使用si-RNA对Cxxc5基因产生敲低作用矿化诱导2天、4天通过real-time PCR、western blot的方法检测Osterix、OCN、BSP的表达变化，进行ALP活性检测及ALP染色，检测信号通路相关蛋白p-Erk1/2、Erk1/2、p-p38、p38、p-JNK、JNK、p-Akt、Akt等的表达变化。

结果：①短期Pg刺激可对成牙骨质细胞分化相关蛋白表达产生影响，并同时诱导炎

症相关因子表达增多，且其诱导效应呈剂量依赖现象。②在OCCM-30矿化过程中长期Pg刺激对分化指标Osterix,OCN,BSP的抑制作用更为显著，茜素红染色及半定量分析变化明显。③CXXC锌指相关蛋白5 (CXXC5) 参与调控Pg抑制的成牙骨质细胞分化，矿化过程中该基因表达增加，而炎症刺激可抑制其表达。④在丝线结扎诱导大鼠牙周炎模型中，与正常组相比，牙周炎组成牙骨质细胞CXXC5的表达明显减少。⑤使用si-RNA抑制该基因，矿化2d及4d时Osterix,OCN,BSP表达均降低，ALP染色及ALP活性均有负性变化。此外，Erk1/2、p38、JNK、PI3K-Akt信号通路在CXXC5敲低后呈明显抑制状态。

结论：Pg能够明显抑制成牙骨质细胞的分化及矿化结节形成能力，且表现出一定的浓度和时间依赖性。CXXC5在Pg抑制成牙骨质细胞分化的过程中发挥作用，其表达随矿化的进展而增加，而在炎症状态下受影响，此外，Erk1/2、p38、JNK、PI3K-Akt信号通路参与此过程。

rnc 基因调控变异链球菌生物膜形成的研究

毛梦莹

上海交通大学医学院附属第九人民医院

【摘要】

目的：研究变异链球菌内具有调节作用的*rnc*基因缺失表达及过表达时对变异链球菌生物膜形成的影响，并初步探究*rnc*基因调控生物膜形成的可能分子机制，从而为龋病的防治提供新基因位点和实验依据。**材料与方法：**分别通过PCR连接诱变技术、重组质粒技术构建变异链球菌*rnc*基因缺失突变株(Smurnc)及过表达突变株(Smurnc⁺)。通过扫描电镜观察变异链球菌标准株(UA159)及*rnc*基因缺失、过表达突变株在8h、24h、48h三个不同时间点的生物膜形成情况。通过结晶紫染色法检测标准株与缺失、过表达突变株形成的生物膜量的差异。通过激光共聚焦显微镜观测标准株与缺失、过表达突变株生物膜的结构及胞外多糖的分布。蒽酮法用于检测标准株与缺失、过表达突变株生物膜内胞外多糖的产量。原子力显微镜用于检测标准株与缺失、过表达突变株生物膜粘附力的差异。RT-qPCR用于检测*rnc*基因对变异链球菌内生物膜形成相关基因在mRNA水平的调控作用。**结果：**扫描电镜结果表明变异链球菌内*rnc*基因的异常表达可破坏生物膜的正常结构，与标准株致密网状结构不同，Smurnc株生物膜呈疏松多孔状改变，Smurnc⁺生物膜内细菌聚集成团。激光共聚焦显微镜结果表明*rnc*基因突变株生物膜内胞外多糖异常分布，Smurnc株生物膜结构呈疏松弥散状，缺乏标准株生物膜所形成的团块状的胞外多糖基质。与标准株相比，Smurnc株生物膜量显著降低($P < 0.05$)，胞外多糖(水溶性胞外多糖、水不溶性胞外多糖)产量明显下调($P < 0.05$)，粘附力显著

降低($P < 0.05$), 结果表明变异链球菌内 *rnc* 基因参与调控生物膜的形成过程, 并且 *rnc* 基因可能通过对胞外多糖产量和生物膜粘附力的调节进而影响生物膜的形成能力。同时, Smurnc 内 *dexA* 基因的表达量较标准株上调 3.02-倍 ($P < 0.05$), *rnc* 基因抑制 *dexA* 基因的表达表明 *rnc* 基因可能通过调控胞外分解多糖代谢途径参与胞外多糖产量及生物膜形成过程的调节。**结论:** 本研究发现变异链球菌内 *rnc* 基因参与调控胞外多糖的产生进而影响生物膜的结构。与标准株 UA159 相比, *rnc* 基因突变的变异链球菌生物膜生物学特性有显著缺陷。因此, 变异链球菌内 *rnc* 基因可以作为龋病防治的新靶点, 为探索新的防龋途径提供理论和实验依据。

骨髓间充质干细胞促进口腔鳞状细胞癌增殖与浸润的体外研究

孟琳¹ 布文旻¹ 刘欣辰¹ 王梓霖¹ 陈雨蒙¹ 孙宏晨^{1,2*}

¹吉林大学口腔医学院²中国医科大学口腔医学院

目的: 骨髓间充质干细胞 (Bone Mesenchymal stem cells, BMSCs) 可以特异性归巢至肿瘤局部, 但其对口腔鳞状细胞癌的作用及其机制不甚明了。因此本研究组探究 BMSC 对口腔鳞癌的作用及其机制。

材料和方法: 密度梯度离心法获得骨髓间充质干细胞, 差速贴壁法纯化骨髓间充质干细胞至第三代。流式细胞仪检测第三代的骨髓间充质干细胞表面标志分子 CD44、CD90、CD105、CD11b、CD45; 不同条件培养基诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化及脂肪分化, 倒置显微镜观察。通过 Trans-well 法共培养口腔鳞癌细胞和骨髓间充质干细胞, 采用 MTT 法、平板克隆实验检测共培养后肿瘤细胞的增殖能力, 细胞伤痕愈合实验, Trans-well 趋化实验以穿膜细胞计数检测细胞侵袭转移能力。

结果: 骨髓间充质干细胞传至第三代时骨髓间充质干细胞呈纺锤形, 细胞形态均一, 生长旺盛。流式细胞仪检测发现骨髓间充质干细胞表面分子标志物 CD44、CD90、CD105 阳性表达率较高, 阴性标志物 CD11b、CD45 表达率较低; 不同的条件培养液成功诱导骨髓间充质干细胞向骨组织及脂肪组织分化, 验证了骨髓间充质干细胞多向分化潜能。MTT 法、平板克隆实验结果显示共培养组肿瘤细胞在 96 小时后增殖速度明显升高, 培养 2 周后共培养组的细胞克隆数明显多于对照组。细胞伤痕愈合实验结果发现共培养组在 48 小时细胞伤痕愈合能力显著提高, Trans-well 趋化实验可见 24 小时后共培养组穿膜

细胞数明显增多。

结论：体外培养获得较高纯度的骨髓间充质干细胞。骨髓间充质干细胞可促进口腔鳞癌细胞增殖，提高其侵袭转移能力。

阿奇霉素促进炎症微环境下人牙周膜

干细胞成骨分化机制初步研究

孟婷婷 周颖 刘珪杉 李琼 刘大勇*

天津医科大学口腔医学院

目的：牙周炎是发生在牙周支持组织的慢性感染性疾病，病理表现为牙周支持组织的炎症、牙周袋形成、渐进性附着丧失以及牙槽骨破坏，是成年人失牙的首要原因，牙周炎与全身健康之间有着不可忽视的关系。越来越多的证据表明，炎症和免疫反应在牙周炎的发生发展过程中起重要作用。目前临床上治疗牙周炎的主要方法是清除含牙周致病微生物的生物膜，控制炎症，终止牙周组织的破坏。其中牙周非手术治疗和药物治疗虽然可以终止疾病发生的进程，但是对于牙周组织的再生效果有限。而GTR等再生性手术治疗的应用一定程度上提高了临床牙周炎的治疗效果，但是其作用距离理想预期相差甚远。研究报道，炎症微环境对于组织再生有重要影响。因此，寻找有效控制牙周炎症微环境的方法是牙周组织再生的关键。阿奇霉素（AZM）作为大环内酯类抗生素具有潜在的抗炎特性。有研究表明，AZM可以抑制牙周膜细胞（PDLSCs）和牙周炎患者龈沟液中IL-8等细胞因子的表达。虽然目前还没有关于AZM对牙周炎疗效的确定的、可控的临床数据支持，但可以明确的是，AZM结合非手术牙周炎治疗，可以有效改善牙周炎患者的牙周状况。然而，阿奇霉素对于牙周膜干细胞的作用机制尚不明确。

本研究拟通过体外诱导PDLSCs成骨分化，初步探究AZM对炎症微环境下PDLSCs

成骨能力影响的分子机制。

材料与方法：临床收集无龋、无牙周炎的14-24岁年轻人的完整前磨牙或第三磨牙，采用酶消化法分离PDLSCs并对表面标志物进行鉴定。采用MTS法对PDLSCs的增殖活性进行检测。采用碱性磷酸酶染色，碱性磷酸酶活性检测，茜素红染色和钙离子浓度测定，RT-qPCR等方法，检测干细胞成骨分化能力及成骨相关基因*RUNX2*、*OCN*和*BSP*的表达。采用Western blot法检测NF- κ B信号通路相关蛋白 p65，磷酸化p65，I κ B- α ，磷酸化I κ B- α ，WNT通路相关蛋白 β -catenin，凋亡相关蛋白caspase-8和caspase-3的表达水平。采用Annexin V检测细胞凋亡。

结果：碱性磷酸酶染色，碱性磷酸酶活性检测，茜素红染色，钙离子浓度测定显示TNF- α 显著抑制PDLSCs的成骨分化能力，RT-qPCR结果表明成骨相关基因*RUNX2*、*OCN*和*BSP*的mRNA表达水平下降。AZM显著增强TNF- α 作用下PDLSCs成骨分化能力。Western blot结果显示TNF- α 使磷酸化p65，磷酸化I κ B- α 和 β -catenin表达水平升高，AZM抑制p65，I κ B- α 的磷酸化水平，及 β -catenin的表达。同时，流式细胞术和Western-blot结果表明，阿奇霉素显著抑制由TNF- α 引起的PDLSCs细胞凋亡相关蛋白Annexin V，caspase-8，caspase-3的表达。

结论：

阿奇霉素通过抑制TNF- α 所致的NF- κ B和WNT信号通路激活及细胞凋亡相关分子的表达促进PDLSCs在炎症微环境下成骨分化，提示阿奇霉素在临床治疗牙周炎中的潜在应用价值。

关键词：牙周膜干细胞，肿瘤坏死因子- α ，阿奇霉素，成骨分化，细胞凋亡

抗坏血酸-聚乙烯亚胺复合碳点引起的 GOLPH3

相关的高尔基体应激反应的研究

孟许亚¹ 布文免¹ 王璐¹ 孙茂蕾¹ 孙宏晨^{1,2*}

¹吉林大学口腔医学院²中国医科大学口腔医学院

目的: 明确抗坏血酸-聚乙烯亚胺 (Vc-PEI) 复合碳点能够引发细胞的氧化应激反应, 高尔基体应激蛋白高尔基体磷酸化蛋白3 (GOLPH3) 在此氧化应激反应的发生中有重要作用。

材料与方法: 以抗坏血酸和聚乙烯亚胺为反应物, 用微波法合成Vc-PEI复合碳点; 通过MTT法筛选碳点作用于人骨肉瘤细胞系 (MG63) 的安全浓度范围; 通过实时定量PCR技术检测不同浓度 (0 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 60 μ g/ml, 80 μ g/ml) 以及不同作用时间 (0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 36h) 的Vc-PEI复合碳点引发的GOLPH3在基因水平的变化; 选择一抗为兔抗人的GOLPH3的多克隆抗体结合于高尔基体, 用羊抗兔的激发光为红色荧光的二抗结合于GOLPH3一抗, 同时用激发光为蓝色荧光的DAPI标记细胞核, 通过免疫荧光显微镜观察碳点的摄入, 碳点在细胞内的分布以及碳点的摄入和转染siRNA-GOLPH3基因沉默后对高尔基体结构和细胞内分布的影响。

结果: 通过微波法合成的Vc-PEI复合碳点具有荧光性, 良好的生物相容性, 低的细胞毒性, 超小粒径, 易于被细胞吞噬摄取等特点。随Vc-PEI复合碳点浓度的增加和反应时间的延长, GOLPH3基因的表达呈现浓度依赖性和时间依赖性, 即在安全浓度范围内, 随浓度的升高, 随反应的延长, GOLPH3表达增多, 且在24h时有最高表达, 之后随时间延长, GOLPH3表达降低。Vc-PEI复合碳点的摄入, 使GOLPH3红色荧光增强, 且有大量高尔基体由位于核周的压实的团块状结构变为在细胞质中散在分布, 脂质体转染siRNA-GOLPH3后, 观察到GOLPH3荧光变弱, 抗体标记的高尔基体在细胞内的散在分布。

结论: 抗坏血酸-聚乙烯亚胺复合碳点能够引起GOLPH3相关的高尔基体应激反应, 并引起高尔基体结构的改变, GOLPH3对维持高尔基体正常结构发挥重要作用。

葡萄糖酸锌碳点对小鼠前成骨细胞生物学

成像和促成骨作用的体外研究

孟阳¹ 于维先^{1, 2}

1. 吉林大学口腔医学院牙周病科 2. 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室

[摘要]

目的: 研究葡萄糖酸锌碳点 (zinc gluconate-derived carbon dots, Zn-CDs) 的生物活性, 生物学成像和对小鼠前成骨细胞成骨向分化的影响。**材料与方法:** 通过一步水热法合成葡萄糖酸锌碳点, 并对其进行 TEM、FT-IR、XPS、荧光光谱、紫外可见光吸收光谱表征。体外培养小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1, 使用 MTT 法评价碳点的细胞毒性, 筛选适宜浓度。将细胞与碳点共培养后在激光共聚焦显微镜下观察细胞的成像特点。然后与不同浓度碳点(0、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)浸提液共培养 3, 7 和 14 天, qRT-PCR 检测成骨相关基因 mRNA 表达以及碱性磷酸酶(ALP)活性。并培养 21 天通过茜素红染色检测矿化程度。结果: TEM 结果表明成功合成 5.25nm 的碳点, FT-IR 结果表明碳点的表面主要由羧基和羟基基团构成, XPS 表明碳点的价键成分主要有 C-C/C=C 的碳核和 C-O/C=O 的表面基团, 且表面富含锌离子 Zn^{2+} , 荧光光谱表明碳点具有 360nm 紫外光激发, 450nm 蓝光发射的荧光性质, 并表现激发波长依赖特性。MTT 结果显示碳点浓度在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 以下, 没有明显细胞毒性。荧光成像结果显示, MC3T3-E1 细胞可以呈现蓝色、绿色和红色的荧光图像。qRT-PCR 结果显示 *Runt* 相关转录因子 2 基因(*Runx2*)、碱性磷酸酶基因(*ALP*)、骨钙素(*OC*)和 I 型胶原蛋白(*Col1*) 基因表达随碳点剂量的增加而增加, 碱性磷酸酶活性也呈剂量依赖性。茜素红染色结果显示各浓度碳点钙结节量均比对照组多。**结论:** 葡萄糖酸锌碳点生物活性好, 具有生物成像和促进成骨作用的双重功能。

MiR-27a targets DKK2 and SFRP1 to promote reosseointegration in the regenerative treatment of peri-implantitis

Xiaolin Wu, Hui Huang^{1, 2, 3*}, Xinquan Jiang^{1, 2, 3*}

¹Department of Prosthodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine; ²National Clinical Research Center for Oral Diseases; ³Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai, China

Objectives

Peri-implantitis is the main reason of bone resorption around the implants,

which can even cause implant loose and shedding. Guided bone regeneration could promote bone regeneration and re-osseointegration in peri-implantitis bone defects and has been widely applied in clinical treatment. However, because of infectious substances difficult to thoroughly eliminated on the surface of implants and local inflamed microenvironment, routine procedures can hardly achieve a desired bone reconstruction. In the present study, to improve this problem, we have explored the mechanisms of miR-27a in peri-implantitis and therapeutic role for bone repair, which provide a new prospect for peri-implantitis therapy

Materials and methods

1. Canine bone marrow stem cells(BMSCs) were isolated and cultured; The expression of miR-27a was detected with or without the stimulation of TNF- α in the process of BMSCs osteogenic differentiation; Then miR-27a expression was overexpressed by miRNA mimic transfection into BMSCs and ALP activity、ARS staining、RT-PCR、tube formation assay were performed to examine the effect of miR-27a on TNF-inhibited bone formation.

2. Bioinformatic tools primarily predicted DKK2 and SFRP1 as miR-27a targets; MiR-27a expression was overexpressed or inhibited by miRNA mimic or inhibitor transfection into BMSCs. After 48h and 72h, mRNA and protein levels of target genes were detected by RT-PCR and Western Blot methods; The relationship between miR-27a and targets was further testified by luciferase reporter assay; To deeply study whether miR-27a functionally modulates these targets, the mRNA levels of targets were quantified by RT-PCR after treatment with TNF- α in the course of BMSCs osteogenic differentiation, and then, osteogenic and angiogenic capacity of BMSCs were detected using means described above after overexpression of miR-27a and targets simultaneously.

3. MiR-27a-enhanced tissue engineering complex was established and filled into peri-implantitis osseous defects. A series of assays, including X-ray radiography、sequential fluorescent labeling、micro-CT、histological observation were performed at different time points postoperatively.

Results

1. Canine BMSCs were successfully isolated and cultured for subsequent

experiments; MiR-27a expression was upregulated in the process of BMSCs osteogenic differentiation while downregulated after stimulation of TNF- α and this change tendency was time-dependent; MiR-27a overexpression could ameliorate TNF- α inhibition role on bone formation, which presented high ALP activity, remarkable ARS staining, promotion of osteogenic- and angiogenic-related growth factors expression, increased formation of vessel-like tubes.

2. MiR-27a directly downregulated the expression of DKK2 and SFRP1 at the translational level but not the transcriptional level; Moreover, the results displayed that it was by functionally regulating DKK2 and SFRP1 that miR-27a promoted osteogenesis and angiogenesis of BMSCs.

3. After miR-27a-modified BMSCs were seeded onto the β -TCP scaffolds, the complexes were used to restore bone defects around implants. All data demonstrated that the β -TCP/miR-27a-BMSCs scaffold could significantly promote faster and better bone regeneration than the other control groups.

Conclusion

We systemically studied that MiR-27a enhanced osteogenesis and angiogenesis through mitigation of TNF- α inhibited bone formation; We revealed that downregulation of miR-27a was probably correlated with formation of bone defects in peri-implantitis partly modulated by TNF- α . Furthermore, we demonstrated the exact mechanism of miR-27a directly targeting DKK2 and SFRP1 to activate the Wnt signaling which is closely associated with bone regeneration. Finally, we successfully fabricated miR-27a-enhanced composites to repair bone defects in peri-implantitis and acquired perfect bone regeneration. Taken together, these results provide evidence that this strategy could exert powerful therapeutic effect on peri-implantitis, which may suggest a feasible way to maintain the stability and masticatory function of dental implant.

妊娠期宿主因素性激素变化对口腔微生物群落结构的影响初探

牛晨光¹ 江文欣² 徐长恩^{3*} 马瑞¹ 高丽¹ 苑克勇¹ 胡戎琛¹ 林文珍¹ 黄正蔚^{1*}

¹上海交通大学医学院附属第九人民医院牙体牙髓病科上海市口腔医学重点实验室/上海市口腔医学研究所国家口腔疾病临床研究中心²上海交通大学医学院附属仁济医院口腔科³复旦大学附属妇产科医院妇产科

摘要

目的: 探讨妊娠状态下唾液中性激素水平的变化对口腔微生物多样性尤其口腔唾液中微生物的组成结构的影响。 **方法:** 本课题受试者共 18 名(妊娠 11 名, 对照 7 名), 每位受试者采集四个阶段样本并进行牙周情况评估。唾液样本进行Miseq 测序, 唾液性激素测定指标包括唾液游离孕酮及雌二醇。 **结果:** 妊娠期间唾液菌群多样性明显高于对照组。在唾液来源的菌斑中共筛选出了 63 个 OTU, 这些OTU 不仅与妊娠与否的分组方式有关, 同时还与唾液中性激素的水平密切相关。筛选出的 63 个 OTU 中, 与激素水平呈反比的 20 个 OTU 在对照组中的丰度更高, 而其余的 43 个 OTU 在妊娠组中更高; 在唾液菌群中所筛选出的与激素水平呈正相关且在妊娠组丰度较高的 43 个 OTU 中属于普氏菌属的有 10 个, 相比其他菌属而言所占比例最高。普氏菌属中的 tanneriae 菌种及 nanceiensis 菌种均随唾液中性激素的升高而升高。 **结论:** 妊娠期宿主因素唾液中性激素水平的改变对口腔菌群的结构组成及多样性有显著影响。

The influence of sex hormones on salivary microbiome during pregnancy

Chenguang Niu¹, Wenxin Jiang², Changen Xu^{3*}, Rui Ma¹, Li Gao¹, Keyong Yuan¹, Xuchen Hu¹, Wenzhen Lin¹, Zhengwei Huang^{1*}.

¹ Department of Endodontics, Ninth people's Hospital, Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, ² Department of Stomatology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai ;³ Department of Obstetrics and Gynecology, Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University

Abstract

Background: The interactions between hosts, oral microbiomes and

microenvironments have been the subject of much research in recent years. Yet, whether the alterations in the host impact the oral microbiome is not understood well. The fluctuation of sex hormone levels during pregnancy is a dramatic change in the host, and is closely related to pregnancy-associated gingivitis.

Methods: In this study, salivary estradiol and progesterone level were measured at three trimesters of pregnancy and after delivery (t1: ≤ 14 weeks; t2: 20–25 weeks; t3: 33–37 weeks; t4: 42 days after delivery) from 11 pregnant and 7 non-pregnant volunteers, and their salivary microbiome were collected and profiled by 16S rDNA gene sequencing. **Results:** Paralleling with the elevation of salivary sex hormones, the diversity of the salivary microbiome increased significantly in t3, compared to the t1 ($P < 0.05$). Additionally, *Capnocytophaga gingivalis*, *Peptoniphilus sp.oral taxon 386*, *Prevotella baroniae*, *Simonsiella muelleri* and *Lactobacillus reuteri* were correlated to the fluctuation of sex hormone levels. **Conclusions:** Rather than highly abundant bacteria, the low abundant bacteria were more vulnerable to the host impact.

氟化钠对人牙乳头干细胞成骨成牙向分化调控机制的研究

潘引, 李泽汉, 俞艳, 雷港, 闫明, 于金华

南京医科大学口腔疾病研究所江苏省重点实验室, 南京医科大学口腔医学院

【摘要】

目的: 通过体外分离培养人牙乳头干细胞 (SCAPs), 选用氟化钠最适浓度刺激, 观察人牙乳头干细胞成牙成骨相关指标变化并探讨相关调控机制。

材料与方法: (1)、收集17-20岁根尖未发育完全无龋坏的第三磨牙, 酶消化分离培养人牙乳头干细胞, 流式细胞术检测细胞表面分子。(2)、制备不同浓度的NaF溶液 (0, 0.25mM, 0.5mM, 1mM, 2mM), 通过ALP活性测定和RT-PCR筛选最适浓度。(3)、用筛选的最适浓度刺激人牙乳头干细胞, CCK-8和流式细胞术检测对细胞增殖影响。分别提取0, 3, 7d的总蛋白和总RNA, 通过Western blot和RT-PCR检测成牙成骨相关蛋白和基因指标的变化, 明确NaF对人牙乳头干细胞定向分化的影响。(4)、用最适浓度刺激细胞0, 10min, 30min, 60min, 分别提取细胞总蛋白, 通过western blot检测MAPK相关蛋白的变化。

结果: (1)、在体外成功分离培养了人牙乳头干细胞, 细胞呈长梭形, 放散形排列。细胞CD34, CD45阴性, CD90, CD105阳性, 为间充质来源的干细胞。传代培养至3-5代用于后续实验。(2)、ALP活性检测试验结果显示, 0.5mM NaF溶液刺激时, 细胞ALP活性最强, 与各组均有统计学差异 ($P < 0.05$)。(3)、CCK-8实验显示0.5mM NaF溶液对细胞增殖无明显影响 ($P > 0.05$)。细胞周期结果显示0.5mM NaF溶液对细胞周期无明显影响。(4)、RT-PCR结果显示, 与对照组相比, 0.5mM NaF 3d和7d时成牙成骨相关基因 (*ALP, DSPP, RUNX2, OSX, OCN*) 均显著增高, 结果有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Western blot结果显示, 3d, 7d时成牙成骨相关蛋白 (*ALP, DSPP, RUNX2, OSX, OCN*) 较对照组相比, 均显著增高, 结果有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(5)、Western blot结果显示, 0.5mM NaF溶液刺激10min后, 磷酸化的P38水平及磷酸化P38与P38的比值较其他组显著升高。

结论: (1)、0.5mM NaF溶液对人牙乳头干细胞的增殖能力及细胞周期无明显影响。(2) 0.5mM NaF溶液促进人牙乳头干细胞的成牙成骨向分化。(3)、0.5mM NaF溶液调控P38 MAPK通路。

RNA测序分析腭裂小鼠腭转录组变化

彭瑶 王欣欢 乔玮玮 高倩 孟柳燕*

武汉大学口腔医学院口腔生物医学工程教育部重点实验室

【摘要】 目的：腭裂 (cleft palate) 是一种受环境因素调控的多基因遗传病，病因复杂。本研究的目的是建立腭发育关键时期腭裂小鼠和正常小鼠腭板基因表达谱，比较两组基因转录水平差异，筛查腭裂候选基因。**材料与方法：**选取10周龄左右的C57BL/6小鼠，以雌雄比2: 1合笼，发现阴栓的雌鼠标记为胚胎0.5天 (Embryonic day 0.5, E0.5)。按照100mg/kg的量对E10.5孕鼠灌胃全反式维甲酸，对照组孕鼠给予等量植物油。剖宫取出E13.5, E14.5, E15.5, E16.5胚胎腭板，提取总mRNA，BGISEQ-500仪器测序，NOISEQ方法筛选差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs)。qRT-PCR验证候选基因mRNA表达水平，免疫组化检测候选基因在小鼠腭发育不同时期腭板的蛋白表达变化。**结果：**通过RNA测序，我们一共检测到21374 个基因，筛选出306个DEGs。腭裂组与对照组相比，E13.5有11个DEGs表达下调，9个DEGs上调；E14.5有62个DEGs下调，12个上调；E15.5有64个DEGs下调，24个DEGs上调；E16.5有189个DEGs下调，12个上调。其中，27个DEGs属于micro RNA家族，13个DEGs属于晶体蛋白家族。这些差异基因主要富集于代谢通路，化学物致癌通路。免疫组化结果显示E13.5-E16.5小鼠腭板中均表达分泌型磷酸蛋白1 (Secreted Phosphoprotein 1, Spp1) 和角化蛋白4 (Keratin 4, Krt4)，前者主要表达于腭间充质，且E14.5腭裂组Spp1显著下调。Krt4主要表达于腭上皮，在E16.5表达显著下调。**结论：**我们成功建立腭发育关键时期腭裂鼠胚与正常鼠胚腭板基因表达谱。Micro RNA 家族和晶体蛋白家族成员的表达水平以及Spp1和Krt4在腭形成时期的表达差异可能在全反式维甲酸诱导的小鼠腭裂中发挥重要作用。

慢性牙周炎对阿尔茨海默病小鼠学习记忆功能的研究

钱雪申, 葛颂*

遵义医学院附属口腔医院

目的：研究实验性牙周炎对阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)模式小鼠学习记忆功能的影响。

材料与方法：将APP/PS1双转基因小鼠随机分为3组：对照、P.g-LPS、P.g-LPS+结扎组。牙周炎模型构建方法为双侧上颌第一、二磨牙间腭侧注射P.g-LPS (P.g-LPS组) 或双侧上颌第二磨牙结扎4-0丝线同时注射P.g-LPS (P.g-LPS+结扎组)。8周后，Morris水迷宫、Y迷宫和新物体识别实验观察小鼠的行为学变化；亚甲基蓝染色观察牙槽骨吸

收情况; Nissl染色观察海马和皮质神经元形态及数量; Western blot检测小鼠脑皮质 Iba1、GFAP、iNOS、Cox-2、TNF- α 、APP、ADAM10、BACE1、A β _{1-40/1-42}的表达; IHC和IF检测脑皮质组织星型、小胶质细胞激活及脑皮质、海马中A β 含量表达。

结果:与APP/PS1对照组相比, P.g-LPS注射组和P.g-LPS+结扎组牙槽骨吸收更为严重; Pg-LPS注射及注射+结扎组小鼠平均逃避期明显延长、目标象限停留时间百分比显著降低, 且Y迷宫的空间自发性探索行为正确率明显降低, 新物体识别实验表明小鼠对新物体的探究次数均显著降低; 所有实验组小鼠大脑皮质以及海马CA1和DG区域神经元细胞排列紊乱、存活细胞及尼氏小体明显减少、细胞核出现固缩伴有深染; 实验组小鼠大脑皮层中星形胶质细胞和小胶质细胞明显活化, iNOS、COX-2、TNF- α 蛋白表达明显增加; APP、BACE1及A β _{1-40/1-42}水平显著增多, ADAM10水平明显减少。其中P.g-LPS+结扎组小鼠病理损伤比P.g-LPS注射组更为严重。

结论: P.g-LPS 诱导产生的慢性牙周炎可以加剧 APP/PS1 小鼠学习记忆功能障碍, 其作用可能通过增加 APP 淀粉样途径和减少非淀粉样途径诱导产生淀粉样蛋白 A β 沉积。

LPS诱导的DNA双链断裂通过GATA4调节牙髓细胞的

NF- κ B信号通路

乔玮玮 孟柳燕 边专*

武汉大学口腔医学院口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室

目的: 转录因子GATA4在细胞的发育和分化中起关键作用, 有研究表明GATA4可激活NF- κ B通路将DNA损伤与炎症反应联系起来。本研究旨在利用脂多糖(LPS)诱导牙髓细胞DNA双链断裂(DSBs)并探究其DNA双链断裂的修复方式以及GATA4在牙髓细胞炎症反应的作用。

材料与方法: 10ng/mL LPS连续刺激牙髓细胞1、3、6次(1次/天)后, western blot, 定量 PCR, 免疫荧光检测 γ -H2A.X (DNA双链断裂标志蛋白)的mRNA及蛋白水平的表达; 并采用彗星实验检测DNA损伤程度。建立LPS诱导的大鼠实验性牙髓炎模型, 分别对未处理组及炎症诱导后0天, 2天, 4天, 6天, 8天的大鼠牙髓组织使用免疫组化法检测 γ -H2A.X在体内牙髓细胞的表达。LPS连续刺激牙髓细胞6次后, western

blot, 定量 PCR检测DNA双链断裂同源重组修复 (HR) 蛋白Rad51, Rad54及非同源末端连接修复 (NHEJ) 蛋白Ku70, Xrcc4的表达; LPS刺激的第三天对细胞进行Ku70siRNA转染降低Ku70表达后检测 γ -H2A.X的表达情况。免疫组化实验检测 γ -H2A.X, Ku70和GATA4在人及大鼠的正常和炎症牙髓组织中的表达。LPS刺激细胞前采用1mM咖啡因预处理细胞18h抑制DNA损伤反应; 对细胞进行GATA4siRNA转染降低GATA4表达。利用western blot, 定量 PCR, 免疫荧光检测 γ -H2A.X、GATA4、细胞核内NF- κ B的表达变化。

结果: 10ng/mL LPS连续刺激6次后 γ -H2A.X、Rad51、Ku70, Xrcc4的表达较对照组有显著性增加 ($P<0.05$), NF- κ B入核阳性细胞数有显著地增加 ($P<0.05$)。彗星实验检测到细胞核拖尾现象增加。当降低Ku70表达后, γ -H2A.X的表达量明显增加 ($P<0.05$)。免疫组化结果显示 γ -H2A.X, Ku70和 GATA4在LPS诱导4、6、8d后大鼠牙髓及人牙髓炎症组织表达水平显著升高 ($P<0.05$)。LPS连续刺激后的牙髓细胞中GATA4的表达量, NF- κ B入核细胞数有显著地增加 ($P<0.05$)。当降低GATA4表达后, γ -H2A.X的表达量无明显变化, 但是GATA4的表达量及NF- κ B入核显著地降低 ($P<0.05$)。咖啡因抑制DNA损伤反应后, γ -H2A.X、GATA4的表达量, NF- κ B入核均显著地降低 ($P<0.05$)。

结论: 低剂量LPS连续刺激能诱导牙髓组织及细胞的DNA双链损伤, 并可能以NHEJ为主要修复方式, GATA4受到DNA双链断裂损伤反应的正调节并且通过NF- κ B信号通路调节牙髓细胞的炎症反应。

颅神经嵴来源间充质细胞中敲除Fam20b基因

抑制小鼠髌突软骨细胞成熟

冉春泉 陈晓艳 刘静 周楠 刘超* 肖晶*

大连医科大学口腔医学院口腔病理系&大连市口腔基础研究重点实验室

目的: Fam20b是FAM20 (Family with Sequence Similarity 20) 家族成员之一, 有文献认为Fam20b是影响蛋白多糖糖胺聚糖 (GAG) 侧链合成的关键激酶。而蛋白多糖, 尤其是硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (HSPG) 及硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPG) 在形态发生素浓度梯度的建立中发挥着重要的作用, 影响多种形态发生素分子的信号传导, 包

括WNT、BMP、HH家族成员。现有文献报道Fam20b在关节软骨缺失会导致膝关节长骨骨化缺陷并有软骨肉瘤产生，而Fam20b对由继发性软骨组成的颞下颌关节的发育的影响未被报道。本次研究通过考察Fam20b在颅神经嵴细胞中缺失对小鼠颞下颌关节发育的影响，探讨细胞外基质中蛋白多糖对髌突软骨增殖及分化的影响，为完善TMJ的发育机制提供新思路。

材料和方法：选用 *Wnt1-cre; Fam20b^{f/+}* 小鼠与 *Fam20b^{f/f}* 小鼠交配，得到 *Wnt1-cre; Fam20b^{f/f}* 基因敲除小鼠动物模型。取 *Wnt1-cre; Fam20b^{f/f}* 小鼠胚胎 E14.5、E15.5、E16.5、E18.5 头颅标本，进行冠状位切片，行Masson染色、Von kossa染色以及SafraninO-Fast Green染色。

结果：E14.5天，野生型小鼠在将形成颞下颌关节区域可见明显的间充质细胞凝集，然而，*Wnt1-cre; Fam20b^{f/f}* 小鼠间充质细胞凝集范围及细胞密度明显减少。E15.5天，野生型小鼠髌突软骨分化并出现细胞分层（纤维层、前成软骨细胞层、成软骨细胞层、肥大软骨细胞层），关节盘形成并开始与髌突分离；相比而言，*Wnt1-cre; Fam20b^{f/f}* 小鼠髌突尺寸较小，虽然髌突软骨细胞开始分化并出现细胞分层，但各层细胞数量、细胞外基质着色明显较少，且无明显关节盘形成。由此可推测，Fam20b的缺失导致糖基侧链减少从而引起TMJ前体细胞增殖减少。E16.5天，野生型小鼠可见清晰的关节盘组织、上下关节腔、关节面被覆的纤维组织以及明显分层的髌突软骨细胞，各层软骨细胞外基质着色均匀；*Wnt1-cre; Fam20b^{f/f}* 小鼠虽有间盘组织出现，但贴覆于髌突表面不能分离，并且上关节腔有残余结缔组织，未形成纤维软骨关节面及下关节腔形成，与此同时，各层软骨细胞外基质着色随胚胎发育进行性减少，而肥大软骨细胞数量极少。E18.5天，野生型小鼠TMJ进一步成熟；而相较于野生型小鼠，*Wnt1-cre; Fam20b^{f/f}* 小鼠髌突前成软骨细胞及成软骨细胞数量明显减少，同时此二层细胞在髌突各层软骨细胞中所占比例却高于野生型小鼠，并且肥大软骨细胞外基质几乎不能着色，尽管间盘组织与髌突之间出现一定的分离趋势，但无下关节腔形成。综上所述，我们有理由认为糖基侧链的缺失会抑制髌突软骨细胞分化成熟以及关节盘的分离。

结论：在颅神经嵴来源细胞中敲除 *Fam20b* 会减少GAG侧链生物合成，本研究中髌突软骨细胞发育成熟受抑制，同时关节盘不能分离，可能是缺失的GAG侧链调节不同信号通路的传导抑制了髌突软骨细胞增殖及分化，进而影响关节盘的生成和分离，最终抑制TMJ发育成熟。

初级纤毛转运蛋白IFT140在正畸牙移动过程中的作用研究

荣崧汐, 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的: 正畸骨改建涉及免疫炎症、血管新生、牙周组织及牙槽骨组织改建等过程。压力侧产生的破骨细胞是影响牙齿移动的关键因素。初级纤毛广泛存在于动物真核细胞内, 是突起于细胞膜表面的细胞器, 具有重要的感官作用。IFT140是初级纤毛的逆向转运蛋白。IFT140基因突变会造成骨骼畸形疾病, 例如TATD、MSS综合症。课题组前期研究表明, 破骨前体细胞有纤毛结构, 其在破骨细胞分化过程中有重要作用。本研究从破骨细胞的角度来阐述IFT140在骨组织中的作用, 通过构建特异性破骨细胞IFT140基因敲除鼠, 通过正畸加力模型, 来观察IFT140在正畸牙移动过程中参与骨改建的作用和机制。

材料与方法: 采用8周雄性IFT140^{fl/fl}, Ctsk-cre鼠为敲除组、IFT140^{fl/fl}鼠为对照组, 分别建立上颌右侧正畸加力模型, 力值约为30g。于建模术后14天取正畸侧颌骨样本, micro CT分析牙槽骨骨量变化及牙齿移动距离; 石蜡切片, 行HE染色分析正畸侧骨组织改建情况; 行trap染色分析破骨细胞生成数量; 免疫组织化学染色分析IFT140蛋白表达变化。骨髓间充质干细胞破骨向诱导分化, 1.2g持续压应力观察MMP9、trap等破骨相关基因的表达情况。

结果: (1) Micro-CT显示敲除组牙齿移动距离小于对照组, 敲除组牙槽骨单位体积骨量 (BV/TV)、骨矿化密度 (BMD) 显著高于对照组。(2) HE染色、trap染色显示敲除组牙槽骨吸收低于对照组, 敲除组破骨细胞数量少于对照组。免疫组化显示敲除组比对照组牙槽骨IFT140表达量低。(3) Q-PCR结果分析敲除组和对照组的骨吸收和初级纤毛相关基因表达有显著差异。(4) 细胞加力实验结果表明, 加力3h、6h、12h、24h, 破骨细胞相关基因表达量上升, 初级纤毛相关基因表达量下降, 敲除组的破骨细胞形成少于对照组, 敲除组细胞迁移能力低于对照组; MMP9、Trap、IFT140、Gli1等相关基因表达量有显著差异。

结论: 本课题通过构建破骨细胞特异性敲除初级纤毛转运蛋白IFT140基因小鼠, 在正畸模型中验证初级纤毛转运蛋白IFT140在正畸骨改建中发挥的作用及机制。发现敲除IFT140基因后小鼠破骨细胞生成能力下降, 牙齿移动距离缩短。揭示了IFT140通过调控破骨细胞融合在正畸牙移动中参与了骨改建过程。

脯氨酸羟化酶在脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞炎症因子的表达中 发挥阳性调控作用

商玲玲 葛少华

山东省口腔组织再生重点实验室 山东大学口腔医学院牙周科

目的：脯氨酸羟化酶（PHDs）在机体的氧传感系统中发挥着关键作用，然而，其在炎症中的调控作用尚未完全明确。牙龈卟啉单胞菌在牙周炎的发生和发展中发挥着重要作用，脂多糖（LPS）是其主要的毒力因子；而人牙龈成纤维细胞（HGFs）是牙周连接组织中最丰富的细胞，具有非常重要的免疫调控作用。因此，本实验旨在探讨脯氨酸羟化酶在牙龈卟啉单胞菌LPS诱导的人牙龈成纤维细胞的炎症中的调控作用，并且进一步研究其潜在机制。

材料与方法：本实验通过引入PHDs的抑制剂DMOG以及小干扰RNA来研究PHDs的作用。首先通过CCK-8以及流式细胞术检测不同浓度DMOG的细胞毒性，筛选出无细胞毒性的浓度，并用于后续的实验。其次，用不同浓度DMOG预处理细胞24h，LPS分别刺激细胞2h, 6h, 12h, 24h后通过实时荧光定量PCR检测炎症因子IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β 以及Toll样受体2（TLR2）和其下游连接蛋白MyD88在基因水平的表达，通过酶联免疫吸附试验（ELISA）检测炎症因子在蛋白水平的表达。通过western blot检测不同浓度DMOG对LPS激活的PI3K/AKT, NF- κ B和MAPK信号通路的作用。并且，通过实时荧光定量PCR检测PHD的三种表型PHD1,2,3在牙龈成纤维细胞中的相对表达量，通过小干扰RNA探究各表型在炎症中调控作用。

结果：CCK-8以及流式细胞术结果表明，10,50,100 μ M DMOG对HGFs无细胞毒性，并将此浓度用于后续实验；10,50,100 μ M DMOG预处理会抑制LPS诱导的炎症因子以及TLR4和MyD88的表达；并且，western blot结果表明，DMOG会抑制LPS有诱导的NF- κ B p65, I κ B α , MAPK包括p38, ERK和JNK, 以及AKT的磷酸化，但是对PI3K p85 α 的磷酸化无 明显的作用；此外，qRT-PCR结果表明PHD1和PHD2在人牙龈成纤维细胞中表达，而PHD3基本不表达。小干扰RNA将PHD2敲低以后，LPS诱导的炎症因子的表达明显降低，而敲低PHD1对其没有影响。

结论：本实验表明，脯氨酸羟化酶通过TLR4/MyD88介导的AKT/NF- κ B和MAPK信号通路在脂多糖诱导的牙龈成纤维细胞的炎症因子的表达中发挥着阳性调控的作用；并且，这种调控作用主要是由PHD2介导的。PHD2有望为牙周病提供新的治疗靶点。

Toll样受体4在口腔鳞癌发生发展中的作用

沈伟丽, 刘来奎*

南京医科大学口腔医学院;江苏省口腔疾病研究重点实验室

摘要

目的: 探讨Toll样受体4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在口腔鳞癌发生发展中的作用。

材料与amp;方法: 采用免疫组织化学法检测TLR4在口腔鳞癌标本中的表达, 统计分析其与口腔癌临床病理特征及生存、预后的关系。同时, 通过4-硝基喹啉-1-氧化物 (4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO) 化学诱导野生型小鼠 (n=10) 和TLR4^{-/-}小鼠 (n=10), 建立舌鳞癌模型, 通过组织病理学方法, 分析TLR4在口腔鳞癌的表达情况。

结果: 1.119例口腔鳞癌标本中, TLR4的表达与患者年龄、淋巴结转移、远处转移、临床分期、病理分级、肿瘤浸润和复发存在显著性差异。在年龄<50岁年龄组, TLR4的高表达率为55.17% (16/29); 在年龄>50岁年龄组, TLR4的高表达率为81.1% (73/90) (P=0.005)。在颈部淋巴结转移的病例中, TLR4的高表达率为64.2% (34/53); 在无颈部淋巴结转移的病例中, TLR4的高表达率为83.3% (55/66) (P=0.017)。局部浸润组中TLR4高表达率为74.4% (64/86); 无局部浸润组中TLR4高表达率为75.8% (25/33) (P<0.001)。复发组TLR4高表达率为45.9% (17/37); 无复发组TLR4高表达率为88.6% (70/79) (P<0.001)。生存分析结果显示, TLR4高表达与患者的总生存期具有显著相关性 (P<0.001); 回归分析显示年龄 (P=0.016)、复发 (P<0.001)、TLR4低表达 (P=0.005) 与患者的预后差显著相关。

2.用4NQO诱导后, 第8周TLR4^{-/-}小鼠中有3例出现中度不典型增生, 野生型中仅出现1例。野生型小鼠在第20周出现重度不典型增生, TLR4^{-/-}小鼠在第16周出现。至24周, TLR4^{-/-}小鼠全部出现重度不典型增生或原位癌, 野生型小鼠中出现8例。第12、16、20周, 野生型小鼠和TLR4^{-/-}小鼠在肿瘤形成过程中存在病理学差异 (P=0.046, P=0.005, P=0.014), 第24周两者无明显差异, 均出现大量重度不典型增生或原位癌病例 (P=0.157)。

结论: TLR4在肿瘤发生发展过程中起抑制作用, 可能是影响口腔鳞癌预后的潜在

因素。

iPS细胞外泌体对牙源性间充质干细胞的增殖效率及成骨、成脂分化能力的影响

Effects of iPS exosomes on proliferation efficiency and osteogenic and adipogenic differentiation of odontogenic mesenchymal stem cells

沈昕 吴国锋*

南京市口腔医院

背景: 患者由于先天或后天造成的口腔颌面骨缺损, 不仅引起面部畸形影响美观, 严重者则将造成骨的功能性障碍, 如全部或部分的咀嚼、语音等功能丧失, 从而降低患者的生活质量。通常现有的治疗方法以外科治疗和组织工程学为主, 而种子细胞、生长因子和支架材料是组织工程技术的三大要素。近年来再生医学的兴起与发展, 给口腔医学领域注入了新的动力, 以干细胞领域为代表的新兴治疗技术, 使得颌面骨缺损的修复将不再局限于传统的外科手术方法, 而成为一种创伤较小, 技术便捷, 效果良好的修复方式。诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells) 是科学家利用病毒载体将四个转录因子 (Oct4, Sox2, Klf4 和c-Myc) 的组合转入分化的体细胞中, 使其重编程而得到的类似胚胎干细胞和胚胎APSC多能细胞的一种细胞类型。即通过采用导入外源基因的方法使体细胞去分化为多能干细胞。iPS细胞优点: 人体来源, 易于获取; 没有伦理争议及免疫排斥; 可扩展性, 产生几乎任何所需细胞类型的能力。牙源性间充质干细胞分为: (1) 恒牙牙髓间充质干细胞 (DPSC)、乳牙牙髓间充质干细胞 (SHED) (2) 牙周膜间充质干细胞 (PDLSC) (3) 根尖乳头间充质干细胞 (SCAP) (4) 牙囊间充质干细胞 (DFC) (5) 牙龈间充质干细胞 (GMSC), 其具有以下优点: 取材简便, 对患者损伤小; 易分离培养, 核型稳定; 增殖速率高; 免疫调节功能; 贴壁生长; 细胞表面表达特定分子标志; 多向分化潜能: 成骨, 成脂肪, 成软骨等优点。外泌体是由多种细胞分泌的直径在 30-100 nm 的亚细胞微泡结构, 具有其来源细胞的基本生物学特

性。是一种具有5-核酸酶活性的膜性小囊泡，表面含有丰富的生物学分子，更重要的是其包裹着源细胞内特殊的DNA片段、RNAs(如mRNAs和microRNAs)、蛋白质、多肽等活性信息分子。它的主要功能有(1)生物标志物的潜能：多种类型的细胞(包括上皮细胞、神经元细胞、脂肪细胞、免疫细胞、间充质干细胞等)释放；在大多数体液(如血液、尿液、唾液、滑液、脑脊髓液等)中均可以检测到。

(2)细胞间通讯：与靶细胞相融合将自身的成分释放入细胞膜和细胞质，将活性蛋白、脂类、小分子以及RNAs由其起源细胞转运至靶细胞。**目的:**本实验欲将iPS细胞的外泌体分为10ug/ml、20ug/ml、50ug/ml、100ug/ml四个浓度组与牙源性间充质干细胞共培养，检测牙源性干细胞的增值效率及成骨，成脂分化能力较对照组是否具有差异。

材料与方法:对照组、iPS细胞外泌体(四个浓度组)、牙源性间充质干细胞共培养。

结果:牙源性干细胞增殖效率与成骨、成脂分化能力与对照组有明显差异。**结论:**iPS细胞外泌体可以提高牙源性干细胞增殖效率与成骨、成脂分化能力。

SB431542 对牙龈间充干细胞体外增殖及成骨分化的影响

石安源

南京市口腔医院

目的:探究TGF- β 信号通路抑制剂小分子药物SB431542在体外对人牙龈间充质干细胞(hGMSCs)增殖及成骨分化能力的影响

方法:收集临床种植二期手术及口腔颌面外科阻生智齿拔除术中切除的健康废用牙龈组织，利用改良组织块法进行牙龈间充质干细胞的分离培养扩增。对培养的细胞进行间充质干细胞的生物学鉴定：通过流式细胞术(Flow cytometry, FCM)检测间充质干细胞的表面标志物CD73、CD90及造血干细胞的表面标志物CD34、CD45的表达，并检测其成骨定向分化能力；本实验体外培养获得的细胞随机分为以下三组：空白组细胞给予间充质干细胞培养基、对照组细胞给予干细胞成骨诱导培养基、实验组细胞给予添加1 μ M SB431542的间充质干细胞成骨诱导培养基，分别对其进行成骨分化的诱导。通过CCK-8增殖实验检测GMSCs的增殖能力以及1 μ M SB431542对hGMSCs增殖的影响。通过RT-PCR(Real-Time Polymerase Chain Reaction)分别检测三组

细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase ALP)、骨钙素(Osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)、 Runt相关转录因子2(Runt— related transcription factor-2, RunX2)、 Colleege1各成骨相关基因的表达, 并利用 GraphPad Prism7 软件进行数据分析。经不同方式处理的三组细胞在诱导21天后对其进行茜素红染色, 观察矿化结节形成情况, 拍照并利用 Image- Pro Plus6.0软件进行图形分析, 利用 GraphPad Prism7软件进行数据分析。

结果: 采用改良组织块法培养获取原代细胞, 传代后见间充质干细胞贴壁生长, 细胞形态大小基本一致, 呈长梭形, 胞质均匀, 胞核圆, 位于细胞中间, 呈典型的成纤维细胞状态, 且增殖速度较快, 具有克隆形成能力及成体干细胞的特征; 流式细胞仪分析显示, 原代培养 GMSCs间充质干细胞表面标志物 CD73(98.05%)、 CD90(98.48%) 阳性表达, 造血干细胞表面标志物 CD34(1.42%)、 CD45(1.06%)阴性表达, 符合间充质来源的干细胞特征; CCK-8 检测结果显示: 添加1 μ M SB431542 的 hGMSCs 与对照组 hGMSCs增殖能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; RT- PCR检测结果显示, 实验组 ALP、 OCN、 RunX2、 OPN、 Colleege1各成骨相关基因的表达水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ; 茜素红染色结果显示, 实验组细胞的矿化结节形成量高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:小分子药物 TGF- β 信号通路抑制剂 1 μ M SB431542 可明显提高人牙龈间充干细胞体外成骨分化能力, 但对增殖无明显影响。本研究为骨再生临床转化医学提供了新的思路。

miR-146a在舍格伦综合征中功能研究

石欢, 郑凌艳, 俞创奇

上海交通大学医学院附属第九人民医院, 口腔外科

研究目的: 探究异常表达的miR-146a在舍格伦综合征 (Sjögren' s syndrome, pSS) 发病机制中的作用。

研究方法: 收集22例pSS患者及22例健康志愿者的外周血单个核细胞, 利用 Realtime PCR技术检测单个核细胞中miR-146a及其靶基因IRAK-1, TRAF-6, FADD 的表达水平。同时, 分析miR-146a与细胞因子IL-1和TNF- α 的表达相关性。

研究结果: miR-146a在pSS患者外周血单个核细胞中表达显著增高, 同时与患者腮腺区肿大VAS及唇腺活检分级呈显著正相关, 并与细胞因子IL-1和TNF- α 的表达呈正相关。靶基因FADD和IRAK-1的表达显著降低, TRAF-6的表达无显著差异。高表达的miR-146a与靶基因FADD的表达水平呈显著正相关, 而与IRAK-1和TRAF-6的表达无显著相关性。

研究结论: 高表达的miR-146a一方面通过抑制FADD的表达抑制了自身反应性淋

巴细胞的凋亡，另一方面由于未对靶基因IRAK-1和TRAF-6的表达起抑制作用，未能抑制NF- κ B 免疫炎症信号通路的持续激活，参与了pSS的发生发展。

免疫相关的长链非编码RNA NEAT1和lncRNA-CMPK2在原发性舍格伦综合征中的表达

郑凌艳, 陈婵, 石欢, 俞创奇

上海交通大学医学院附属第九人民医院, 口腔外科

背景及目的: 非编码RNA NEAT1和lncRNA-CMPK2被证明在免疫反应和自身免疫病中有重要作用, 但它们在原发性舍格伦综合征(primary Sjögren's syndrome, pSS)中的表达情况尚不清楚。本研究旨在检测长链非编码RNA NEAT1和lncRNA-CMPK2在pSS患者的外周CD4+ T细胞, CD8+ T细胞以及CD19+ B细胞中的表达。

方法: 从20例pSS患者以及10例健康对照组的外周血单核细胞中分选出CD4+ T细胞, CD8+ T细胞以及CD19+ B细胞。通过实时定量逆转录PCR(RT-qPCR)测定NEAT1和lncRNA-CMPK2的表达水平。

结果: 在pSS患者中发现了NEAT1和lncRNA-CMPK2存在异常表达, 特别是在CD4+, CD8+ T细胞中表达上调, 另外发现lncRNA的表达水平和一些特定的临床表现相关。

结论: 我们的结果揭示了NEAT1和lncRNA-CMPK2在pSS患者外周T细胞中的高表达, 提示这两种lncRNA可能在T细胞免疫中发挥重要作用, 并在pSS中的表达升高。

破骨细胞中BMPR1A介导的BMP信号通过Cx43

负性调控成骨细胞矿化

史册¹, 胡月¹, 郝新青¹, 刘苍维¹, 周怡君¹, 闫广兴¹, Yuji Mishina², 孙宏晨^{1,3,*}

¹ 吉林大学口腔医学院病理科; ² 美国密西根大学牙学院; ³ 中国医科大学口腔医学院

目的: 在骨重塑过程中, 成骨细胞和破骨细胞之间的对话通过不同的分子机理相互协调。研究表明, 在破骨细胞中特异性敲除 *Bmpr1a*, 导致小鼠体内成骨细胞性骨形成增加。我们提出假设: 破骨细胞中由BMPR1A介导的BMP信号调控破骨细胞表面膜结合蛋白或分泌性蛋白的产生, 进而调控成骨细胞的分化。本实验旨在研究破骨细胞中由BMPR1A介导的BMP信号是如何调控成骨细胞分化的。

材料与方法: 我们将野生型成骨细胞分别与对照组破骨细胞或 *Bmpr1a* 基因敲除的破骨细胞共培养, 通过ALP和茜素红染色评估成骨细胞的分化和矿化; 采用real time PCR方法检测破骨细胞中已知的介导破骨细胞-成骨细胞相互作用的基因的表达, 筛选出可能的分子; 进一步通过shRNA敲低这个候选分子的表达, 同样经ALP和茜素红染色, 探讨这个候选分子介导的破骨细胞-成骨细胞交流对成骨细胞分化和矿化的作用。

结果: 我们发现 *Bmpr1a* 基因敲除的破骨细胞能促进体外成骨细胞的矿化。 *Bmpr1a* 基因敲除的破骨细胞中 *Cx43/Gja1* 的表达增加, *Efna2* 的表达下降。我们选择变化幅度比较大的 *Cx43/Gja1* 进行后续实验, 发现在 *Bmpr1a* 基因敲除的破骨细胞中沉默 *Cx43/Gja1* 基因后, 降低了共培养中成骨细胞的矿化。

结论: Cx43/GJA1可能是破骨细胞中BMP信号通路下游靶点之一, 并参与了骨重塑过程中破骨细胞-成骨细胞的交流。然而, 深入的分子机理需要进一步研究阐明, 包括Cx43/Gja1是否是破骨细胞中BMP信号的直接下游靶点, Cx43/Gja1的转录调控, 以及缝隙连接是如何介导了破骨细胞-成骨细胞的交流的, 例如是通过形成通道, 允许小分子的流入/流出, 还是通过与其他细胞内分子相互作用, 间接影响成骨细胞。我们的发现揭示了破骨细胞-成骨细胞之间的一种新的交流方式, 这对骨生物学的研究是个重要的推动。

小鼠颌面部与长骨发育过程中Fam20A的表达模式

史一丁, 刘静, 王瑜, 陈晓艳, 高珺, 肖晶*, 刘超*
大连医科大学口腔医学院口腔病理系 大连市重点实验室

目的: FAM20A, FAM20B和FAM20C是三个具有序列相似性的基因, 都属于FAM20基因家族成员。其中, FAM20C是一种在全身矿化和非矿化部位普遍表达的分泌型激酶, 通过磷酸化分泌型钙结合磷蛋白提高牙与骨组织的矿化, FAM20C在人体中突变将导致全身骨矿化不良。而FAM20A被认为是一种假激酶, 不能独立利用ATP中磷酸根使底物磷酸化, 但可以与FAM20C形成功能性复合物, 从而提高FAM20C磷酸化细胞外分子的能力。在人类体中, FAM20A突变将导致釉质发育不良, 牙龈纤维瘤和釉肾综合征。本实验主要观察了*Fam20A*在小鼠牙齿、下颌骨及股骨等矿化组织中的表达模式, 为探究*Fam20A*在小鼠硬组织矿化的发挥作用提供依据。

方法: 本实验以 *Fam20A-ires-lacz* 基因小鼠为实验动物模型, 取 *Fam20A-ires-lacz* 基因敲入小鼠出生前 (E) E17.5 胚胎头部标本制成冰冻切片后 Lacz 染色观察。取 *Fam20A-ires-lacz* 基因敲入小鼠出生后 (P) P2d、P1w、P2w、P4w 和 P8w 的下颌与股骨标本进行 Lacz 染色, 石蜡切片后伊红衬染观察 Lacz 染色部位。

结果: Lacz 染色实验结果发现, *Fam20A* 在 E17.5 实验小鼠的下颌骨、切牙与磨牙的成牙本质细胞和成釉细胞中均有表达; 在 P2d、P1w 和 P2w, *Fam20A* 在实验小鼠的下颌骨、切牙和磨牙的成釉细胞中持续表达, 在成牙本质细胞中表达消失; 从 P3w 开始, *Fam20A* 仍在实验小鼠颌骨中表达, 而在切牙与磨牙中均不表达; P4w 与 P8w 的实验小鼠颌骨中 *Fam20A* 表达开始降低, 主要表达位置由整体转向颌骨外表面。在 P2d, *Fam20A* 在实验小鼠骨髓腔内表达; 而在 P1w、P2w 和 P3w 中, *Fam20A* 表达转移到股骨骨皮质的骨细胞; 在 P4w 与 P8w, *Fam20A* 表达强度下降, 主要表达位置由骨皮质髓腔侧骨细胞转向骨皮质外表面骨细胞。在 P2d、P1w、P2w、P3w、P4w 与 P8w 的实验小鼠股骨的关节软骨中均没有发现 *Fam20A* 表达。

结论: 由于 *Fam20C* 在全身矿化与非矿化部位普遍表达, 且均有磷酸化细胞外分子的能力, 那么是什么因素决定了 *Fam20C* 在牙齿与骨等硬组织中发挥矿化的功能, 而在关节软骨等软组织中不行使这种功能。实验发现 *Fam20A* 仅在矿化的部位表达, 而在非矿化部位不表达, 这提示了 *Fam20A* 是 *Fam20C* 在不同组织或细胞中能否发挥矿化作用的决定因子。

雷帕霉素在防护唾液腺细胞放射损伤中对MnSOD的调控作用

宋佳欣

首都医科大学附属北京口腔医院

目的：探究雷帕霉素在防护唾液腺细胞放射损伤中对MnSOD的调控作用。

方法：选取对数期生长的唾液腺细胞系HSG细胞，分为两组，雷帕霉素组(20nM)和单纯放疗组，两组均给予8Gy照射，在照射24h后，利用AnnexinV法检测细胞凋亡，PI法检测细胞周期，定量PCR技术检测两组细胞MnSOD的表达情况，同时对MnSOD上游的调控基因如p53、FoxO等进行差异基因筛查。

结果：取对数生长期的HSG细胞，铺6孔板，连续加药刺激三天，细胞接受8Gy放疗后，立刻更换普通培养基，放疗24h，AnnexinV法检测细胞凋亡显示雷帕霉素组细胞在放疗后24h的细胞凋亡比例明显低于单纯放疗组。取对数生长期的HSG细胞，铺6孔板，连续加药刺激三天，细胞接受8Gy放疗后，立刻更换普通培养基，放疗24h，PI法检测细胞周期显示雷帕霉素组(20nM)细胞放疗后24h、48h处于G2/M期的比例明显高于单纯放疗组，表明处于分裂期的细胞比例要多于单纯放疗组。细胞放疗后24h，定量PCR技术检测显示雷帕霉素组(20nM)细胞内MnSOD表达明显增高，p53表达减少。

结论：雷帕霉素调控MnSOD与MnSOD上游基因p53表达减少有关，但是其具体调控机制还有待研究。

在牙本质胶原表面交联高分子聚电解质诱导纤维内矿化

宋群¹ 陈吉华¹ 牛丽娜^{1,*}

¹中国人民解放军空军军医大学（原第四军医大学）口腔医院修复科

一. 研究目的:

在仿生矿化领域,某些具有特殊官能团的高分子聚电解质模拟非胶原蛋白调控生物矿化的功能已经得到广泛认同和应用。本研究拟在脱矿牙本质I型胶原表面加载高分子聚电解质,使其形成表面带功能性基团的改性胶原,探索聚电解质诱导脱矿牙本质胶原再矿化的可能性及机制。

二. 研究方法:

通过化学交联的方法在脱矿牙本质I型胶原分子上加载高分子聚电解质—聚丙烯酸(分子量:450KDa),使其形成表面带有大量羧基的阴离子胶原。将上述阴离子胶原置于磷酸钙矿化液中孵育7天,并稳定PH值在7.4左右。取出矿化后的胶原,通过透射电子显微镜、扫描电子显微镜、原子力显微镜、动态红外光谱法、热重分析、X射线衍射等一系列检测手段对其进行表征,全面检测这种新方法形成纤维内矿化的能力及程度。

三. 研究结果:

透射电镜及扫描电镜结果显示,表面改性的阴离子胶原实现了广泛的纤维内再矿化;动态红外光谱实时追踪矿化进程发现改性的阴离子胶原无论在矿化速度还是矿化程度上均高于传统矿化方法;热重分析、X射线衍射结果表明,矿化后的胶原矿物质含量达到70%,与天然骨、牙本质的矿物质含量相当;原子力显微镜分析矿化胶原的机械性能结果证明,实验组胶原杨氏模量远高于对照组的未矿化胶原及纤维外矿化胶原,差异有统计学意义。

四. 研究结论:

通过化学交联形成的改性阴离子胶原可以实现快速、广泛的纤维内矿化,不需要在矿化液中添加非胶原蛋白类似物,改性胶原表面的聚丙烯酸官能团自身可以稳定并引导周围的无定形磷酸钙纳米前体渗入I型胶原纤维,形成与天然矿化的牙本质形态、尺寸及分级结构类似的矿物相。这一模型基于在胶原内外维持渗透压及电荷双平衡的Gibbs-Donna理论,从一个全新的角度阐释了仿生矿化过程的三要素:胶原、非胶原蛋白、矿物质离子之间相互作用的机制。因此本研究为仿生矿化提供了一个更高效的新模型,并为生物矿化机制的探索提供了新思路。

槟榔碱诱导的口腔黏膜上皮细胞改变促进

成纤维细胞活化机制的初步探究

苏彤¹, 熊浩峰², 王灿¹, 胡玥¹, 陈文鑫¹, 杨柳笛¹, 胡鑫¹, 毛婷¹, 黄丹妮¹

1.中南大学湘雅医院口腔医学中心;2.中南大学生命科学学院医学遗传学研究中心

目的: 初步探究槟榔碱对口腔黏膜成纤维细胞活化的具体影响机制。

材料与方法: 1.体外培养人口角化细胞 (HOK), 待细胞增殖至对数期时, 饥饿24h后加入不同浓度槟榔碱 (0, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol/L}$) 处理48h, 收集条件培养基 (CM)。2.使用CM处理从正常人口腔黏膜固有层中提取的成纤维细胞 (FB) 48h, 观察细胞形态; 提取总RNA和总蛋白, qRT-PCR和Western-Blot检测FB中 α -SMA和Collagen I的表达。3.在使用CM处理FB的过程中同时加入TGF- β 1抑制剂LY2157299, 观察细胞形态, 检测相应蛋白表达。

结果: 与空白对照组相比, 加入条件培养基处理的FB形态向肌细胞转变, 且细胞中 α -SMA和Collagen I表达增加, 且与槟榔碱浓度呈正相关; CM培养FB的同时加入TGF- β 1抑制剂后, FB细胞形态改变差异较未加入抑制剂组明显减小, α -SMA和Collagen I表达较未加入抑制剂组降低, 差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。

结论: 槟榔碱可能通过作用于口腔黏膜表面的上皮细胞, 使之外分泌TGF- β 1等物质, 进而促进固有层成纤维细胞的活化, 起到促纤维化的作用。

关键词: 口腔黏膜下纤维化, 条件培养基, 成纤维细胞, 转化生长因子- β 1

丹参注射液促进人脱落乳牙牙髓干细胞成骨/成牙分化的实验研究

苏晓敏², 高润涛¹, 范志朋²

1. 首都医科大学附属北京友谊医院口腔科; 2.首都医科大学附属北京口腔医院研究所,
全牙再生及口腔组织功能重建北京市重点实验室

【摘要】目的探讨中药丹参对人脱落乳牙牙髓干细胞 (SHEDs) 成骨/成牙分化功能的影响。**方法**利用50mg/ml的丹参注射液作用于SHEDs细胞, 利用成骨/成牙分化诱导培养基诱导SHEDs定向分化。通过检测ALP活性、茜素红染色、钙离子定量分析、成骨/成牙分化相关基因的表达研究SHEDs体外成骨/成牙分化能力。Western Blot检测AKT信号分子的表达。**结果**50mg/ml的丹参注射液促进SHEDs细胞ALP活性, 体外矿化能力及成骨/成牙分化相关基因骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP)、牙本质涎磷蛋白 (Dentin sialophosphoprotein, DSPP) 的表达。50mg/ml的丹参注射液促进磷酸化AKT的表达。**结论**50mg/ml的丹参注射液具有促进SHEDs细胞体外成骨/成牙分化的潜能, 其作用可能与激活AKT信号通路相关。

【关键词】脱落乳牙牙髓干细胞; 丹参; 成骨/成牙分化

BMP6在舍格伦综合征中通过Id1抑制 骨髓间充质干细胞的免疫调节能力

苏盈盈, 吴瑞卿, 王昊

首都医科大学附属北京天坛医院口腔科

目的: 近年来, 干细胞治疗被认为是治疗舍格伦综合征 (Sjögren's syndrome, SS) 的潜在的治疗手段。研究发现舍格伦综合征患者及小鼠模型的骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 的免疫调节功能受损, 然而, BMMSCs免疫功能缺陷的机制仍不十分清楚, 本研究拟探讨BMP6对BMMSCs免疫调节功能的影响。

材料方法: NOD小鼠被用作SS动物模型, 体外原代培养SS患者和NOD小鼠的BMMSCs。RT-PCR和ELISA法检测细胞中BMP6的表达水平。BMMSCs的成骨分化和

成脂分化能力分别采用ALP染色和ALP活性、油红O染色以及分化相关基因转录表达情况进行检测。分离BALB/C小鼠的T细胞，在体外与NOD小鼠的BMMSCs共培养，流式细胞术检测T细胞的增殖和分化能力，ELISA检测共培养体系中细胞因子IL-17、IFN-gamma、PGE2的表达。从基因型为CD45.2的OT-II转基因小鼠的脾脏和淋巴结中分离纯化CD4⁺ T细胞，使用CFSE标记后与BMMSCs通过尾静脉共同注入CD45.1转基因C57BL/6小鼠体内，流式细胞术检测CD45.2⁺ T细胞的增殖和分化情况。

结果： BMP6在SS患者和NOD小鼠的BMMSCs中高表达，外源性BMP6对小鼠BMMSCs的成脂分化能力没有影响，可促进其成骨分化能力。BMP6能够抑制BMMSCs对T细胞增殖的抑制作用，促进T细胞-BMMSC共培养体系中T细胞分化为Th1和Th17细胞，下调共培养体系中PGE2的分泌量。进一步研究发现，BMP6通过转录因子Id1抑制BMMSCs的免疫调节功能，在BMMSCs中敲低Id1能够明显抑制BMP6引起的BMMSCs免疫调节功能的下调。

结论： BMP6在SS患者和NOD小鼠的BMMSCs中高表达，BMP6通过Id1抑制BMMSCs的免疫调节功能，可抑制BMMSCs对T细胞增殖的抑制作用，促进T细胞向Th1和Th17细胞分化。

关键词： 舍格伦综合征；骨髓间充质干细胞；骨形成蛋白6；免疫调节

VEGF-VEGFR2信号轴通过FAK/PI3K/AKT和p38MAPK通路调控人牙髓干细胞的迁移能力

孙雪飞, 孟柳燕, 边专
武汉大学口腔医学院

[摘要] 目的： 研究人牙髓组织炎症状态下VEGF的表达变化，检测VEGF对人牙髓干细胞迁移能力的影响，探索VEGF对人牙髓干细胞迁移能力调控的机制。**材料方法：** 收集正常和牙髓炎状态牙齿，检测牙髓组织中VEGF的表达；分离培养人牙髓干细胞，挑选细胞单克隆进行纯化培养，使用0、0.01、0.1、1、10、ug/ml浓度的LPS刺激牙髓干细胞，qRCP检测牙髓干细胞VEGF mRNA水平的表达改变；使用0、1、10、20、50、100ng/ml浓度的VEGF刺激牙髓干细胞，细胞划痕实验及Transwell小室实验检测细胞迁移能力，Western blot检测FAK、AKT、p38蛋白磷酸化水平的表达，分别使用VEGFR2

阻断剂、FAK阻断剂、AKT阻断剂、p38阻断剂和VEGF共同刺激牙髓干细胞，划痕实验及Transwell小室实验检测细胞迁移能力的改变，Western blot检测FAK、AKT、p38蛋白磷酸化水平的表达。**结果**：炎症牙髓组织中VEGF的表达水平显著上调，LPS刺激牙髓干细胞24h后可明显促进VEGF mRNA的表达；10-100ng/ml的VEGF可明显促进人牙髓干细胞的迁移能力，1-100ng/ml的VEGF均可激活FAK、AKT、p38磷酸化蛋白的表达，并具有时间和浓度依赖性；而VEGFR2阻断剂和FAK、AKT、p38阻断剂均可逆转VEGF对人牙髓干细胞迁移能力的促进作用。**结论**：VEGF-VEGFR2信号轴通过FAK/PI3K/AKT和p38MAPK通路调控人牙髓干细胞的迁移能力，提示VEGF在hDPSCs损伤修复过程中发挥着重要作用。

[关键词] 人牙髓干细胞 (hDPSCs) ; VEGF; 细胞迁移

RGD多肽修饰的基于氨基化聚乙二醇的活性氧响应性纳米载药体系 联合光动力与化疗靶向治疗口腔鳞状细胞癌的研究

史澍睿, 张连云, 王银松, 李长义*

天津医科大学口腔医院

目的：考察 $\alpha\beta 3$ 整合素配体多肽RGD修饰的纳米载体对于该整合素过表达的口腔鳞状细胞癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) 的靶向性，探索光动力疗法 (Photodynamic therapy, PDT) 生成的活性氧 (ROS) 促使纳米载体断键从而释放药物的特点及其介导的细胞凋亡机制，评价PDT与化疗协同抗肿瘤的体外和体内效果，以期通过靶向纳米药物的高效递送、可控释放以及药物的联合应用改善传统OSCC治疗方法的弊端。

材料与方法：首先通过改良纳米沉淀法制备含有ROS敏感键酮缩硫醇 (thioketals) 和化疗药物阿霉素 (DOX) 的PEG化纳米前药PTD，随后在PEG的末端修饰RGD多肽形成RPTD，并利用光敏剂血卟啉 (HP) 与DOX之间的 π - π 共轭作用相互偶联，最后通过自主装作用形成纳米载药颗粒RPTDH。使用傅立叶红外光谱仪 (FT-IR) 和核磁共振波谱仪 (NMR) 表征纳米前药RPTD的化学结构；使用Zetasizer Nano ZS电位-粒径分析仪和透射电子显微镜 (TEM) 表征RPTDH纳米颗粒的大小和形貌；给予RPTDH纳米颗粒激光照射并将其置于模拟肿瘤微环境的温度与pH值下，考察ROS敏感键的断裂效果

及其介导的体外药物释放特点；利用激光共聚焦（CLSM）和流式细胞术（Flow Cytometry）评价RPTDH纳米颗粒对口腔舌癌CAL-27细胞的体外靶向效果，并检测其在激光照射条件下细胞内的ROS生成水平；采用免疫荧光法考察PDT介导的线粒体膜损伤效果和细胞色素C释放水平；利用MTT试剂盒检测RPTDH纳米颗粒联合激光照射对CAL-27的细胞毒作用；构建口腔癌CAL-27细胞裸鼠移植瘤模型，经尾静脉注射Cy5.5荧光素标记的纳米颗粒，利用小动物活体荧光成像系统观察其对于小鼠肿瘤组织的靶向效果；定期对裸鼠给药并予以激光照射，监测瘤块体积和小鼠体重，治疗结束后分离瘤块和重要脏器，观察肿瘤大小并做进一步病理分析。

结果：红外图谱和¹H-NMR图谱显示RPTDH纳米前药成功合成，TEM显示RPTDH纳米颗粒呈规则的核-壳状球形结构，粒径为(180±5.0)nm,并表现出显著的ROS响应性断键效果，大大促进了药物的释放；RGD多肽的修饰使纳米颗粒在EPR效应的基础上具备了更显著的OSCC靶向性和更长的瘤内蓄积时间；RPTDH纳米颗粒在光照的激发下可以产生大量ROS，这种光动力效应可以激活线粒体细胞凋亡通路，其与化疗联合后在抑制口腔舌癌细胞体外增殖方面表现出显著的协同效果，同时成功抑制了小鼠肿瘤的生长，降低了器官毒性。

结论：本研究制备的多功能纳米载药体系具有理想的OSCC靶向性，激光照射可以促使其内部的光敏剂HP释放大量ROS，在杀伤肿瘤细胞的同时使ROS敏感键断裂，从而进一步释放DOX，实现了PDT与化疗联合抗肿瘤的效果，为临床OSCC的治疗提供了新的思路与策略。

细胞纤毛转运蛋白IFT140在跑步过程中的骨形成作用

陶狄珂，张瑞林，薛徽，李功臣，孙瑶*

同济大学附属口腔医院，上海牙组织修复与再生工程技术研究中心

目的：正常的力学刺激对骨组织维持稳态具有重要作用，而失重、制动等由于骨组织机械刺激的缺乏最终导致废用性骨质疏松的发生。为此，跑步即为一种有效的预防保健措施，其作为一种负重的运动方式，对于骨量维持具有促进作用。在跑步运动过程中，骨组织受到拉应力，压应力和流体剪切力的作用，然而，骨组织中的细胞是如何响应跑步过程中的机械力作用并将其转化为生物化学信号的过程尚不明确。本研究旨在探究跑步运动过程中的骨组织力学响应和机械转导的方式，研究跑步促进骨量增加的作用方式，更好的用于预防废用性骨质疏松的发生。

材料与方法：采用C57BL/6J野生型8周小鼠进行为期6周的跑台运动，观察跑步对

野生型小鼠骨改建的影响,对比同龄非运动组,利用micro-CT分析长骨骨量变化, H&E染色观察长骨形态学变化, IHC及qPCR观察成骨相关基因的表达变化, 荧光双标观察骨沉积率的变化, 验证跑步能否增加长骨骨量以及促进骨量增加的方式。采用转录组测序检测跑步运动对骨组织的生物学作用。利用 *Ift140^{fllox/fllox}* 小鼠与 *Osx-Cre* 工具鼠杂交, 观察 *Ift140^{fllox/fllox}/Osx-Cre* 小鼠对跑步刺激的反应能力。

结果: micro-CT分析显示野生型小鼠跑步组相较于非运动组长骨骨体积分数增加44%, 骨形成能力增加。跑步运动引起骨组织中纤毛相关的组装与聚集活动增加, IFT140表达水平升高。 *Ift140^{fllox/fllox}/Osx-Cre* 小鼠跑步组与非运动组相比骨量变化不明显, 骨形成能力未发生明显变化。

结论: 本研究, 通过构建成骨细胞特异性敲除细胞纤毛转运蛋白IFT140的小鼠模型, 发现敲除IFT140后其对跑步引起机械刺激的反应能力降低, 揭示了IFT140在跑步过程中参与机械刺激转导和骨量维持

TAZ基因对人类牙周膜干细胞的增殖、凋亡、干性维持 及成骨分化调控的作用研究

田慧 文勇

山东大学口腔医学院

摘要

目的: 探讨TAZ基因在人类牙周膜干细胞 (hPDLSCs) 增殖、凋亡、干性维持及成骨分化中的作用。

材料与方法: DMEM培养基、PBS, 胎牛血清、基质胶、transwell小室, CCK-8试剂, EdU染色试剂盒, trizolRNA提取试剂, 反转录、PCR试剂盒, 慢病毒载体LV5-homo-TAZ(NM_000116.4), RNA引物。采用有限稀释法进行细胞克隆纯化培养获得hPDLSCs。用慢病毒转染法过表达和敲低TAZ基因的表达后, 观察hPDLSCs增

殖和克隆形成能力的变化; EdU染色观察TAZ表达升高和降低时体外增殖能力的变化; CCK-8检测TAZ表达升高和降低时, 细胞活性的变化; 同时RT-PCR检测PI3K通路中增殖相关基因p-ERK、p-AKT、p-MTOR的表达水平的变化。流式细胞术检测干细胞标记物CD90、CD44、CD34和CD45等的变化; 同时用RT-PCR检测干性相关基因SOX2、OCT4、NANOG等的表达水平的变化; Western-blot检测干性相关蛋白SOX2、OCT4、NANOG等的蛋白表达水平的变化。碱性磷酸酶和茜素红染色观察TAZ表达升高和降低时对hPDLSCs体外成骨分化能力的影响; 同时用RT-PCR检测矿化诱导7天的成骨相关基因ALP、COL1、RUNX2、OCN和OSX等的表达水平的变化。

结果: 过表达TAZ之后, hPDLSCs的增殖能力升高, 并且增殖相关基因及蛋白表达水平上调; 敲除TAZ之后, 其增殖能力下降, 并且增殖相关基因及蛋白水平下调。过表达TAZ之后, hPDLSCs的干细胞标记物表达增强, 同时干性相关基因及蛋白水平上调; 敲除TAZ之后, 其干细胞标记物表达下降, 且干性相关基因及蛋白水平下调。矿化诱导7天碱性磷酸酶染色发现, TAZ高表达相比于低表达的碱性磷酸酶活性有显著增高; 而矿化诱导21天的茜素红染色也显示出TAZ高表达相比于低表达矿化结节有明显增多趋势。RT-PCR结果显示, 矿化诱导7天后, TAZ高表达组ALP、COL1、RUNX2显著增高, 而TAZ低表达组ALP、COL1、RUNX2显著降低。Western-blot显示TAZ高表达组ALP、COL1、RUNX2表达上调, 而TAZ低表达组ALP、COL1、RUNX2下调。

结论: TAZ基因对人类牙周膜干细胞的增殖、干性维持有正向调控作用, 并且在成骨分化过程中发挥正向调节作用。

WIF1促进根尖牙乳头干细胞的成牙向分化功能

万领, 曹钰

首都医科大学附属北京口腔医院

摘要:

目的: 研究Wnt抑制因子1(WIF1)对根尖牙乳头干细胞成牙向分化能力的影响。

方法: 通过碱性磷酸酶(ALP)活性检测、茜素红染色及钙离子定量分析明确根尖牙乳头干细胞体外成牙向分化能力的变化; 实时荧光定量RT-PCR检测成牙向分化相关基因骨涎蛋白、骨桥蛋白和成牙相关转录因子DSPP, DMP1的表达, 分析研究根尖牙乳头干细胞基因表达的改变。

结果: 实时定量RT-PCR结果显示WIF1在根尖牙乳头干细胞在成牙向分化过程中表

达增加, 过表达WIF1可以促进碱性磷酸酶ALP活性, 素红染色及钙离子定量分析结果显示过表达WIF1可以促进根尖牙乳头干细胞体外矿化能力; 实时定量RT-PCR结果显示过表达WIF1可以促进骨涎蛋白、骨桥蛋白和成牙相关转录因子DSPP, DMP1的表达。

结论: WIF1促进根尖牙乳头干细胞的成牙向分化功能。

关键词: Wnt抑制因子1 ; 根尖牙乳头干细胞; 成牙向分化

头颈鳞癌中FBXW7调节Notch1通路的作用机制研究

王春笛 董一博 郑旻 宋晓萌 吴煜农

南京医科大学口腔医学院; 江苏省口腔疾病研究重点实验室

摘要

【背景和目的】作为F-box家族蛋白的一员, FBXW7可作为SCF (SKP1-CUL1-F-box)型泛素连接酶 (E3) 复合物的底物识别亚基发挥作用。FBXW7蛋白可直接结合和靶向作用多种转录激活因子或原癌基因编码的蛋白, 如c-Myc、Cyclin E、c-Jun、NOTCH等对其进行泛素化修饰和随后的蛋白酶体降解。FBXW7是一种抑癌基因, 在多种肿瘤包括直肠癌、胃癌、卵巢癌和白血病中存在着突变或缺失。NOTCH1是FBXW7的经典底物之一, FBXW7通过调节Notch1通路进而与头颈鳞癌的诸多生物学行为息息相关。本研究旨在通过体内体外一系列实验探索FBXW7调节Notch1通路在头颈鳞癌发生发展中的作用机制, 为治疗头颈鳞癌提供新的方向。

【研究方法】免疫组化/QRT-PCR分析HNSCC患者标本及HNSCC细胞株中FBXW7阳性率及基因表达水平。构建FBXW7基因及NOTCH1基因过表达质粒载体分别转染或共转染HNSCC细胞株。通过CCK8、细胞划痕、Transwell小室侵袭等实验研究细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化, 确定细胞表型的改变。使用Western blot、QRT-PCR检测FBXW7及NOTCH1通路相关组分的表达水平变化。构建过表达或敲除FBXW7转染稳定株接种裸鼠建立皮下成瘤动物模型, 比较瘤体的生长、侵袭和转移的差异, 瘤体标本行免疫组化分析增殖、EMT相关指标。瘤体组织消化后行蛋白印迹、QRT-PCR分析FBXW7及NOTCH1各组分的表达水平变化。

【结果】过表达FBXW7实验组与对照组相比HNSCC细胞株及皮下移植瘤的增殖、迁移和侵袭能力降低,过表达NOTCH1组与之相反,共转染实验组与对照组之间无明显差异。HNSCC细胞株及移植瘤组织的Western blot及QRT-PCR分析显示相对对照组,过表达实验组NOTCH1相关组分表达水平降低,其中NOTCH1的活性形式N1ICD表达水平明显,过表达NOTCH1实验组相反,共转染组无明显差异。以上结果验证了FBXW7通过靶向结合降解底物NOTCH1的活性形式N1ICD调节NOTCH1通路,从而抑制HNSCC细胞株的增殖、迁移和侵袭以及动物模型中瘤体的生长和转移。

【结论】FBXW7通过直接作用NOTCH1通路进而调节头颈鳞癌的发生发展。

【关键词】 NOTCH1 ;FBXW7 ;HNSCC ;N1ICD

可溶性环氧化物水解酶抑制剂促进

HUVECs与DPSCs共培养体系的骨向分化

张耀扬 张琳 白杰 王福*

大连医科大学口腔医学院

目的: 最近研究表明HIF-1 α 与Type I型血管 (CD31和EMCN高表达) 形成密切相关并与成骨密切藕联。环氧二十碳三烯酸 (EETs) 为花生四烯酸代谢产物,具有促进血管形成,抗炎,组织再生等作用。但EETs能否通过促进Type I型血管形成增强干细胞骨向分化尚不清楚。本研究选用新一代环氧化物水解酶抑制剂 (TPPU) 研究人血管内皮细胞 (HUVECs) 与骨髓干细胞 (DPSCs) 共培养下TPPU对干细胞骨向分化的影响。

材料与方法: 建立人脐静脉内皮细胞与人体骨髓干细胞共培养成骨诱导体系,分为实验组 (TPPU处理) 和对照组。质谱检测培养体系EETs的水平;碱性磷酸酶 (ALP) 与茜素红 (ARS) 染色检测两组成骨效果;Q-PCR检测ALP、HIF-1 α 、EMCN、RUNX2、OPN和OCN相关基因的表达。

结果: TPPU处理组培养基EETs水平明显高于对照组。碱性磷酸酶 (ALP) 与茜素红 (ARS) 染色结果显示共培养体系DPSCs成骨能力更强,TPPU处理组可以进一步促进DPSCs骨向分化;Q-PCR检测结果显示TPPU处理组ALP、RUNX2、OPN和OCN相关基因表达显著升高。机制上,Q-PCR和ELISA检测证实TPPU处理组能够促进HIF-1 α 、EMCN高表达,采用HIF-1 α 激动剂和抑制剂能分别促进和降低EMCN表达。

结论: EETs在体内极易降解,影响其临床应用,TPPU作为新一代环氧化物水解酶抑制剂处理药物,能够显著提高内源性EETs水平。TPPU可以促进共培养体系内的DPSCs骨向分化。TPPU可能通过提高HIF-1 α 表达促进EMCN高表达促进骨向分化,有望用于骨组织再生的治疗药物。

关键词: 可溶性环氧化物水解酶抑制剂 人脐静脉内皮细胞 牙髓干细胞 干细胞分化 血管形成

GF- β 和Shh信号通路对小鼠腭突细胞的相互作用

王蒋怡 王松灵 杜娟

首都医科大学附属北京口腔医院,全牙再生与组织功能重建北京市重点实验室

目的: 腭裂是口腔颌面部最常见的先天畸形之一,给患者带来巨大的身心损害。腭部的发育需要一系列分子、细胞在不同时间、空间相互协调。上述过程中的任何异常都有可能导致腭裂的发生。Tgf β 信号通路参与调控腭部发育不同阶段的腭突生长、细胞增殖、分化和间充质转化过程。同样,SHH信号通路也是胚胎发育、肿瘤形成过程中的重要信号通路之一。目前的研究发现,Shh信号通路与Tgf β 信号通路存在相互作用关系,这一关系在肿瘤的发生中被广泛研究、证实。而它们在腭部发育的相互关系仍不明确。本研究拟通过小鼠腭突细胞,初步探讨Tgf β 与Shh信号之间的作用关系。讨论TGF β 和Shh信号通路在腭部发育和腭裂发生中的作用机制,从而为腭裂的产前诊断和预防提供线索。

材料与方法: 将E13.5 ICR孕鼠脱颈椎处死,体视显微镜下取胎鼠腭突,酶消化法分离培养腭突间充质细胞。取P2至P3代腭突细胞,均匀铺板于六孔板,细胞分为五组,A组空白对照,B组加入TGF- β 2重组蛋白,C组加入TGFBR1蛋白特异性阻断剂SD208,D组加入SHH蛋白,E组加入Shh通路抑制剂cyclopamine。qRT-PCR检测并比较各组细胞Shh、TGF- β 信号通路相关基因表达情况。结果SPSS17.0进行统计分析,不同处理组皆与对照组进行配对t检验, $p < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结果: TGF- β 2组腭突细胞*Smo* mRNA表达量在诱导24h、48h后较对照组显著下降, *Gli3* mRNA表达量在48h后较对照组显著下降, *Gli1*、*Gli2*、*Ptch1* mRNA表达量在诱导24h、48h后与对照组均无显著性差异。SD208组腭突细胞Shh信号通路相关因子*Gli1*、*Gli3*、*Smo*、*Ptch1*的mRNA, 在诱导24h、48h后其表达量均较对照组有显著性升高, *Gli2*在诱导48h后表达量较对照组有显著性升高。诱导24h后, SHH蛋白组*Gli1*、*Smad4* mRNA显著上调, *Gli2*、*Smo*、*Ptch2* mRNA显著下调; Cyclopamine组*Gli1*、*Gli2*、*Gli3*、*Smo*、*Ptch1*、*Ptch2*、*Tgfbr1*、*Tgfb2*、*Smad4* mRNA均显著下调。

结论: 腭突细胞培养过程中, 特异性阻断*Tgfbr1*可导致Shh信号通路上调, 而加入TGF- β 2重组蛋白对Shh信号通路可能具有一定的抑制作用。反之, 特异性阻断Shh信号通路可导致TGF- β 信号通路的下调, 而加入SHH蛋白对TGF- β 信号通路的作用不明确。由此可知, TGF β 和Shh信号通路在小鼠腭部发育中, 确实存在相互作用, TGF- β 信号通路可能位于Shh信号通路的上游, 其作用可能与*Tgfbr1*相关, 但其具体机制仍需要进一步探讨。

Mongersen通过抑制Smad7发挥抗炎作用的体外研究

王柳然¹孟阳¹; 丁小函¹; 岳轶云¹; 刘东宁¹; 于维先^{2*}

1. 吉林大学口腔医学院牙周病科

2. 吉林大学口腔医学院 吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室

目的: 探讨Smad7反义寡核苷酸mongersen的体外抗炎作用。**方法:** 使用Lipo2000载mongersen转染RAW264.7细胞后加入*Pg-LPS*处理细胞12h, 采用流式细胞术、Western blot、qRT-PCR分别检测转染效率、Smad7蛋白的表达情况及巨噬细胞相关细胞因子的表达。**结果:** 流式细胞术检测转染效率可达76.57%; Western blot结果显示mongersen可明显抑制Smad7蛋白的表达; qRT-PCR结果显示*TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 等促炎因子在加入mongersen后基因表达明显降低。**结论:** mongersen可通过抑制Smad7蛋白的表达发挥抗炎作用。

1. RAW264.7瞬时转染后的转染效率

将带Cy5荧光标记的mongersen转染至RAW264.7, 采用流式细胞术检测转染效

率可达76.57%，见图1，提示Lipo2000载mongersen在RAW264.7中具有高转染率。

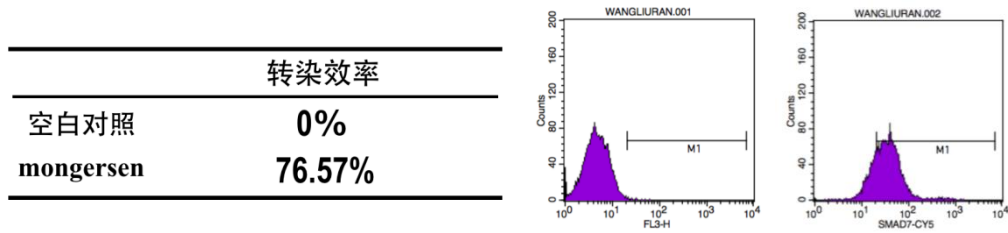


图1: Mongersen转染后的转染效率

Fig.1. Transfection efficiency after transfection with mongersen

2. RAW264.7瞬时转染后细胞内Smad7的表达

RAW264.7融合度达80%左右时，将mongersen及其阴性对照组转染RAW264.7细胞，6h后换用新鲜培养基，12h后Western blot检测Smad7蛋白的表达情况，结果显示实验组Smad7表达明显降低，见图2，提示mongersen可明显抑制Smad7蛋白的表达。

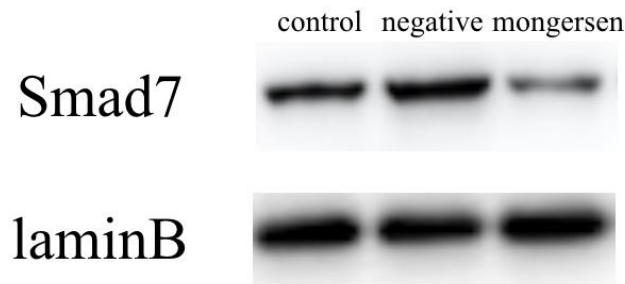


图2: Mongersen转染后Smad7蛋白的表达情况

Fig.2. The protein expression of Smad7 after transfection with mongersen

3. qRT-PCR结果

转染RAW264.7细胞6h后，换用新鲜培养基，加入终浓度为5 μ g/ml Pg-LPS，12h后 qRT-PCR检测细胞内炎症因子基因的表达情况。结果显示，与对照组相比，加入mongersen组的TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎因子基因的表达明显下降，见图3。提示mongersen可通过抑制促炎因子基因的表达发挥明显抗炎作用。

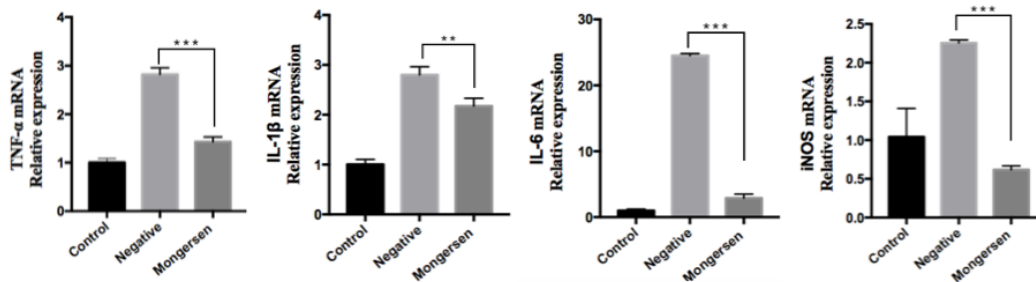


图3: Mongersen转染RAW264.7细胞后促炎因子mRNA的表达情况

CEMP1仿生寡肽的设计合成和诱导类牙骨质再生的体外研究

王晴晴

南京大学医学院口腔医学院

目的：本研究根据牙骨质蛋白1（CEMP1）发挥矿化作用的最可能的氨基酸组成，结合仿生寡肽设计的“双亲原则”，人工合成牙骨质蛋白1的仿生寡肽，并探究其诱导矿化及牙体硬组织再生的性能。

材料与方法：本研究通过文献综述，提取牙骨质蛋白1（CEMP1）发挥矿化作用的最可能的氨基酸组成，采用多肽的标准固相合成法，人工体外合成类CEMP1仿生寡肽的粉末。然后将多肽粉末溶解，形成浓度分别为1 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml溶液后，通过引入钙离子的方式，诱导该寡肽分子的自组装，扫描电镜和透射电镜观察多肽自组装后的形态，圆二色谱分析多肽自组装后的二级结构的组成及含量。随后，将自组装后的寡肽覆盖在透射电镜铜网表面，浸入含有钙离子及磷酸根离子的过饱和矿化溶液中，观察该寡肽自组装形成的纳米纤维胶束与钙离子及磷酸根离子的结合能力，评价其诱导矿化的性能。最后，将多肽溶液结合在脱矿的牙本质表面，诱导寡肽自组装后，在钙磷过饱和矿化液中分别孵育1天，2天，3天，评价该寡肽对于牙体硬组织矿化再生的影响。

结果：扫描电镜和透射电镜观察多肽自组装后形成纳米级纤维胶束样结构；对该纤维胶束进行圆二色谱分析后发现，该仿生寡肽自组装形成的二级结构主要为螺旋结构。将该纤维样的自组装多肽在含有钙磷过饱和溶液中进行矿化诱导，发现该纤维束样结构表面及周围有磷酸钙盐的沉积，形成类似串珠样结构。最后将多肽结合到脱矿的牙本质表面，使其浸入到钙磷过饱和溶液中，在37摄氏度下分别孵育1天,2天,3天，与不加多肽的对照组比较，获得的再生类牙体硬组织样结构的时间更短，再生的矿化物与天然的

牙本质之间的连续性更好，结合更加紧密。

结论：本发明获得CEMP1仿生寡肽，具有较好的自组装性能和优良的矿化性能，能够诱导形成类牙体硬组织样结构，能够模拟天然的CEMP1发挥诱导矿化的功能。并且，该种仿生寡肽，分子量较小，能够通过人工合成，能够缓解基因工程获取蛋白方式存在的提纯工艺复杂，成本高，制品纯度达不到要求等局限性。并且证明了该仿生寡肽具有较好的自组装特点及矿化性能，且能够在牙本质表面诱导类牙体硬组织结构的矿化物形成。

牙龈卟啉单胞菌脂多糖对骨髓基质细胞膜片体内成骨作用研究

王松^{1,2,3}，何梦娇¹，吴玉铭^{1,2,3}，周玲^{1,2,3}，骆凯^{1*}

- 1.福建医科大学附属口腔医院牙周科，
- 2.福建省高校口腔医学重点实验室，
- 3.福建省口腔生物材料工程技术研究中心

目的：探讨不同浓度的牙龈卟啉单胞菌脂多糖（*Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, P.g-LPS）对骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)膜片体内成骨能力的影响。

材料与方法：

分离培养6周龄SPF级雄性SD大鼠BMSCs，采用富含维生素C的培养基连续培养诱导形成细胞膜片，分别以不同浓度（0 μ g/ml、1 μ g/ml和10 μ g/ml）的P.g-LPS作用于BMSCs膜片12h，将上述膜片与羟基磷灰石-磷酸三钙（HA-tricalcium phosphate, HA-TCP）复合后植入6周龄SPF级雄性裸鼠皮下。8周后取材经4%多聚甲醛固定，10%EDTA脱钙，酒精梯度脱水，二甲苯透明，石蜡包埋后进行HE和Masson染色。使用Image J软件计算各组新生骨样组织面积并进行统计分析。

结果：

组织学染色结果显示P.g-LPS浓度为0 μ g/ml组和浓度为1 μ g/ml组均可见大量染

色均匀的细胞基质，少量纤维结缔组织以及小血管。1 μ g/ml组可见大量的立方状成骨细胞围绕贴附于片状的骨样组织边缘，部分成熟的骨样组织联合成连续的板层样。0 μ g/ml组成骨细胞和骨样组织量相对于1 μ g/ml组略少且形成的骨样组织中含有少量的未完全成熟的点片状骨样组织。10 μ g/ml组可见明显的纤维结缔组织，细胞基质较少，成骨细胞数量也较0 μ g/ml组和1 μ g/ml组少，且形成的多为散在的未成熟点状骨样组织，面积较小。各组新生骨样组织面积分析结果显示，1 μ g/ml组新骨形成面积 (4.717 \pm 0.617) μ m²显著高于10 μ g/ml组 (1.456 \pm 0.605) μ m² ($p < 0.001$) 及0 μ g/ml组 (3.364 \pm 0.984) μ m² ($p < 0.005$)。10 μ g/ml组 (1.456 \pm 0.605) μ m²新骨形成面积显著小于0 μ g/ml组面积 (3.364 \pm 0.984) μ m² ($p < 0.001$)。

结论:

BMSCs膜片体内具有良好的骨再生能力，其成骨能力受不同浓度P.g-LPS的影响，低浓度P.g-LPS对BMSCs膜片的成骨能力有一定的促进作用，高浓度P.g-LPS则可显著抑制BMSCs膜片的成骨能力。

关键词: 骨髓基质细胞；细胞膜片；牙龈卟啉单胞菌脂多糖；骨再生；组织工程

MicroRNA -181b-5p regulates TNF- α -induced inflammation in cementoblasts

Xiaoxuan Wang¹, Zhengguo Cao^{1,2}

¹ The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology (Hubei-MOST KLOS) & Key Laboratory for Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education(KLOBME), School & Hospital of Stomatology, Wuhan University, ² Department of Periodontology, School & Hospital of Stomatology, Wuhan University

Aim:

To elucidate the effect of miR-181b-5p on TNF- α -induced inflammation in cementoblasts and explore whether miR-181b-5p mediates the inflammation-associated resorption of mineralized tissues.

Methods:

OCCM-30 cells, an immortalized mouse cementoblast cell line, were treated with or without TNF- α . The mouse periapical lesion was induced. The mandibular first molar, including a section of bone around it, was collected and total RNA was extracted. Proinflammatory cytokine and miR-181b-5p were detected by real-time PCR. MiR-181b-5p mimics/inhibitors were transfected into OCCM. Interleukin 6 (IL-6) was measured by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MiR-181b-5p targeting the 3'-untranslated regions (UTR) of IL-6 mRNA will be assayed using a dual-luciferase reporter assay system after bioinformatics analysis. The STAT3 signaling pathway was analyzed by western blot. The markers of cementoblast differentiation and mineralization, OCN, ALP, Osterix were analyzed by real-time PCR. The osteoclastogenesis-associated gene of cementoblasts, MCP-1 and RANTES were detected by real-time PCR. The lentiviral vector of overexpressing miR-181b-5p is constructed, and OCCM-30 cells overexpressing miR-181b-5p stably will be co-cultured with bone marrow stromal cells (BMSC). Then the markers of osteoclast differentiation will be detected and the TRAP staining will also be used.

Results:

1. MiR-181b-5p decreased during TNF- α -induced inflammation. Furthermore, *Il-6* and miR-181b-5p were reduced in the mouse periapical lesion.

2. IL-6 may be a target gene of miR-181b-5p. Bioinformatics analysis revealed that IL-6 is a candidate target gene of miR-181b-5p. Moreover, miR-181b-5p overexpression suppressed IL-6 levels. Transfection with miR-181b-5p inhibitors also increased the expression of IL-6 after TNF- α

stimulated six hours.

3. MiR-181b-5p weakened TNF- α -induced inflammation in cementoblasts through STAT3 signaling pathway.

4. MiR-181b-5p may mediate the inflammation-associated resorption of mineralized tissues. There was no statistic difference that miR-181b-5p modulates cementoblast differentiation. However, miR-181b-5p overexpression suppressed the level of RANTES, which recruits osteoclast precursors and directly enhance osteoclast formation. The results that OCCM-30 cells overexpressing miR-181b-5p stably co-cultured with BMSC may also demonstrate these.

Conclusion:

Our data clarified that microRNA-181b-5p may regulate TNF- α -induced inflammation in cementoblasts by targeting IL-6, at least partially through STAT3 signaling pathway. And, miR-181b-5p may also mediate the inflammation-associated resorption of mineralized tissues through the communication between cementoblasts and osteoclasts. These findings will reveal the expanded function of miRNAs in cementogenesis.

MiR-181b-5p调控TNF- α 诱导的成牙骨质细胞炎症

王晓璇¹, 曹正国^{1,2}

¹ 武汉大学口腔医学院口腔基础医学省部共建国家重点实验室培训基地和口腔生物医学教育部重点实验室² 武汉大学口腔医院牙周科

目的:

牙骨质是一薄层矿化组织,对牙齿与周围牙槽骨的连接起到重要作用。在肿瘤坏死因子(TNF- α)的刺激下,可以形成牙骨质的成牙骨质细胞会被抑制细胞分化和矿化。近年来,研究表明miRNA可以通过调控炎症状态的成骨细胞来调节骨形成和骨改建。然而,关于miRNA对TNF- α 诱导炎症状态的成牙骨质细胞分化调控作用,相关研究甚少。因此,我们的研究目的是阐明miR-181b-5p在TNF- α 诱导成牙骨质细胞炎症过程中的作用,并探讨miR-181b-5p是否调控炎症状态下矿化组织的再吸收。

材料与方法:

OCCM-30细胞, 永生化小鼠成牙骨质细胞系, 用或不用TNF- α 处理。诱导小鼠根尖周病变, 收集下颌第一磨牙, 包括其周围的一段骨, 并提取总RNA。通过实时PCR检测促炎细胞因子和miR-181b-5p。将MiR-181b-5p模拟物/抑制剂转染到OCCM中。通过实时PCR和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量白细胞介素6 (IL-6)。通过双荧光素酶报告, miR-181b-5p是否靶向作用在 IL-6 mRNA的3' UTR区。通过western blot分析STAT3信号通路。通过实时定量PCR分析成牙骨质细胞分化和矿化, 如OCN, ALP, Osterix的表达。通过实时定量PCR检测成骨细胞的破骨相关指标, MCP-1和RANTES。构建过表达miR-181b-5p的慢病毒载体, 稳定过表达miR-181b-5p的OCCM-30细胞与BMSC共培养。然后将检测破骨细胞分化的指标并进行TRAP染色。

结果:

1.在TNF- α 诱导的炎症下, MiR-181b-5p表达量降低。此外, 小鼠根尖周病变中的IL-6和miR-181b-5p减少。

2.IL-6可能是miR-181b-5p的靶基因。生物信息学分析显示IL-6是miR-181b-5p的候选靶基因。此外, miR-181b-5p过表达抑制IL-6水平。用TNF- α 刺激6小时后, 用miR-181b-5p抑制剂转染也增加了IL-6的表达。

3. MiR-181b-5p通过STAT3信号通路减弱TNF- α 诱导的成牙骨质细胞炎症。

4. MiR-181b-5p可能调控炎症状态下矿化组织的再吸收。miR-181b-5p调节成牙骨质细胞分化没有统计学差异。然而, miR-181b-5p过表达抑制了RANTES的水平, RANTES募集破骨细胞前体并直接增强破骨细胞的形成。后期, 将稳定过表达miR-181b-5p的OCCM-30细胞与BMSC共培养也可证明这一观点。

结论:

我们的数据表明了microRNA-181b-5p可能通过靶向IL-6来调节成牙骨质细胞中TNF- α 诱导的炎症。并且, miR-181b-5p还可能通过成牙骨质细胞和破骨细胞之间的通讯, 调控炎症状态下矿化组织的再吸收。

母体血清中RAGE升高和IL-12p40降低与胎鼠腭裂畸形相关

王欣欢, 孟柳燕*, 边专*

武汉大学口腔医学院口腔生物医学工程教育部重点实验室

【摘要】

目的:唇腭裂是口腔颌面部最常见的先天性畸形, 其病因尚未完全明了, 多认为是基因与环境因素相互作用导致。超声检查为产前诊断唇腭裂的首选方法, 但该方法受操作者经验、仪器分辨力、孕妇腹壁厚度、胎儿大小及体位、羊水量及唇腭裂类型等影响。腭

部位于口腔深部，其四周有上颌牙槽骨遮盖，而超声对高密度物质的穿透性不高，故单纯腭裂常漏诊。血清检测是临床常用的遗传学检测方法，临床上多采用孕中期检测血清中甲胎蛋白、游离- β -绒毛膜促性腺激素和游离雌三醇的水平，筛查诊断唐氏综合征、开放性神经管缺陷和18-三体综合征等疾病。但到目前为止，仍没有唇腭裂血清特异性蛋白质的预测指标。本研究试图寻找腭裂胎鼠母体血清中的特异性标志蛋白，为临床产前诊断唇腭裂提供指导和帮助。**材料和方法：**利用全反式维甲酸 (atRA) 和TCDD分别构建小鼠腭裂模型，收集E13.5-E16.5正常组和腭裂组母体血清和胎鼠头部。通过HE染色观察正常组和腭裂组胎鼠腭组织的发育过程以及形态变化。采用ELISA方法检测正常组和腭裂组母体血清中RAGE、IL-10、IL-12p40/p70、IFN-beta、IFN-gamma、LIF和epiregulin等蛋白的表达情况，确定腭裂胎鼠母体血清特异性标志蛋白。**结果：**胎鼠腭部HE染色结果显示：正常组经历双侧腭板垂直向生长、上抬接触并形成腭中线上皮缝 (MES)、MES消失以及腭板完全融合等过程；而atRA组在E13.5-E16.5整个时期，双侧腭板一直处于垂直生长状态，TCDD组双侧腭板虽能正常上抬至水平方向，但较正常组推迟一天，且腭板形态短小不能相互接触。ELISA结果显示：atRA组和TCDD组腭裂胎鼠母体血清中RAGE 表达在E13.5较正常组显著性增加，而IL-12p40表达在E13.5和E14.5较正常组明显降低；IL-10、IL-12p70、IFN-beta、IFN-gamma、LIF和epiregulin等蛋白在正常组和腭裂组之间表达并无明显差异。**结论：**胎鼠腭发育早期母体血清中高表达的RAGE和低表达的IL-12p40可能与胎鼠腭裂畸形相关，但RAGE和IL-12p40是否可作为唇腭裂标志蛋白有待进一步临床研究。

关键词：RAGE, IL-12p40, 唇腭裂, 产前诊断

ps4b在小鼠磨牙牙胚发育的时空表达

陈栋 李晓聪 鲁方丽 王莹莹 李强 田晴

郑州大学第一附属医院：河南省口腔医院

【摘要】目的 细胞液泡蛋白质分选因子4 B (Vacuolar protein sorting 4B, VPS4B) 是AAA ATP酶家族成员之一，在细胞内蛋白质运输、溶酶体降解、病毒体出芽以及调节有丝分裂等过程中发挥着重要的作用。本课题组此前对一个牙本质发育不良 I 型 (Dentin dysplasia type I, DD-I) 家系进行外周血基因测序发现其致病基因

为 *VPS4B*, 本实验目的是研究Vps4b (Vacuolar protein sorting 4b, 液泡分选蛋白4b) 在正常小鼠磨牙牙胚发育不同时期的表达变化情况。**材料与方法** 选取8周龄健康C57BL/6J雌鼠25只雄鼠10只(济南朋悦); 柠檬酸抗原修复液、PBS、兔抗小鼠Vps4b抗体(博奥森, 中国); SP免疫组化试剂盒(武汉博士德), DAB显色试剂盒(武汉博士德), 切片机(Leica, 德国); 光学显微镜及照相系统(Olympus, 日本)。将c57雌雄小鼠以3:1比例合笼, 孕栓出现当日中午定为胚胎发育第0.5天(E0.5), 新生鼠鼠龄计算以出生当天中午定为出生后第0.5天(P0.5)。脱颈处死E13.5、E14.5、E16.5d的孕鼠及P2.5、P7的幼鼠, 取胚胎鼠头部及幼鼠下颌骨组织, 浸于4%多聚甲醛中于4°C条件下固定24h, 流水冲洗后脱水、透明、浸蜡、包埋, 制备5μm连续切片备用(其中新生幼鼠下颌骨固定后需先在10%EDTA溶液中脱钙)。采用组织化学染色光镜下观察, 确定各时间点C57小鼠第一磨牙牙胚的发育时期, 最后用免疫组织化学法检测牙胚中Vps4b的表达情况。**结果** 胚胎13.5、14.5、16.5天小鼠第一磨牙牙胚分别处于蕾状期、帽状期、钟状早期, 出生后2.5、7天分别处于分泌期和矿化期; Vps4b表达于小鼠磨牙发育的整个过程, 并在构成牙胚的各类细胞及周围细胞中均有不同程度的表达。蕾状期Vps4b在各细胞均有表达, 且在上皮细胞中呈强阳性表达, 邻近的间充质细胞中呈阳性表达; 帽状期Vps4b在成釉器中强阳性表达, 在牙乳头和牙囊中阳性表达; 钟状早期Vps4b表达情况如下: 成釉器中强阳性表达, 牙乳头中阳性表达, 牙囊中弱阳性表达; 分泌期Vps4b在成釉细胞和成牙本质细胞中强阳性表达, 在牙乳头中阳性表达, 牙囊中阴性表达; 矿化期Vps4b在成釉细胞和成牙本质细胞中连续强阳性表达, 牙乳头中广泛表达, 牙囊细胞中不表达。**结论** Vps4b表达于正常小鼠牙胚发育过程中, 在小鼠牙胚发育的不同阶段表现出时空表达分布的特异性, 依据其分布特点推测其可能对牙胚发育的启动、多种细胞的分化、形态发生、基质分泌、牙根形成以及釉质矿化等过程具有重要的调节作用, 即Vps4b可能参与了牙胚的正常发育。

[关键词] 小鼠牙胚; 发育; 免疫组化; Vps4b

维甲酸通过调控HDAC4/5磷酸化调控舌畸形的研究

王瑜¹, 周楠¹, 靳亚茹¹, 高琚, 陈晓艳, 史一丁, 刘超*, 肖晶*

大连医科大学口腔医学院口腔病理系

大连市口腔基础研究重点实验室

目的: 本研究利用过量维甲酸诱导的小鼠舌发育异常模型以及过量 RA 作用下C2C12 细胞的肌向分化模型, 研究 RA 是否通过 Camk2d 调节 HDAC4/5 的细胞定位进而调控舌肌分化, 及 RA 是否可直接调控 Hdac4/5 的表达影响舌肌发育。

方法: 1. Masson 染色法观察过量 RA 作用下 E12.5、E14.5 和 E16.5 天冠状面及矢状面舌组织的形态学变化, 并测量舌横径和长度。2. Myosin 免疫组织化学染色法观察 E14.5 天过量 RA 对舌肌分化的影响。3. 利用 Real-Time PCR 及 Western Blot 法, 检测 E14.5 天舌组织过量 RA 对 *Hdac4/5*、*Mef2c* 的 mRNA 表达水平和 HDAC4/5 蛋白磷酸化及 MEF2C 蛋白水平的影响。4. 应用细胞免疫荧光法检测 C2C12 细胞肌向分化过程中 Myosin 的表达, 并观察细胞的形态学改变; Real-Time PCR 检测 *Camk2d* 及 *MRFs* 的表达变化。5. 用 Real-Time PCR 及 Western Blot 法, 检测 C2C12 细胞中过量 RA 对 *Hdac4/5*、*Mef2c* 的 mRNA 表达水平和 HDAC4/5 蛋白磷酸化及 MEF2C 蛋白水平的影响。6. 利用 NCBI 及 GeneCopoeia 查询小鼠、大鼠及人源 *Hdac4/5* 基因序列及启动子区域, 查找维甲酸反应元件

结果: 1. 对体内舌组织的 Masson 染色, 冠状面染色结果显示, RA 组呈现舌体高耸与舌内肌排列紊乱, 舌肌发育延迟, 舌横径减小。矢状面染色显示, RA 组舌体高耸及颊舌肌单个肌束纤细, 舌长度减小。2. E14.5 天舌组织肌球蛋白 Myosin 染色结果显示, RA 组 Myosin 表达减少, 且舌内肌不如正常组发达, 颊舌肌单个肌束面积亦减小。3. RA 组舌组织内 *Hdac4* 与 *Hdac5* 的 mRNA 水平升高, HDAC4/5 蛋白水平无明显差异, 而 HDAC4/5 磷酸化水平降低。 *Mef2c* 的 mRNA 及蛋白水平降低。4. C2C12 肌向分化第 4 天镜下及 Myosin 免疫荧光染色, 发现过量维甲酸使肌管形成减少, 且较正常组细。成肌调节因子 Myf5、Myod 和 Mrf4 的表达降低, *Camk2d* 的表达亦降低。5. 对体外 C2C12 细胞研究结果显示, 在肌向分化第 4 天, RA 组 *Hdac4* 和 *Hdac5* 的 mRNA 水平均降低, HDAC4/5 的蛋白水平与磷酸化水平也降低。 *Mef2c* 的 mRNA 及蛋白水平降低。

结论: 过量 RA 可能与 *Hdac4* 上 RARE 结合, 直接调节 *Hdac4* 表达, 亦可通过抑制 *Camk2d* 表达, 使得 HDAC4/5 磷酸化后转运出核受到抑制, 与 MEF2 结合后降低成肌特异性因子活性, 进而抑制舌肌分化。提示了 RA 诱导舌发育畸形小鼠中过量 RA 可能通过不同方式调控 HDAC4/5 进而抑制舌肌发育。

Wnt和Hippo信号通路在牙周膜干细胞成骨分化中的交叉调控研究

文勇

山东大学口腔医院种植科; 山东省口腔组织再生重点实验室

摘要

目的: 研究改变经典Wnt信号通路对PDLSCs成骨分化的影响, 以及Hippo通路上下游组分的表达变化。探讨经典Wnt信号通路调控Hippo信号通路的分子机制, 阐述YAP/β

-catenin信号调控PDLSCs分化的分子网络。

方法：培养原代牙周膜干细胞，分别用重组Wnt3a、重组DKK-1蛋白处理，激活、抑制经典Wnt信号通路，ALP染色及茜素红钙结节染色检测细胞成骨活性改变，WB、q-PCR测定成骨相关因子ALP、Col-1及Runx-2的表达情况，以及Hippo信号通路各组分的表达变化。用Co-IP方法检测经典Wnt信号通路中相关蛋白与Hippo通路核心激酶及调节因子作用位点。

结果：激活经典Wnt信号通路后，ALP染色及茜素红钙结节染色检测牙周膜干细胞成骨活性增强，ALP、Col-1及Runx-2的表达上调，Hippo信号通路中转录共激活因子TAZ表达增加，而其上游Mob1、LATS1、Sav1、MST2表达降低；抑制经典Wnt信号通路后，ALP染色及茜素红钙结节染色检测牙周膜干细胞成骨活性减弱，ALP、Col-1及Runx-2的表达下调，TAZ表达降低，而其上游Mob1、LATS1、Sav1、MST2表达增加；Co-IP结果显示 β -catenin与TAZ， β -catenin与Mob1产生结合效应。

结论：经典Wnt信号通路与Hippo信号通路存在交互作用。激活经典Wnt信号通路正向调控牙周膜干细胞成骨分化能力，并且抑制Hippo信号通路表达；抑制经典Wnt信号通路负向调控牙周膜干细胞成骨分化能力，并促进Hippo信号通路表达。在阐述TAZ/ β -catenin信号调控PDLSCs成骨分化的分子网络的基础上，寻找到Wnt信号通路与Hippo信号通路潜在新的蛋白结合位点 β -catenin与Mob1，证实经典Wnt信号通路与Hippo信号通路共同调节牙周膜干细胞成骨分化。

TCR β +CD8 $\alpha\alpha$ +非传统型淋巴细胞在小鼠口腔黏膜中的免疫功能

吴瑞卿^{1,2}, 张敦房¹, Peter Zanvit¹, 王昊², Wenwen Jin¹, 王松灵³, 陈谦明⁴, WanJun Chen^{1*}

1. Mucosal Immunology Section, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, 2. 首都医科大学附属北京天坛医院, 3. 唾液腺疾病中心, 基因治疗和牙再生分子实验室, 北京市牙再生和功能重建重点实验室, 首都医科大学附属北京口腔医院, 4. 口腔疾病研究国家重点实验室, 华西口腔医学院/医院, 四川大学

目的:

淋巴细胞是黏膜免疫系统防御的最前沿, 对外来抗原及病原侵入及时产生免疫应答, 并可感受上皮细胞压力和损伤信号。口腔是呼吸道和消化道共同开端, 并处于严峻的理化、生物环境的挑战中, 并经受多种来自食物、饮料、烟酒、微生物等的抗原刺激。因此, 口腔黏膜免疫系统维护内环境稳定。发生于口腔的多种黏膜病、牙周疾病、肿瘤均被发现与免疫失调有关, 且在口腔黏膜、牙周、骨组织的损伤、修复、改建过程中免疫系统均发挥着重要作用。然而目前仅有研究发现口腔黏膜上皮中存在上皮间淋巴细胞, 但尚无研究介绍从口腔黏膜分离上皮间淋巴细胞和淋巴细胞的方法步骤, 也无研究阐明口腔黏膜淋巴细胞各亚群表型、分布及特点, 更没有有关口腔淋巴细胞在正常生理状态下和病理过程中的功能研究。既往有关炎性肠病的研究提示肠道中非传统型TCR β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺淋巴细胞具有免疫调节功能, 可控制炎症的发生发展。本研究拟建立从口腔黏膜分离淋巴细胞的方法, 观察其亚群表型及组成, 探究口腔黏膜中是否存在有非传统型TCR β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺淋巴细胞, 并初步分析其功能。

材料与方法:

C57BL/6J小鼠, 饲喂抗生素饮水C57BL/6J小鼠, 咪喹莫特乳膏 (IMQ) 诱导炎症C57BL/6J小鼠, *Tgfb1*^{-/-}, *Tgfb1*^{fl/fl} *Cd4-Cre*⁺ 敲基因小鼠, *Ab1/TGF- β 1*-转基因小鼠; 抗生素饮水饲喂小鼠。处死后提取小鼠口腔黏膜IELs, 并以荧光抗体染色, 流式细胞术分析。

结果:

我们建立有效的口腔黏膜淋巴细胞分离提取方法, 通过流式细胞术检测, 发现小鼠口腔黏膜存在TCR β ⁺CD4⁺, CD8 $\alpha\beta$ ⁺亚群淋巴细胞。并且存在发挥免疫调节功能的TCR β ⁺CD4⁺Foxp3⁺, 此外还发现TCR β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺和TCR $\gamma\delta$ ⁺非传统型IELs亚群, 并发现TGF- β 1调控非传统型TCR β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺淋巴细胞的发育及表达, 我们发现在正常生理状态下, IFN- γ 为口腔IELs主要的细胞因子, 此外还有IL-17A, IL-4及IL-10的表达。在炎症状态下口腔黏膜IELs上调IFN- γ 的表达发挥促炎作用, 并在IMQ诱导的炎症动物模型中发现口腔黏膜非传统型TCR β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺淋巴细胞的表达上调, 在抗生素饮水饲喂小鼠动物模型中此亚群表达下调。

结论:

通过研究, 我们率先建立和优化了分离小鼠口腔黏膜上皮间淋巴细胞和淋巴细胞的步骤和方法, 发现口腔黏膜与肠道上皮间淋巴细胞类似但具其自身特点: 口腔上皮间淋巴细胞中大多为传统型淋巴细胞, 非传统型淋巴细胞亚群与肠道黏膜相比含量较低, 但表型特点相同, 随着小鼠年龄增长, 非传统型淋巴细胞含量逐渐减少, 而非传统型增多。TGF- β 信号通路调控小鼠肠道及口腔黏膜非传统型TCR β ⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺淋巴细胞亚群表达, 这从侧面反映了口腔黏膜与肠道淋巴细胞由胸腺内同一群前体细胞发育而成的。在正常生理状态下, 传统型与非传统型上皮间淋巴细胞均以分泌IFN- γ 为主以及IL-17A、IL-4和IL-10, 此外还有大量Foxp3⁺ IELs富集。因此, 口腔黏膜IELs发挥免疫应答及调节功

能。

另外，我们利用IMQ诱导小鼠炎症模型观察到非传统型TCR β +CD8 $\alpha\alpha$ +淋巴细胞增多，而且口腔黏膜各型淋巴细胞，上调IFN- γ 表达的趋势。因有研究表明IFN- γ 可诱导TCR β +CD8 $\alpha\alpha$ +分化和亚群扩增，而在此动物模型中，虽然其处于严重的全身炎症状态但口腔并未发现病损。因此，我们推测IELs分泌的IFN- γ 诱导了TCR β +CD8 $\alpha\alpha$ +亚群的分化和克隆增殖，并在此炎症状态下发挥了免疫调节和免疫耐受的功能，保护了口腔黏膜在炎症状态下免受其他免疫细胞浸润和损害。

另外在饲喂抗生素饮水的小鼠口腔黏膜中TCR β +CD8 $\alpha\alpha$ + IELs减少而传统型亚群增多。

IL-17对小鼠实验性牙周炎骨破坏的作用研究

吴偲偲 王晓茜 徐 艳

1.南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室；2.南京医科大学附属口腔医院牙周科

摘要

目的：通过构建IL-17A基因敲除小鼠动物实验性牙周炎模型，初探IL-17参与调控牙周炎骨破坏的作用。

材料与方法：选用6-8周龄SPF级C57BL/6雄性野生型小鼠（南京医科大学实验动物中心提供）和IL-17A基因敲除小鼠（南大造模中心提供），通过结扎和喂菌诱导小鼠实验性牙周炎，野生型实验小鼠及IL-17A基因敲除型小鼠均分为正常对照组和牙周炎组，每组6只。将羊血保存的牙龈卟啉单胞菌（*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*）ATCC33277（南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室提供）接种于BHI血琼脂培养基上，在厌氧环境（37°C，80%N₂、10%H₂、10%CO₂）下培养5天。BHI液体增菌24小时。收集培养的*P.gingivalis*菌株，细菌比浊仪测定细菌密度，以菌密度 $1 \times 10^9 \text{ mL}^{-1}$ 将*P.gingivalis*重悬于2.5%羧甲基纤维素的PBS液中。牙周炎组为用5-0丝线结扎小鼠上颌双侧第二磨牙，并保证丝线不脱落，结扎后用微量移液器将100 μL 细菌悬液涂抹于小鼠龈缘至整个口腔，连续涂抹3天，诱导建立牙周炎模型；正常对照组为不结扎不喂菌仅涂抹相同体积含2.5%羧甲基纤维素的PBS液。所有实验小鼠均在南京医科大学实验动物中心饲养和管理。确认构建牙周炎模型成功4周后处死小鼠收集上颌骨，于

4%多聚甲醛溶液中4°C过夜，后在70%乙醇中4°C保存。进行Micro-CT断层扫描成像，使用skyscan软件三维重建图像并进行数据分析；将保存的上颌骨样本于20%的EDTA溶液中进行脱钙处理，修剪样本、脱水、石蜡包埋，切片贴片烤片，进行HE染色、Trap染色、免疫组化和组织病理学分析。

结果：在喂菌和结扎诱导的小鼠实验性牙周炎模型中，IL-17A基因敲除小鼠较野生型小鼠在Micro-CT扫描后用skyscan三维重建的上颌骨颊、腭侧图像及近远中向截面图可见牙槽骨吸收减少，上颌第二磨牙近中及远中牙槽嵴顶到釉牙骨质界的线性距离降低，骨体积分数比及骨密度升高 ($p < 0.05$)；HE染色中可见牙槽骨吸收减少；Trap染色中可见破骨细胞的Trap阳性表达降低；免疫组化结果显示牙周组织Rankl的表达降低。

结论：在小鼠实验性牙周炎模型中通过敲除IL-17A，沉默IL-17A的表达，有效抑制了牙槽骨吸收，提示IL-17A在牙周炎中可能起到了促进牙周炎发生发展及促进牙槽骨吸收的作用。

iRoot SP对大鼠骨髓间充质干细胞增殖分化的影响

吴潇，陆嘉敏，葛兴云，李泽汉，雷港，于金华

南京医科大学口腔疾病研究所江苏省重点实验室，南京医科大学口腔医学院

【摘要】

目的 研究新型生物活性陶瓷材料iRoot SP对大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 增殖分化的影响

材料与方法 从大鼠股骨分离培养BMSCs，用10% FBS/DMEM培养，取第三代至第五代细胞用于实验。将iRoot SP制备成浓度稀释比例为0、0.02、0.2、1、2、4g/ml的条件浸取液，检测其碱性磷酸酶 (ALP) 活性以确定最佳作用浓度。采用最佳作用浓度刺激BMSCs，进行细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 测定以评估iRoot SP处理后对增殖的影响。通过ALP染色及茜素红染色观察结节形成。并以细胞划痕实验评估材料对其迁移的影响。提取细胞总蛋白及总RNA，进行实时逆转录聚合酶链反应和蛋白质印迹实验 (Western blot)，评价mRNA和蛋白水平各项成牙/骨指标的表达情况。

结果 0.2g / ml是iRoot SP诱导BMSCs的最佳浓度。iRoot SP处理的BMSCs茜素红染色显示出比未处理组更多的矿化结节，并促进了细胞的迁移，而增殖无明显影响 ($P <$

0.05)。成牙/骨细胞标记物 (*Alp*/ALP, *Runx2*/RUNX2, *Osx*/OSX, *Ocn*/OCN等) 与未处理的BMSCs相比, iRoot SP诱导的BMSCs 显著上调 ($P < 0.05$)。

结论 0.2mg / ml的iRoot SP不影响大鼠骨髓间充质干细胞的增殖能力, 对其成牙/骨分化有明显促进作用, 具有良好的生物学性能。

【关键词】 iRoot SP, BMSCs, 分化

SCAPs Regulate Differentiation of DFSCs During Tooth Root Development in Swine

Xiaoshan Wu^{1,2}, Lei Hu², Yan Li², Yang Li², Fu Wang³, Ping Ma², Jinsong Wang², Chunmei Zhang², Canhua Jiang¹, Songlin Wang²

1Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Xiangya Hospital, Central South University; 2Molecular Laboratory for Gene Therapy and Tooth Regeneration, Beijing Key Laboratory of Tooth Regeneration and Function Reconstruction, Capital Medical University School of Stomatology; 3Department of Oral Basic Science, School of Stomatology, Dalian Medical University,

Abstract

Objective: The tooth root transmits and balances occlusal forces through the periodontium to the alveolar bone. The periodontium, including the gingiva, the periodontal ligament, the cementum and the partial alveolar bone, derives from the dental follicle (DF), except for the gingiva. In the early developmental stages, the DF surrounds the tooth germ as a sphere and functions to promote tooth eruption. However, the morphological dynamics and factors regulating the differentiation of the DF during root elongation remain largely unknown.

Methods: Miniature pigs are regarded as a useful experimental animal for modeling in craniofacial research because they are similar to humans with respect to dentition and mandible anatomy. In the present study, we used the third deciduous incisor of miniature pig as the model to investigate the factors influencing DF differentiation during root development. **Results:** We found that

the DF was shaped like a crescent and was located between the root apical and the alveolar bone. The expression levels of WNT5a, β -Catenin, and COL-I gradually increased from the center of the DF (beneath the apical foramen) to the lateral coronal corner, where the DF differentiates into the periodontium. To determine the potential regulatory role of the apical papilla on DF cell differentiation, we co-cultured dental follicle stem cells (DFSCs) with stem cells of the apical papilla (SCAPs). The osteogenesis and fibrogenesis abilities of DFSCs were inhibited when being co-cultured with SCAPs, suggesting that the fate of the DF can be regulated by signals from the apical papilla. The apical papilla may sustain the undifferentiated status of DFSCs before root development finishes.

Conclusion: These data yield insight into the interaction between the root apex and surrounding DF tissues in root and periodontium development and shed light on the future study of root regeneration in large mammals.

Key words: tooth root; root apex; dental sac; regeneration; mammals; *Sus scrofa*

Whole tooth regeneration in the jawbone of miniature pigs

based on cell -reassociated-scaffold -free technique

Zhifang Wu¹, Fu Wang^{1,2}, Songlin Wang^{1,3}

1 Molecular Laboratory for Gene Therapy & Tooth Regeneration, Beijing Key Laboratory of Tooth Regeneration and Function Reconstruction, School of Stomatology, Capital Medical University; 2 Department of Oral Basic Science, College of Stomatology, Dalian Medical University; 3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University

OBJECTIVES: Whether the strategy of epithelial-mesenchymal interaction-based whole-tooth regeneration can be applied to humans remains elusive. An essential pre-clinical study in large animal is required. Here, we developed feasible methods for whole tooth regeneration in minipigs based on the tooth developmental biology.

MATERIALS & METHODS: Single epithelial and mesenchymal cells were dissociated from cap staged tooth germ of the deciduous second incisor, and then reconstituted into re-associated tooth germs. The re-associated and intact tooth germs were cultured in an improved high-throughput suspension culture system loaded with Aspirin, and then transplanted into the jawbone of host miniature pigs pretreated with BMMSC infusion.

RESULTS: Images from computer tomography showed calcified structures with tooth-like shape in transplantation area. Histological analysis of the regenerated explants showed they contained organized enamel, dentin, cementum, periodontal membrane and pulp tissues similar with the natural tooth structure. **CONCLUSIONS:** Taken together, we developed a practical method for whole tooth regeneration with the swine tooth germ cell-based scaffold-free approach.

SIGNIFICANCE: This study will offer a reference for studying regeneration of human tooth in situ.

小型猪颌骨内全牙再生研究

吴志芳^{1, 2} 夏登胜¹ 王松灵^{1, 2*}

1. 首都医科大学附属北京口腔医院 2. 首都医科大学口腔医学院口腔医学研究所全牙再生及口腔组织功能重 北京市重点实验室

【摘要】 目的 基于发育原理, 采用细胞重组方法, 实现大型动物小型猪颌骨内全牙再生。**方法** 本实验以小型猪为动物模型 (n=7), 以胚胎猪帽状期牙胚为细胞来源, 分离牙胚上皮和间充质, 将其解离成单细胞后, 再重组成新的组织工程牙胚; 经体外三维培养后, 无需生物支架材料, 回植于成年小型猪颌骨内, 期间以骨髓间充质干细胞和阿司匹林为免疫调节介质 (n=4); 从影像学和组织学方面观察牙齿再生情况。**结果** 回植150天后, 影像学资料显示: 在有免疫干预的4头小型猪颌骨中, 有3头小型猪的回植

区可见高密度影的中心有一低密度影像，类似于牙体组织；用工程软件三维重建后，发现为再生牙类似于单根牙。HE染色，发现再生牙具有非常类似于自然牙的牙体及牙周组织结构，包括牙釉质、牙本质、牙髓、牙骨质、牙周膜及牙槽骨等。免疫组织化学染色发现：再生牙阳性表达NF和CD31，即具有神经和血管结构。**结论** 基于发育学原理，利用细胞重组技术，无需支架材料，可在大型动物颌骨内再生出具有类似于天然牙解剖结构的全牙，为将来开展人类全牙再生转化研究提供了有意义的参考依据。

关键词：小型猪 细胞重组 牙发育 全牙再生 颌骨内再生

促血管生成功能化自组装多肽对牙髓干细胞生物学行为影响的研究

夏鹏，陶硕，张旗*

同济大学附属口腔医院，上海牙组织修复与再生工程技术研究中心

目的：近年来运用组织工程学的牙髓再生技术成为研究热点，主要包含干细胞、支架和生长因子三要素。其中支架的作用至关重要，其作为输送干细胞的胞外基质构成了再生微环境，是调控干细胞分化命运的重要方式。目前在牙髓再生技术中，血管再生一直是瓶颈问题，由于牙髓组织四壁被硬组织包绕，仅通过根尖孔从外界获得血供，使得局部血管再生成为了牙髓再生的挑战。近期研究发现，修饰改性后的支架材料能够通过调控干细胞分化从而促进血管再生。本研究将具有促细胞粘附（PRG）和促血管生成（KLT）的短肽接枝到RADA16-I上，观察牙髓干细胞（hDPSCs）在功能化自组装多肽中三维培养条件下生物学行为的变化及其对血管内皮细胞（hUVECs）活性的影响。

材料与方法：①通过扫描电镜（SEM）、原子力显微镜（AFM）、圆二色谱（CD）、红外光谱（FTIR）、拉曼光谱（Raman）对所合成的材料进行表征验证；②收集并提取健康人牙髓干细胞（hDPSCs）并使用流式细胞术、成骨成脂成软骨三向分化进行鉴定；③以 RADA16-I 自组装多肽为主架，分别接枝PRG、KLT短肽，实验组为功能化自组装多肽RAD/PRG、RAD/KLT，对照组为未接枝短肽的RADA16-I。纳米纤维水凝胶构建体外hDPSCs的三维培养体系，通过共聚焦显微镜（confocal）观察hDPSCs在各组自组装多肽中的生长状态；应用CCK8实验、transwell实验和ELISA实验等检测在三维环境下，功能化短肽对hDPSCs增殖、迁移和生长因子分泌的影响；④收集各组三

维培养的培养基上清，应用CCK8实验、划痕实验、transwell实验和成管实验检测其对hUVECs的增殖、迁移和成管活性的影响。

结果：①SEM、AFM从形态、纤维直径上，CD、FITR、Raman从蛋白二级结构上显示材料合成成功；②流式细胞术（表面抗体CD34、CD90、CD105、CD146）、三向分化实验显示所提取细胞为hDPSCs；③confocal显示hDPSCs在各组中伸展状态良好，定量结果显示功能化多肽RAD/PRG、RAD/KLT中的干细胞数量多于RADA16-I；CCK8结果显示功能化多肽RAD/PRG、RAD/KLT能够促进hDPSCs的增殖；transwell结果显示功能化多肽RAD/PRG、RAD/KLT能促进hDPSCs的迁移；ELISA结果显示功能化多肽RAD/PRG、RAD/KLT能够增加hDPSCs分泌VEGF的量；④用各组三维培养hDPSCs的上清制备条件培养基培养hUVECs，结果显示，功能化多肽RAD/PRG、RAD/KLT的条件培养基能够促进hUVECs的增殖、迁移和成管。

结论：功能化自组装多肽RAD/PRG、RAD/KLT能够促进体外hDPSCs的增殖、迁移能力和VEGF的分泌；功能化自组装多肽RAD/PRG、RAD/KLT体外三维培养hDPSCs能够促进hUVECs的活性。

三碘甲腺原氨酸对人根尖牙乳头干细胞成骨向分化的影响

夏翊博，于金华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室，南京医科大学口腔医学院

目的：本研究探讨三碘甲腺原氨酸（3,3',5-Triiodo-L-thyronine, T3）对人根尖牙乳头干细胞(stem cell from apical papilla, SCAPs)成骨向分化能力的影响，并初步探究其调控机制，从而为探索甲亢患者应用SCAPs进行硬组织再生修复的可行性提供实验依据。

方法：南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科取根尖未闭合离体牙，通过酶消化法分离培养SCAPs。制备含不同浓度T3的培养基，将SCAPs 培养于不同浓度T3的培养基中作为实验组，培养于含生理浓度T3培养基中作为对照组。培养3d，检测各组的碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）活性，选取差异最显著浓度的作为实验浓度。将SCAPs 培养于选取浓度的T3条件培养基中作为实验组，培养于含生理浓度T3培养基

中作为对照组, CCK8 法绘制两组细胞生长曲线、流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 检测细胞周期, 检测T3对SCAPs 增殖能力的影响。分别培养0 d、 3 d 和7 d, 提取总蛋白和mRNA, 蛋白免疫印迹 (western blot) 检测骨向分化相关的蛋白 (OCN, OSX, RUNX2, ALP, DMP1, OPN) 的表达, 实时定量逆转录聚合酶链式反应 (real-time RT-PCR) 检测骨向分化相关的基因 (*OCN*, *OSX*, *RUNX2*, *ALP*, *DMP1*, *OPN*) 的表达。两组细胞培养5d 时进行BCIP/NBT碱性磷酸酯酶染色。两组细胞培养15d 时茜素红染色观察钙结节的形成情况, 并用氯化十六烷基吡啶 (CPC) 溶解钙离子进行定量检测。将SCAPs在T3条件培养基中分别培养0min、15min、30min、60min后提取胞浆、胞核蛋白, western blot检测NF- κ B信号通路相关蛋白的表达情况。

结果:当T3浓度升高到一定程度后ALP活性开始增高, 当T3浓度为 10^{-9} mol/L时, ALP活性最高 ($P<0.05$), 选取 10^{-9} mol/L为实验浓度。CCK8、 FMC结果显示T3实验组对SCAPs 增殖能力没有显著影响。实验组成骨向分化相关基因及蛋 (*OCN/OCN*, *OSX/OSX*, *RUNX2/RUNX2*, *ALP/ALP*, *OPN/OPN*) 表达水平在3d 和 (或) 7d 时较对照组显著升高 ($P<0.05$)。培养5 d后实验组BCIP/NBT碱性磷酸酯酶染色深度明显高于对照组。培养15d 后茜素红染色结果显示T3实验组矿化结节形成显著多于对照组, 实验组CPC定量显著高于对照组 ($P<0.05$)。加入T3培养后, NF- κ B信号通路被激活。

结论:本实验通过含 10^{-9} mol/L T3的条件培养基体外培养的SCAPs, 检测SCAPs 增殖能力和成骨向分化的相关指标。结果表明 9×10^{-9} mol/L T3可以通过激活NF- κ B信号通路促进SCAPs的成骨分化, 同时并不影响其增殖能力。

Ins2 细胞世系的追踪及相关表达研究

闫雯 向科臻 杨德琴
重庆医科大学

目的:

利用 Cre/Loxp 位点特异性重组系统在小鼠体内追踪 Ins2 表达细胞的世系图谱，并研究 Wnt/ β -catenin 信号通路在 Ins2-cre 世系细胞迁徙和发育过程中的作用；同时探索这些细胞迁徙部位的胰岛素存在状态，以及不同应激状态下的颌下腺内的胰岛素存在状态。

方法:

- 1.利用 Cre /loxP 系统标记细胞并观察 Ins2-cre 世系细胞的迁徙位点及时间;
- 2.通过分析 β -catenin 条件性敲除小鼠，研究 Wnt/ β -catenin 信号通路在 Ins2 世系细胞迁徙和分化过程中的作用
- 3.用免疫组化和免疫荧光等方法检测在 Ins2-cre 世系细胞内的胰岛素存在状态;
- 4.建立小鼠高血糖应激状态的动物模型，并检测颌下腺在应激反应条件下胰岛素的分泌状况

结果:

1. 成功观察到在 Ins2-cre 世系细胞在成年小鼠体内的迁徙部位：主要有胰腺，颌下腺，大脑等部位。
- 2.通过交配和筛选得到 β -catenin 功能完全缺失的小鼠，观察到相比未敲除 β -catenin 信号的小鼠，信号完全缺失小鼠体内的 ins2-cre 细胞的迁徙位点增加，在胰腺，颌下腺，嘴巴等部位均有报告基因的表达，提示 Wnt/ β -catenin 信号的表达可能会减少 ins2 细胞世系的迁徙位点。
- 3.通过组织切片的免疫组化和免疫荧光法检测到在 ins-cre 细胞迁徙的组织中，在颌下腺腺泡、导管细胞以及胰腺的胰岛中检测到胰岛素的阳性表达，提示胰岛素基因所迁徙的靶器官内可能存在有胰岛素的分泌。
- 4.成功建立高血糖应激状态的小鼠动物模型，检测到颌下腺在应激状态下有胰岛素存在。

结论:

Ins2 世系细胞在小鼠体内可迁徙至多个器官组织，在这些组织中可能有胰岛素的存在；Wnt/ β -catenin 信号通路会减少 Ins2 世系细胞的迁徙位点；颌下腺在应激状态下可能会分泌胰岛素以维持机体的稳态。目前阶段对于糖尿病的治疗以及糖尿病并发症的防治多采用口服药物等方法，但大多药物都会有诱发低血糖、胃肠道反应等缺点。本实验结果与前人研究结果一致，再次验证了非胰岛素器官可以表达胰岛素这一观点，为颌下腺可能作为基因治疗的靶器官来维持糖尿病患者的血糖稳定提供了一条新的思路，为临床上广大糖尿病牙周炎患者的治疗带来了福音。

敲减MicroRNA-31可部分改善颅骨锁骨发育不全 患者骨髓间充质干细胞的生物学特性

徐玲^{1,2#}, 傅瑜^{1,2#}, 江宏兵^{1,2*}

1江苏省口腔疾病研究重点实验室

2 南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科

摘要:

目的: 颅骨锁骨发育不全 (CCD) 是一种以骨骼发育不良为特征的常染色体显性遗传疾病, 由runx2相关的转录因子2 (RUNX2) 突变引起, 有显著发生骨质疏松的风险。越来越多的证据表明CCD患者骨发育不良是由于骨髓间充质干细胞 (BMSCs-CCD) 功能障碍导致, 但BMSCs-CCD与正常BMSCs相比的特征变化及相关机制尚不明确。

材料与方法: 本研究收集了3例CCD患者的临床资料, 并分别检测其RUNX2基因的突变情况。分别对比了BMSCs-CCD与健康供体的BMSCs的增殖和成骨能力及干性和衰老的特性。测定了BMSCs-CCD和BMSCs之间microRNA-31 (miR-31) 表达量的差异, 并使用表达抑制miR-31的慢病毒来确定miR-31在BMSCs-CCD功能变化中的作用。还探讨了RUNX2对miR-31的调节机制和miR-31介导的BMSCs-CCD干性和衰老特性及成骨能力变化的可能分子机制。

结果: 3例具有典型的临床表现CCD患者中的2例通过外显子组测序发现了两个RUNX2突变位点。与来自健康供体的BMSCs相比, BMSCs-CCD的增殖, 成骨能力和干性特征显著降低, 同时衰老增强。实验显示敲减miR-31后可调节SATB2, BMI1, CDKN, SP7的表达并改善BMSCs-CCD的表型。同时我们证明了在人BMSCs中RUNX2转录抑制microRNA-31 (miR-31) 的表达, 因此我们认为在CCD中RUNX2单倍体剂量不足导致的miR-31表达上调是导致BMSCs-CCD特性改变的重要原因。在细胞实验中, 敲减miR-31可以改善BMSCs-CCD的表型特征和成骨能力, 同样在体内实验中, 移植于裸鼠皮下使用慢病毒干扰敲减miR-31的BMSCs-CCD成骨显著增加。

结论: 综上所述, 我们的研究表明, BMSCs-CCD的生物学功能发生了改变。miR-31的表达变化对BMSCs-CCD的功能改变发挥着潜在作用。miR-31抑制剂在BMSCs-CCD中的应用可以对未来研究通过干细胞治疗来解决CCD相关骨骼疾病提供一个思路。

癌症基因组中核糖体DNA拷贝数丢失对DNA损伤 药物敏感性的作用研究

史善伟¹, 王力红¹, Jennifer Gerton², 夏娟¹, 王智¹, 廖贵清¹, 程斌¹, 许宝山^{1*}

1. 中山大学附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室

目的: 核糖体DNA (ribosomal DNA, rDNA) 编码核糖体的关键组分-核糖体RNA (rRNA), 对蛋白翻译和细胞增殖具有重要的作用。rDNA序列在基因组中高度冗余并有大量的重复拷贝。rDNA拷贝数在人类基因组中是易变的, 然而人们对rDNA的拷贝数变异及其稳定性在肿瘤发生中的生物学意义所知甚少。本研究聚焦于解析癌症基因组中的rDNA拷贝数变异及其在癌症治疗中发挥的作用。

材料与方法: 本研究采用患者的原代肿瘤和癌旁正常组织样本, 并结合多个肿瘤细胞系与PTEN基因敲除的小鼠癌症模型, 综合运用了免疫荧光染色方法、激光共聚焦显微成像、微滴式数字PCR、全基因组测序技术、生物信息学分析等细胞和分子生物学手段。

结果: 本研究发现多种癌症类型中rDNA拷贝数显著减少, 并伴随许多其他基因拷贝数的变异。此外癌症基因组的rDNA序列也更易发生突变。通过造血干细胞特异性敲除PTEN基因的小鼠白血病模型, 揭示这一类癌症干细胞早期发生了rDNA拷贝数的减少, 但其细胞增殖、rRNA合成和蛋白翻译水平均有显著提高。此外rDNA拷贝数减少的癌症干细胞对诱导DNA损伤的化疗药物高度敏感。进一步发现了口腔癌患者的原代肿瘤基因组中rDNA拷贝数发生频繁的丢失; 应用特异性抑制rRNA转录和诱导DNA损伤的药物对口腔癌有显著的治疗效果。

结论: 本研究阐释了癌细胞可精简基因组中冗余的rDNA重复序列来达到快速增殖的目的, 同时也提示rDNA拷贝数丢失的检测, 有望成为预测癌症对抑制rRNA合成与诱导DNA损伤的化疗药物敏感性的一种简单有效的新型生物标记物。

酒精对小鼠腭突细胞增殖的影响

许海娟¹ 杜娟^{1*}

首都医科大学附属北京口腔医院

【摘要】：目的 酒精是世界范围内消费最广泛的物质之一，在常见的20种毒品危害中位居第五位，扭转酒精相关的损害是一个维护公众健康的迫切问题。对于腭的发育来说，常常由于各种因素而影响腭的正常发育过程，导致腭部发育异常，唇腭裂作为人类最常见的颌面部先天性畸形，其发育机制尚不完全清楚，目前普遍接受的观点认为唇腭裂发病是环境和遗传因素共同作用的结果。环境因素包括维生素缺乏，过量药物接触，父母生活习惯，父母职业及社会经济地位等。其中孕妇饮酒是常见的参与唇腭裂发病的环境因素。在颌面部发育过程中，细胞群体内细胞的迁移，诱导，增殖及凋亡的变化是错综复杂的。由于胚胎在发育，细胞群体在增大，细胞增殖处于主导地位，凋亡则处于辅助地位；具体到某一结构的形成，凋亡可能只在局部活跃。近年一些研究表明，腭突中嵴上皮（MEE）细胞和腭胚间充质（EPM）细胞的增殖和凋亡对于腭的正常发育具有重要的作用，与腭裂的形成密切相关，在此过程中不同的致畸物质干扰了与腭突发育有关的不同的生物化学，细胞学，形态学的诸多方面，最终导致腭裂。本实验研究不同浓度酒精暴露对小鼠腭突细胞增殖的影响。**方法和材料** 取胎龄13.5天的小鼠分离培养腭突细胞，采用CCK8法检测，收集对数期生长的第二代腭突细胞，以 $4 \times 10^7 / L$ 浓度接种于96孔细胞培养板，每孔200 μL ，待细胞贴壁后，加入含不同浓度酒精的培养基，酒精终浓度分别为50mmol / L、100mmol / L、200mmol / L、400mmol / L和800mmol / L，同时设不含酒精的培养基作为对照组，每组设5个复孔，酒精分别作用6h，12h，24h和48h，每孔按培养基和CCK8 10：1的比例加入110 μL ，2小时后用酶联免疫检测仪测定460nm波长吸光度值，实验重复3次，计算细胞增殖率，细胞增殖 $=100\% \times (OD_{实验} - OD_{本地}) / (OD_{对照} - OD_{本地})$ 。**结果：**与对照组比较，6h，12h低浓度（ $<200\text{mmol/l}$ ）时，细胞生存率随浓度的增加升高，24h，48h高浓度（ $>200\text{mmol/l}$ ）时，细胞生存率随浓度的升高而降低，200mmol/l为转折点。**结论：**随作用时间延长或浓度增加，酒精抑制小鼠腭突细胞的增殖。

关键词：小鼠腭突细胞；酒精；增殖

牙本质基质蛋白1 糖基化在骨折愈合中的作用

薛徽 陶狄珂 张瑞林 范琪琪 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心

目的: 骨折愈合是复杂而连续的过程, 骨折愈合过程主要为软骨内成骨, 软骨骨痂的形成成为成骨细胞的附着及细胞外基质的矿化提供良好的微环境。蛋白聚糖参与骨折愈合过程中软骨生成, 通过对骨折样品进行高通量测序发现牙本质基质蛋白1 (DMP1) 的蛋白聚糖形式的表达与骨折愈合密切相关。牙本质基质蛋白1 (DMP1) 是酸性的非胶原蛋白, DMP1水解后以DMP1-C端及DMP1-N端形式存在。DMP1-N端通过共价键链接一个糖胺聚糖链 (GAG), 形成DMP1糖基化形式, 即DMP1-PG。DMP1-PG在软骨及类骨质中高度表达。前期研究表明, DMP1-PG和软骨发育关系密切, 由于软骨骨痂生成是骨折愈合中必不可少的阶段, 因此我们推测DMP1-PG可能参与调控骨折愈合过程。本研究旨在探讨DMP1-PG在骨折愈合中的作用及其影响骨折愈合的机制。

方法: 小鼠体内丝氨酸⁸⁹位点为DMP1唯一的糖基化位点, 通过基因敲入技术, 将丝氨酸⁸⁹位点替换为甘氨酸, 干扰PG与DMP1-N端链接, 构建DMP1-PG点突变小鼠。野生型 (WT)小鼠与DMP1-PG点突变 (S89G-DMP1) 小鼠各60只, 建立股骨骨折模型, 术后1,2,3,4周收取样本, micro-CT分析与组织学切片染色观察骨折区损伤修复情况; 提取BMSCs成软骨及成骨向诱导分化; 另取术后三天骨痂样本进行RNA测序分析, 进一步探究DMP1-PG调控骨折愈合机制。

结果: Micro-CT 显示S89G-DMP1小鼠骨折愈合较差, 新形成的骨痂中编织骨体积较小, 并含有较多的孔隙; 同WT小鼠相比, 组织学染色可见S89G-DMP1小鼠软骨骨痂及骨性骨痂面积减少, 免疫组化染色见术后1周S89G-DMP1小鼠骨折区与软骨生成及蛋白聚糖合成相关标记物表达较WT小鼠明显降低; S89G-DMP1来源的BMSCs成软骨能力及成骨能力明显减弱; RNA测序显示骨折术后3天, S89G-DMP1小鼠骨折区IL-6/JAK/STAT信号通路明显下调。通过调节IL-6表达, 能够明显促进S89G-DMP1小鼠骨折愈合。

结论: DMP1-PG 在骨折愈合早期软骨生成过程中发挥重要作用, DMP1-PG通过影响IL-6/JAK/STAT信号通路调控骨折愈合过程中软骨生成。

在前成骨细胞中条件性敲除 I 型BMP受体ACVR1对 髌突软骨生长发育作用的研究

闫广兴¹ 史册 胡月¹ 郝新青¹ 刘苍维¹ 周怡君¹ 李道伟¹ 王爽爽² 孙宏晨^{1,2,*}

¹吉林大学口腔医学院病理科 ²中国医科大学口腔医学院

目的: 髌突软骨作为颞下颌关节的重要组成部分, 在下颌骨及关节的生长发育及功能行使中发挥着重要的作用。髌突软骨的形成有两个来源, 一部分来源于下颌骨的前成骨细胞/骨形成细胞 (preosteoblasts/skeletoblasts), 另一部分来源于间充质细胞分化成的软骨细胞。本研究的目的是明确在前成骨细胞中条件性敲除 I 型BMP受体ACVR1对髌突软骨生长发育的作用。

材料与方法: 通过Cre-*loxP*系统构建条件性基因敲除小鼠, 对照组为(*Acvr1* *fx/+*; *Osterix-Cre* (+)/(-); *RS/+*), 实验组为(*Acvr1* *fx/-*; *Osterix-Cre* (+)/(-); *RS/+*)。选取出生后0天、7天、14天、21、42天的雄性小鼠进行下颌骨的Micro-CT扫描、X-gal染色以及组织学观察。通过免疫组织化学 (IHC) 染色检测髌突软骨中软骨细胞分化标志物的分布和水平。

结果: Micro-CT结果显示cKO小鼠与对照组小鼠相比髌突软骨表层没有明显的缺陷, 但是cKO小鼠的下颌支与对照组小鼠长度相比短小。X-gal染色结果显示cKO小鼠在出生时髌突软骨只有来源于前成骨细胞/骨形成细胞 (preosteoblasts/skeletoblasts) 的肥大软骨细胞为阳性, 来源于髌突软骨的所有软骨细胞均为阴性, 随着时间的推移, 由软骨来源的软骨细胞逐渐增多, 阳性的肥大软骨细胞逐渐发生软骨内骨化, 阳性软骨的层数逐渐减少。组织学观察显示cKO小鼠靠近下颌骨的肥大软骨细胞形态和排列均异常, 且相比于对照组, 肥大软骨细胞层的厚度明显降低。免疫组化结果显示, cKO组小鼠中肥大软骨细胞中的X型胶原排列异常, 含量明显低于对照组。cKO组小鼠中的蛋白聚糖与对照组相比, 含量明显减少, 但是对照组和实验组中均能够正常生成X型胶原和蛋白聚糖。

结论: 在cKO小鼠髌突软骨中, ACVR1只在来源于前成骨细胞/骨形成细胞 (preosteoblasts/skeletoblasts) 的肥大软骨细胞中被敲除, 随着时间的推移, 这部分细胞逐渐骨化, 来源于软骨的软骨细胞增殖、肥大。并且ACVR1能够调控来源于前成骨细胞/骨形成细胞 (preosteoblasts/skeletoblasts) 的肥大软骨细胞。

lncRNA H19对根尖牙乳头干细胞牙/骨向化的影响

闫明, 李泽汉, 俞艳, 雷港, 金琳, 汪延秋, 庞希瑶, 于金华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学口腔医学院

【摘要】

目的 检测长链非编码RNA (long non-coding RNA, lncRNA) H19在根尖牙乳头干细胞 (stem cells from apical papilla, SCAPs) 牙/骨向分化过程中的表达变化, 探讨lncRNA H19对SCAPs分化的影响。

方法 分别在0天、3天、7天和14天对矿化诱导后的SCAPs进行实时定量PCR检测H19和DSPP、ALP、RUNX2、OCN、COL-1等矿化相关基因的表达情况。体外构建质粒, 转染得到稳定高表达H19的SCAPs。通过ALP活性检测, 茜素红染色, 以及实时定量PCR和Western blot检测牙/骨向分化相关基因蛋白的表达情况观察H19对SCAPs分化的影响。

结果 实时定量PCR对矿化诱导0、3、7、14天SCAPs的H19、DSPP、ALP、RUNX2、OCN、COL-1等基因的表达检测显示, 随着时间的推移, 所有基因的表达均逐渐升高 ($P < 0.01$)。将稳定高表达H19的SCAPs与对照SCAPs比较发现, ALP活性明显增强 ($P < 0.01$), 茜素红染色也可见较多矿化结节。DSPP、RUNX2、OCN、COL-1等基因的表达显著升高 ($P < 0.01$), 相应蛋白的表达情况与基因一致。

结论 lncRNA H19参与了SCAPs牙/骨向分化的过程, 高表达H19可促进SCAPs的牙/骨向分化。

【关键词】 lncRNA H19, SCAPs, 牙/骨向分化

液态浓缩生长因子 (LPCGF) 应用于牙周病患牙

根面生物改性的基础研究

颜文城 詹璇

福建医科大学口腔医学院研究中心 (福建省口腔生物材料工程研究中心/福建省高校重

液态富自体浓缩生长因子(Liquid Phase Concentrated Growth Factors,LPCGF)是第三代血小板浓缩物,其通过不间断差速离心自体静脉血制备而成。LPCGF中含有多种生长因子,已有研究证实其对牙周膜干细胞的增殖及矿化具有促进作用。

目的:

在前期研究和前人研究的基础上,进一步从体内外研究液态浓缩生长因子(LPCGF)和EDTA联合应用时,对根面牙骨质表面的影响和对牙骨质上的人牙周膜细胞(hPDLCS)粘附,增殖,迁移,分化,影响,以此寻找液态浓缩生长因子应用于牙周组织再生的有力依据,进一步阐明LPCGF作为根面处理剂促进牙周组织再生的机制,为将LPCGF应用于临床奠定理论基础。

方法:

(1) 材料研究

收集离体牙,预备成统一的牙骨质快,分4组:阴性组(生理盐水),EDTA组,LPCGF组,EDTA联合LPCGF组。

(2) 体外细胞研究

- 1) 收集正畸离体牙进行牙周膜干细胞的培养传代,冻存。波形蛋白、角蛋白细胞免疫组化对牙周膜来源进行鉴定。细胞成骨诱导,碱性磷酸酶染色、茜素红染色,观察细胞分化潜力。
- 2) 采集LPCGF,对比观察凝胶态CGF和液态CGF的区别,吉姆萨染色,倒置光学显微镜观察LPCGF的形态。
- 3) 不同分组牙骨质片种上牙周膜细胞,CCK-8法检测对比细胞粘附、增殖情况;电镜观察牙骨质片上生长的牙周膜细胞形态;成骨矿化诱导观察不同处理组牙骨质片上碱性磷酸酶、茜素红染色情况(定性);利用Transwell模型,观测不同分组牙周膜细胞的迁移能力;不同处理牙骨质片上细胞矿化诱导,提取RNA,Rt-PCR检测Col-I、OPN、OCN、CP23、BSP等成骨基因的表达。

5统计学分析采用SPSS13.0统计软件对实验数据作单因素方差分析,用SNK法和Dunnett's T3法做两两比较,实验数据为均数±标准差, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

结果:

- 1, 通过酶消化法进行PDLCS原代培养,镜下观察细胞形态大体呈梭形,胞体丰满,包浆丰富,核仁圆形或椭圆形,位于细胞中央。波形蛋白检测呈现阳性,碱性蛋白检测呈现阴性。
- 2, 观察发现液态生长因子区别于凝胶,在低温下呈现液态,在室温下逐渐形成凝胶状,镜下观察呈现网状。
- 3, LPCGF处理过的牙本质片有利于牙周膜细胞的粘附,增殖,迁移和分化。

结论:

- 1, 通过酶消化法培养PDLCS,细胞形态学表现,细胞表面抗原及细胞分化能力鉴定结果均符合人牙周干细胞生物学特性。
- 2, 一定浓度范围内的LPCGF对于HDPSCs的PDLCS增殖及分化可起到促进作用, 将深化牙周组织再生的认识, 并可能为“根面处理、根面生物改性”开拓治疗新思路和为将来LPCGF在牙周病的治疗提供理论依据。

SFRP2对脂肪干细胞成骨分化的作用研究

杨昊清, 范志朋

首都医科大学附属北京口腔医院研究所

[摘要]

目的: 研究分泌型卷曲相关蛋白2 (SFRP2) 对脂肪干细胞 (ADSC) 成骨分化的影响。

方法: 利用重组慢病毒载体的SFRP2 shRNA基因敲除ADSC中SFRP2进行丧失性功能研究; 利用HA-SFRP2逆转录病毒载体过表达SFRP2进行获得性功能研究; 定量RT-PCR和Western Blot检测基因表达; 碱性磷酸酶活性 (ALP) 测定、茜素红染色、钙离子定量以及定量RT-PCR检测脂肪干细胞的体外成骨分化能力。

结果: 定量RT-PCR和Western Blot显示SFRP2sh可以在ADSC中有效的抑制SFRP2的表达; ALP、茜素红和钙离子定量结果显示敲除SFRP2能明显抑制ADSC体外成骨分化能力; 定量RT-PCR结果显示敲除SFRP2抑制骨涎蛋白 (BSP)、Osterix (Osx) 和Runt相关转录因子2 (RUNX2) 的表达; 定量RT-PCR和Western Blot显示HA-SFRP2可以在ADSC中有效的过表达; ALP、茜素红和钙离子定量结果显示过表达SFRP2能明显促进ADSC体外成骨分化能力; 定量RT-PCR显示过表达SFRP2明显促进BSP的表达。

结论: SFRP2促进脂肪干细胞的体外成骨分化功能。

[关键词] 脂肪干细胞; 分泌型卷曲相关蛋白2; 成骨分化

Hyalinizing Clear Cell Carcinoma of salivary gland origin in head and neck: Clinical and Histopathologic Analysis

Xi-Hu Yang¹, Liu Liu², Yuan-Yuan Shi³, Yong-Jie Hu², Qin-Gang Hu¹, Ping Zhang⁴
1.Stomatological hospital, Medical School of Nanjing University;;2.Department of
Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong
University School of Medicine;3.Department of pathology, Affiliated Hospital of
Jiangsu University;4.Boston University Henry M. Goldman School of Dental
Medicine, Boston, MA, 02125, USA

ABSTRACT:

BACKGROUND: Hyalinizing clear cell carcinoma (HCCC) is an extremely rare neoplasm of salivary gland origin with a low-grade indolent characteristic. It is difficult to distinguish with other salivary gland malignant tumors, and it is said that had good clinical outcomes after operation, the aim of the research is to further reveal the features of HCCC. **METHODS:** We report 14 new cases of HCCC. The clinical and histopathologic data of the disease obtained from earlier literature and fourteen original cases were analyzed. Overall, 155 cases were systematically reviewed up to the year of 2016. Data was extracted, including demographics, histopathologic findings, clinical presentation, primary treatment, and outcomes. We also compare current series' data with the earlier published literature. **RESULTS:** 155 cases were recruited for our analysis. Histologically, tumor cells of HCCC having clear cell morphology with hyalinized stroma. Immunohistochemical results revealed that the cancer is positive for cytokeratin and epithelial membrane antigen, negative for smooth muscle actin (SMA), S-100, Vimentin, and Calponin. Local lode metastases' was 17.3% (14/81) and the overall recurrence rate was 17.7% (23/130), compare with 35.7% (5/14) and 21.4% (3/14) respectively in our files. We also find focal necrosis and local metastasis may be associated with recurrence. The overall prognosis was good,

only 3.8% of patients (4/105) reported dying with disease. **CONCLUSIONS:** HCCC is less indolent than was believed previously, but, has an overall good prognosis; risk factors for recurrence may be including focal necrosis and local metastasis at presentation. The best treatment is wide local excision combine with regional lymph node dissection for patients with HCCC.

Key Words: head and neck; Hyalinizing clear cell carcinoma; Oral cancer; Prognosis;

尼古丁对小鼠腭突细胞自噬水平的影响

姚亚霞¹ 杜娟^{1*}

首都医科大学附属北京口腔医院

【摘要】：目的先天性唇腭裂(CLP)是一种常见的先天性畸形，大量的流行病学及遗传学研究均显示CLP是遗传因素和环境因素相互作用的多基因遗传病,部分研究显示孕期吸烟与CLP之间存在相关关系,但其如何作用导致唇腭裂的机制仍不清楚。自噬在真核细胞中广泛存在,其通路可将细胞内衰老损伤的蛋白质和细胞器等细胞成分运送至溶酶体进行降解、清除并循环利用降解后的营养物质，已有研究证实外界刺激诱导唇腭裂的发生与自噬异常相关。本研究通过探讨尼古丁对小鼠腭突细胞自噬水平的影响，推测尼古丁与自噬间的相互关系对腭裂发生的影响。**方法和材料**取胎龄13.5天的小鼠分离培养腭突细胞，1.采用CCK-8方法观察雷帕霉素不同浓度（0，5，10，200nM），不同时间（6，12，24h）作用下对细胞增殖的影响。2.采用CCK-8方法观察氯喹不同浓度（0，15，25，30uM），不同时间（6，12，24h）作用下对细胞增殖的影响。3.分组：A空白对照组，B氯喹组，C雷帕霉素组，通过Western blot法检测不同时间（6,24h）自噬标志性微管相关蛋白轻链3 II（LC3 II）和多聚泛素结合蛋白（p62/SQSTM1）表达水平的变化。4.随机分组：A组空白对照组，B组尼古丁组，C组雷帕霉素组，D组氯喹组，E组尼古丁+雷帕霉素组，F组尼古丁+雷帕霉素组，通过Western blot法检测尼古丁不同浓度（ 1×10^{-7} ， 1×10^{-6} ， 1×10^{-5} ， 1×10^{-4} mol/l）和不同时间（3,6,12,24h）作用后，小鼠腭突细胞中LC3 II和p62/SQSTM1表达水平的变化，以确定尼古丁的最佳刺

激时间及浓度。**结果**CCK8结果分析提示,雷帕霉素作用下,随着作用时间的延长,作用浓度的增加,细胞增殖数量较对照组多。氯喹作用下,对小鼠腭突细胞的抑制呈浓度依赖性。Western blot结果分析显示,雷帕霉素组LC3II表达高于对照组,p62/SQSTM1低于对照组,氯喹组LC3II表达高于对照组,p62/SQSTM1高于对照组,说明雷帕霉素促进自噬,而氯喹抑制自噬。尼古丁作用浓度 10^{-6} mol/l,时间为6h时,LC3II表达明显高于对照组,p62/SQSTM1表达明显低于对照组。**结论**尼古丁能够上调小鼠腭突细胞的自噬水平,为进一步研究细胞自噬与孕期吸烟相关性先天性唇腭裂的发生提供了线索。

关键词: 小鼠腭突细胞; CLP; 尼古丁; 自噬

骨髓基质细胞抗原2在原发性舍格伦综合征中的表达

叶蕾 陈婵 郑凌艳

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔外科

目的: 本课题拟通过研究骨髓基质细胞抗原2在原发性舍格伦综合征(primary Sjögren's syndrome, pSS)患者唇腺及外周血淋巴细胞中的表达情况,探究BST-2对淋巴细胞增殖的作用,以期原发性舍格伦综合征的发病机制研究及药物治疗靶点的开发提供理论基础。

方法: 应用Realtime-PCR技术检测30例pSS患者及30例对照患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)和唇腺组织中BST-2的表达水平,并与临床指标进行相关性分析。采用免疫组织化学的方法对唇腺组织中的BST-2进行定位及半定量分析。通过分选外周血中的淋巴细胞,Realtime-PCR明确BST-2异常表达的淋巴细胞亚群,唇腺免疫组织化学连续切片染色验证。慢病毒转染人B淋巴细胞系以过表达BST-2,CCK8检测BST-2对细胞增殖活性的影响,流式细胞术分析其对细胞凋亡的影响。结果:与正常对照患者相比,pSS患者唇腺组织中BST-2表达升高,阳性细胞主要是浸润腺体的B淋巴细胞。同时,pSS患者CD19⁺B细胞及CD4⁻CD8⁻CD19⁻细胞中BST-2与对照组相比表达升高。过表达B细胞中BST-2可以促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。

结论: 研究发现BST-2在不同发育阶段的B细胞中存在差异表达, 并且BST-2可以促进小鼠前体B细胞系生长, 提示BST-2可能参与调控B淋巴细胞增殖。BST-2通过激活NF- κ B信号通路, 可以上调下游的抗凋亡基因表达, 并进一步抑制细胞凋亡。据此通过慢病毒载体成功构建了BST-2过表达B细胞系, 并证实了BST-2选择性高表达能抑制B淋巴细胞凋亡, 促进B淋巴细胞增殖。BST-2通过调控B细胞增殖和凋亡, 参与pSS的进程。以上实验结果表明BST-2在pSS患者外周血及唇腺组织中表达升高, BST-2主要定位在B淋巴细胞, 通过促进B细胞增殖调控疾病进程。推测BST-2通过促进B细胞在腺体中的增殖和浸润, 从而参与pSS的发生发展。所以BST-2可能是一种新的pSS疾病活动性指标, 是临床诊断及治疗的潜在靶蛋白。

关键词: 舍格伦综合征, BST-2, B细胞, CD19, 唇腺

MMP-9抑制剂对口腔鳞癌细胞增殖和侵袭能力的影响

尹盼盼 宿颖 陈素红 付洁 张辛燕

首都医科大学附属北京口腔医院

口腔癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一, 其发病因素多种多样, 发病率高, 并容易形成区域性淋巴结转移和远处转移, 预后较差。据IARC (International Agency for Research on Cancer) 统计显示, 口腔癌占全身恶性肿瘤的2.1%^[1]。近年来, 虽然在口腔癌的诊断和治疗方面已取得很大进展, 但是口腔癌患者的五年生存率仍仅有50%左右^[2], 因此寻找治疗口腔癌的精确靶点至关重要。侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特点之一, 也是恶性肿瘤难以治愈和高死亡率的关键因素。随着抗肿瘤侵袭和转移研究的深入, 发现基质金属蛋白酶MMP-9 (Matrix metalloproteinase9, MMP-9) 对细胞外基质 (Extracellularmatrix, ECM)和基膜的降解破坏作用在肿瘤的侵袭、转移中起到了关键性的作用^[3]。MMP-9由7个部分构成, 是MMPs中分子量最大的酶, 人类MMP-9基因含有13个外显子和9个内含子, 包含48个特有的核苷酸序列。Batimastat又称BB-94, 分子式为C₂₃H₃₁N₃O₄S₂, 分子量477.65, 为白色粉末状, 微溶于水, 是英国牛津生物技术药品公司研制的一种人工合成基质金属蛋白酶抑制剂。BB-94能与活性或酶原形式的MMPs的Zn²⁺结合区域结合抑制酶的活性, 从而调节MMPs在机体中的作用。本实验应

用BB-94抑制MMP-9的表达，进而观察口腔癌细胞生物学行为的改变。

目的 观察MMP-9抑制剂对人口腔鳞癌细胞系CAL27增殖和侵袭能力的影响。**方法** 选取人口腔鳞癌细胞系CAL27进行培养，用不同浓度的MMP-9抑制剂BB-94处理对数期CAL27细胞，通过RT-PCR检测BB-94在基因水平上对MMP-9的抑制效果；通过细胞免疫化学实验检测BB-94在蛋白水平上对MMP-9的抑制效果；通过MTT实验检测MMP-9抑制剂BB-94对人口腔鳞癌细胞增殖能力的影响；划痕实验检测抑制MMP-9的表达对人口腔鳞癌细胞迁移能力的影响；Transwell实验检测MMP-9抑制剂BB-94对人口腔鳞癌细胞侵袭能力的影响。**结果** MMP-9抑制剂能有效抑制人口腔鳞癌细胞CAL27的增殖、迁移和侵袭能力。**结论** 抑制MMP-9的表达可以抑制人口腔鳞癌细胞CAL27的增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为能力。

根尖牙乳头干细胞的分离培养及分化为肌腱细胞系潜能的研究

游婷婷^{1,2} 林敏魁^{1,2*}

1、福建医科大学口腔医学院

2、福建省口腔生物材料工程技术研究中心

目的:

分离、培养、鉴定人根尖牙乳头干细胞 (stem cell from apical papilla, SCAP) , 探索其自我更新、多向分化 (尤其是分化肌腱细胞系) 潜能, 为SCAP的进一步应用研究奠定基础。

材料与方法:

取根尖未发育完成的健康阻生第三磨牙或因正畸需要而拔除的前磨牙, 采用酶消化培养法分离培养人根尖牙乳头干细胞, 观察、记录细胞形态和生长特性; 测定细胞增殖能力; 流式细胞术鉴定干细胞表面标志分子 (包括STRO-1、CD146、CD34、CD45、CD90、CD105) ; 进行平板克隆集落形成实验; 体外进行成骨、成软骨诱导分化及鉴定; 细胞免疫组化鉴定角蛋白和波形丝蛋白表达; 采用RT-PCR检测SCAP的肌腱/韧带相关基因的表达情况。

结果:

2018全国口腔生物医学学术年会

CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

1、原代培养的人根尖牙乳头干细胞呈纺锤形或梭形，细胞大小和形态类似，近似成纤维细胞。SCAP能形成克隆集落细胞团，光镜下显示细胞呈集落状生长。细胞生长曲线测定结果显示：SCAP于第三天进入对数生长期，约第七天进入平台期，生长曲线呈S形。

2、流式细胞鉴定术结果显示：SCAP阳性表达间充质干细胞表面标记分子STRO-1、CD146、CD90、CD34、CD105，阴性表达造血干细胞表面标记分子CD45。

3、矿化诱导液体外诱导，SCAP复层生长，形成肉眼可见结节，随着诱导培养时间的增加，矿化结节增多。茜素红染色后呈红褐色钙结节，Von Kossa染色后则呈黑褐色。成软骨诱导液体外培养SCAP细胞团，细胞团贴壁生长，三周后阿尔新蓝染色，可见细胞团被染成蓝色。

4、细胞免疫组化染色结果显示：波形丝蛋白阳性表达，而角蛋白阴性表达。

5、RT-PCR检测SCAP肌腱/韧带和胚胎干细胞相关基因表达情况，以人的牙周膜干细胞作为阳性对照。发现SCAP表达更高水平的SCX、Six1、Six2、Nanog、EYA2，而Col-I、Col-III、C-myc、Tnc的表达水平两者相近。

结论：

采用酶消化法，能够成功从人根尖牙乳头组织中稳定分离培养出根尖牙乳头干细胞。经鉴定，人根尖牙乳头干细胞在体外具有增殖能力、多向分化潜能、表达干细胞表面标记分子。SCAP 表达Six1、Six2、Col-I、Col-III等肌腱/韧带基因。

粪肠球菌 - 白色念珠菌相互作用在难治性根尖周炎发展中的作用研究

袁莎莎, 何金枝, 徐欣, 周学东

1 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心

2 四川大学华西口腔医院牙体牙髓病科

目的: 经过反复多次常规根管治疗，根尖周病变仍迁延不愈的病例称为难治性根尖周炎，表现为复发性根尖周脓肿和进行性骨质破坏，是牙髓病临床治疗的难点。目前，对难治性根尖周炎患牙根管内微生物的认识从强调粪肠球菌为绝对优势致病菌，转变为自生态

学角度出发研究粪肠球菌在内的多种微生物在生物膜中的共同作用。作为再感染根管中最常与粪肠球菌共检出的真核生物，白色念珠菌与粪肠球菌之间的相互作用尚未可知。本研究拟通过建立粪肠球菌-白色念珠菌双菌种生物膜，采用微生物学及动物实验，深入研究两种微生物的相互作用及其在难治性根尖周炎发生发展中的作用，旨在为攻克这一临床难点课题提供新思路。

材料与方法：白色念珠菌SC5314与粪肠球菌ATCC19433单独及共培养，建立单菌种生物膜及白色念珠菌-粪肠球菌共培养生物膜。采用结晶紫染色、扫描电镜及共聚焦显微镜观察并测定生物膜总量及形态；通过原子力显微镜、CDC生物膜反应器及qRT-PCR测定生物膜粘附能力；通过体外模拟根管内碱性环境及使用次氯酸钠分别处理生物膜并观察生物膜耐药能力。建立大鼠根尖周再感染模型，通过micro-CT、组织学方法、qRT-PCR及ELISA检测实验牙根尖区骨质破坏面积、炎症状态及相应炎症因子表达量，比较双菌种再感染大鼠根尖周炎与单菌种再感染大鼠根尖周炎的病程进展差异。

结果：共培养条件下生物膜总量为粪肠球菌的 2.51 ± 0.22 倍($P < 0.001$)；扫描电镜及共聚焦显微镜显示共培养生物膜较单菌种生物膜更为致密，且共培养生物膜主要由粪肠球菌组成；白色念珠菌的存在使得粪肠球菌对牙本质的粘附力及抵抗剪切力能力大大增加，同时粪肠球菌粘附相关基因*gelE*、*esp*表达上调；相比单菌种生物膜，双菌种生物膜耐药能力也更为显著。而在大鼠疾病模型中，相比单菌种感染对照组，双菌种共感染大鼠根尖骨质破坏面积明显增加，同时根尖周出现明显炎症，炎性细胞浸润增多，肿瘤坏死因子TNF- α 及白介素IL-6表达量增加。

结论：白色念珠菌与粪肠球菌的相互作用可以促进难治性根尖周炎疾病的发生发展，其具体机制仍在研究中。

牙髓干细胞和牙囊细胞成骨能力的比较

詹天乐

上海第九人民医院

[摘要] 目的：探讨牙髓干细胞和牙囊细胞的成骨能力，比较其成骨能力。

材料与方法：组织块贴壁法培养牙髓干细胞，酶消化法结合组织块贴壁法培养牙囊细胞并鉴定。选取P2牙髓干细胞和P2牙囊细胞，对二者进行比较。培养牙髓干细胞和牙囊细胞，于1、3、5、7、9天利用MTT法检测吸光度，比较两种细胞的增殖能力。分别培

养诱导牙髓干细胞、牙囊细胞成骨分化，分别对成骨诱导1、3、7天的牙髓干细胞和牙囊细胞进行ALP染色并定量检测ALP活性，检测成骨诱导1、3、7天的牙髓干细胞和牙囊细胞Osterix、OCN、OPN表达；对成骨诱导后7、14、21天的牙髓干细胞和牙囊细胞分别进行茜素红S染色，镜下观察钙结节数量，10%氯化十六烷基吡啶析出钙离子，562nm下检测吸光度。将GFP标记的牙髓干细胞、牙囊细胞饲养于Matigel，体外成骨诱导7天后植入裸鼠皮下，比较其异位成骨能力。

结果：牙囊细胞1天起进入对数生长期，7天到达平台期，而牙髓干细胞3天起进入对数生长期，9天仍未达到平台期。对牙髓干细胞和牙囊细胞进行ALP染色和茜素红S染色，镜下观察、拍照。检测牙髓干细胞和牙囊细胞ALP活性，两种细胞诱导后1、3、7天ALP活性递增，而牙囊细胞的ALP活性均高于牙髓干细胞，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。成骨诱导后牙囊细胞Osterix、OCN、OPN mRNA的表达均高于牙髓干细胞，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。对牙髓干细胞和牙囊细胞进行茜素红S染色后，两种细胞诱导后1、3、7天钙结节数量递增，且诱导后牙囊细胞钙结节数量、钙离子析出后吸光度均高于牙髓干细胞。而将牙髓干细胞、牙囊细胞饲养于Matigel，体外成骨诱导7天后埋植于裸鼠皮下4周，4周内两种细胞均存活。根据荧光标记结果，埋植两种细胞的裸鼠皮下均有新骨形成，且整个观察期内矿化速度的差异无统计学意义（ $P<0.05$ ）。

结论：本研究显示，两种细胞均有较强成骨诱导能力，牙囊细胞略优于牙髓干细胞。

【关键词】 牙髓干细胞；牙囊细胞；骨组织工程

MEG3基因遗传变异与口腔鳞癌易感性的关联研究

张波 侯韵雯 于洋 苗利民 朱龙彪 袁华

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室

摘要：

目的：长链非编码RNA (lncRNA) MEG3在多种类型的人类癌症中起重要作用。lncRNA中的单核苷酸多态性 (SNP) 可能影响这些基因的表达或功能，从而改变患癌风险。本文探讨MEG3中的SNP是否可能影响罹患口腔鳞癌的风险。

材料：采用病例对照研究设计，包含444名口腔鳞癌患者和984名健康对照者，探讨

MEG3中功能性SNP与罹患口腔鳞癌风险之间的关联，并进行相关的功能学研究。

结果：研究发现功能性SNP rs11160608与口腔鳞癌发病风险显著相关 ($P = 0.02$)。此外，分层分析显示rs11160608 AA基因型与饮酒者口腔鳞癌风险显著增加相关 ($P = 0.011$)。荧光素酶报告基因实验也表明rs11160608的C等位基因与风险等位基因A相比可显著改变转录活性。

结论：本研究证明功能性SNP rs11160608可以影响相关基因的转录，并可能影响口腔鳞癌的发病倾向。

脂多糖促进牙周膜间充质干细胞组蛋白去甲基化酶HR表达的研究

张琛，姚睿，范志朋

首都医科大学附属北京口腔医院研究所

摘要：

目的 脂多糖是否对牙周膜间充质干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 中组蛋白去甲基化酶相关基因表达存在调控功能。**方法** 利用不同剂量的脂多糖对牙周膜干细胞进行刺激处理；在mRNA水平利用qRT-PCR (Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 实时定量RT-PCR)检测组蛋白去甲基化酶相关基因的表达。qRT-PCR结果显示HR(hairless homolog)基因在脂多糖刺激后24h和48h结果显示，能促进HR的表达，其表达升高的水平与脂多糖刺激时间有相关性。1、5和10 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖在作用48h后都能促进HR的表达，其表达升高的水平与脂多糖刺激剂量有相关性。10 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖抑制牙周膜干细胞体外矿化能力。**结论** 在牙周膜干细胞中脂多糖对牙周膜干细胞组蛋白去甲基化酶HR的表达有促进作用。

关键词：脂多糖；组蛋白去甲基化酶；牙周膜干细胞；Hairless；骨向分化

bFGF-A83-01联合预处理对牙周膜干细胞体外扩增的影响

张春澍, 杨丕山

1 山东大学口腔医学院2 山东省口腔医院

目的: 慢性牙周炎是一种以牙槽骨吸收, 牙周袋形成, 牙齿松动为主要表现的慢性进行性炎症, 也是目前造成人类牙齿缺失的首要原因。慢性牙周炎最理想的治疗效果是获得功能性牙周组织的再生, 然而由于局部因素, 这种修复方式往往难以实现。目前, 人们聚焦于组织工程中的干细胞治疗技术, 力求通过移植干细胞到骨缺损处, 依靠其自我更新及多向分化的能力实现牙周组织的再生。现有研究表明: 牙周膜干细胞 (PDLSCs) 因其可在体内实验中分化为骨组织、牙骨质及功能性的牙周纤维而被认为是牙周组织再生工程的最佳种子细胞来源。然而, PDLSCs因在体外培养的多次传代中会发生衰老、凋亡及干性丢失等而无法获得充足的状态良好的细胞。本研究旨在通过联合使用促进细胞增殖的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 及TGF- β 的抑制剂 (A83-01) 对体外培养的PDLSCs进行预处理以验证是否可在体外培养中获得足够量的干细胞并维持其多向分化能力。

材料与方法: 1.组织块法获得原代细胞, 通过有限稀释法获得的纯化牙周膜干细胞并传代培养, 实验所用细胞均为P3代。CCK8法检验不同浓度A83-01对PDLSCs是否有促进增殖的作用并确定最佳浓度。

2.PDLSCs分为bFGF, A83-01, bFGF+A83-01预处理组及对照组, CCK8法检测P4代细胞增殖活性。流式细胞术检测四组凋亡率, RT-PCR检测干性基因 (c-myc及Nanog) 表达。

3.成骨诱导3, 7, 14天, Western blot及RT-PCR分别检测ALP、RUNX2及OPN蛋白和基因表达量。成骨诱导7天后, 检测ALP活性。成骨诱导28天后, 茜素红染色检比较钙结节的形成。4.Elisa实验检测上清液中IL-6, VEGF及TGF- β 的表达。

结果: bFGF和A83-01联合预处理后, 细胞增殖活性较其余三组明显增高, 凋亡率降低且干性基因的表达也明显增强。预处理组成骨相关蛋白及基因在成骨诱导早期均较对照组降低而在后期升高且钙结节的数量也叫对照组增多, 然而ALP活性四组无显著差别。除TGF- β 外, IL-6及VEGF含量均较其余三组高。

结论: A83-01和bFGF联合预处理可有效用于牙周膜干细胞体外扩增。

基于氧化应激微环境调控机制的

GO@ Fe₃O₄诱导牙周骨组织再生研究

Induction of periodontal bone tissue regeneration by GO@Fe₃O₄ based on oxidative stress microenvironment regulation mechanism

张贺 马兰 苗雷英*
南京大学医学院

研究目的: 一步法合成GO@Fe₃O₄磁性纳米微粒, 借助其模拟酶特性, 试图调控牙周炎局部氧化应激微环境, 维持活性氧稳态, 借此控制炎症环境。在不损伤细胞的情况下, 提供适合干细胞骨向分化的友好微环境, 并借助材料的磁响应能力, 为牙周炎局部骨组织再生提供健康诱导条件, 实现牙周区域骨缺损的修复。

材料与方法: 本实验利用一步法化学合成GO@Fe₃O₄复合纳米微粒, 利用透射电子显微镜、红外光谱、X射线衍生物等手段表征其结构, 分析理化性质, 在此基础上, 利用CCK-8检测试剂盒、活细胞染色、流式细胞检测等手段, 分析材料的生物安全性。模拟牙周炎局部区域的高氧化应激环境, 利用LPS刺激大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs), 通过活性氧检测试剂盒、免疫荧光染色等技术, 评估氧化应激模型的建立, 随后分析复合纳米材料GO@Fe₃O₄对于高活性氧生物环境的调控能力, 分析在炎症环境下, 材料对细胞的保护作用。体外培养大鼠骨髓间充质干细胞, 对照LPS刺激组, 评估不同剂量的GO@Fe₃O₄纳米材料对细胞的保护作用, 附加静磁场刺激, 通过RT-PCR、Western Blot、碱性磷酸酶染色、茜素红染色等分析技术, 探究在磁场作用下, 微粒对于MSC细胞成骨分化的诱导作用。

结果: 透射电子显微镜、红外光谱、X射线衍射等结果分析表明, 成功制备了具有超顺磁性的GO@Fe₃O₄复合纳米微粒(图1.2.3.), CCK-8试剂盒定量分析及磁滞曲线结果证明, 在材料浓度不超过50μg/ml情况下, 材料不影响细胞的增殖, 复合材料其既保留了GO良好的生物安全性, 又可以携带Fe₃O₄的磁响应能力。活性氧检测试剂盒及免疫荧光分析结果表明, 复合纳米材料GO@Fe₃O₄对活性氧具有微调作用: 当细胞环境中活性氧升高时, 复合材料有效降低活性氧含量, 当活性氧为正常水平时, 该材料不会过分调控局部氧环境, 并且这种氧化应激调控能力与剂量正相关。RT-PCR, Western Blot、茜素红染色等结果显示, 在静磁场作用下, 复合纳米材料GO@ Fe₃O₄具有促进细胞粘附, 诱导细胞骨向分化的能力, 材料对于磁场的响应可以有效促进骨髓间充质干细胞骨向分化。

结论: 磁性纳米GO@ Fe₃O₄既保留了GO良好的生物安全性, 有具有磁响应能力, 其突出氧化应激调控能力可以为牙周炎局部提供平衡的活性氧环境, 减少过多活性氧的产生, 进一步控制炎症发展。借助静磁场作用, 材料发挥磁响应能力, 可以协同诱导大

鼠间充质干细胞骨向分化。

兔骨髓基质干细胞在三维海藻酸钠壳聚糖复合凝胶支架

材料中黏附生长与成骨活性初步观察

张林朴, 姚晖, 代晓华, 王冠华, 李燕妮, 张洪杰, 连小丽
南开大学附属口腔医院 天津市口腔医院中心实验室

摘要:

目的:制备三维天然高分子生物材料海藻酸钠壳聚糖复合凝胶支架,观察实验兔骨髓基质干细胞在支架材料中的黏附生长与成骨活性表达。**材料与方法:**去离子水溶解海藻酸钠隔夜放置形成3%w/v的海藻酸钠水溶液。以0.1mol/L的NaOH缓慢中和3%w/v的壳聚糖醋酸溶液,得到壳聚糖细颗粒絮状溶胶沉淀,沉淀经清洗离心去除醋酸残余,然后将沉淀加入到海藻酸钠水溶液中,高频震荡混匀使两组分形成复合凝胶。倒置显微镜观察凝胶表面及内部折光变化。复合凝胶冻干后扫描电镜观察液氮冷冻淬断凝胶表面形貌,取部分冻干凝胶研成粉末分别以海藻酸钠和壳聚糖干粉为对照,采用溴化钾压片法进行傅立叶变换红外光谱(FTIR)对比分析。在24孔板放置均匀分切的约0.5-0.6cm³无菌条件制备的复合凝胶块,将兔骨髓基质干细胞(rBMSC)以2×10⁴/孔密度播种在凝胶块中,成骨诱导培养(10⁻⁷mol/L的地塞米松,50μg/L的VitC和10mmol/L的β-甘油磷酸)。观察细胞黏附生长并在第9、12天进行复合培养物von Kossa染色。**结果:**壳聚糖沉淀与海藻酸钠溶液震荡混匀后形成无色半透明的共聚凝胶,复合凝胶置于水溶液中保持稳定的完整性。在位相差倒置显微镜下可以看到纵横交错的条索样凝胶纤维网络。扫描电镜显示冻干凝胶块淬断面中为10-20μm厚不均匀光滑膜片和纤维交织的网状结构,其间有大小不等的间隙。FTIR的峰值分析表明壳聚糖分子链上的氨基和乙酰胺基都与海藻酸钠分子链上的羧酸盐官能团产生静电相互作用。复合凝胶中播种rBMSC2小时后可见黏附轮廓清晰圆形细胞,第3天凝胶表面和内部有密集细胞群落,细胞形态梭型和多角形,von Kossa染色显示凝胶中有较多棕褐色斑点和斑块。**结论:**海藻酸钠壳聚糖复合凝胶支架材料复合凝胶中结合的rBMSCs在成骨诱导条件下表达了良好成骨活性。

聚乙二醇-聚乳酸-20(S)羟基胆固醇纳米胶束成骨性能的体外研究

张琪

北京天坛医院 . 口腔科

研究目的

研究载 20(S)-羟基胆固醇 mPEG-PLA 聚合物胶束 (20(S)-hydroxycholesterol loaded mPEG-PLA polymeric micelles, 20(S)-OXY-PM) 的制备工艺及该载药剂型的体外缓释效果; 探讨 20(S)-OXY-PM 体外诱导成骨的效果及其可能的机制, 为载 20(S)-羟基胆固醇 mPEG-PLA 纳米胶束在骨再生中的应用提供依据。

研究方法

1. 采用纳米沉淀法以两亲性嵌段聚合物 mPEG-PLA 为载体制备20(S)-OXY-PM。通过单因素实验确定出适合本实验研究的合成条件。采用动态光散射仪、透射电镜、高效液相色谱表征 20(S)-OXY-PM 物理特性, 检测其缓释能力。

2.以小鼠骨髓间充质干细胞系 M2-10B4 为细胞实验模型, 通过 MTS 细胞活力测定、碱性磷酸酶 (ALP) 染色及活性比色测定、倒置相差显微镜观察、茜素红染色、qRT-PCR、细胞免疫荧光、Western blot 等方法分别检测细胞增殖、ALP 活性、细胞分化形态、矿化沉积能力、成骨相关基因、蛋白表达的影响。通过使用 Hedgehog 信号通路抑制剂环巴胺, 采用 Western blot 检测 Gli1 表达, 以初探 20(S)-OXY-PM 对 Hedgehog 信号通路的影响。

结果

1.通过单因素实验确定适合本实验的合成条件为: 有机溶剂采用DMSO, 有机相与水混合转速为500rpm, 初始投药量为药物与载体质量比2:10。DLS 检测胶束粒子平均粒径为 58.94nm, 多分散系数 0.11, Zeta 电势 -9.95mV。TEM 观察载药胶束粒子近似球形。采用此方法合成的载药胶束载药量为 10.79%, 包封率为 60.46%, 体外缓释时间达 120 小时, 释放较缓慢。

2.MTS 检测结果显示空胶束对细胞增殖没有明显影响, 20(S)-OXY 会降低细胞增殖能力, 呈现出剂量依赖性。ALP 检测及茜素红染色结果显示相同浓度时, 20(S)-OXY-PM 组较 20(S)-OXY 组 ALP 活性、细胞的矿化能力提高, 且高浓度20(S)-OXY-PM 组效果最为明显。倒置相差显微镜记录结果可见, 相同浓度时, 间充质干细胞向成骨细胞形态转变 20(S)-OXY-PM 组较 20(S)-OXY 组明显, 药物浓度高细胞形态变化更大。高浓度 20(S)-OXY-PM 组和 20(S)-OXY 组明显上调成骨分化相关基因 Runx2、OSX、ALP、OCN 表达, 且 20(S)-OXY-PM 组上调更显著。免疫荧光及 Western blot 检测结果显示 20(S)-OXY-PM 组较 20(S)-OXY 组 OCN 分泌增多, 高浓度 20(S)-OXY-PM 组更明显。Western blot 检测 Gli1 表达发现 20(S)-OXY-PM 组高于 20(S)-OXY 组, 加入环巴胺会抑制两组上调 Gli1表达的效果。

结论

可采用纳米沉淀法制备 20(S)-OXY-PM, 此载药剂型可以明显的延长20(S)-OXY的释放时间。载20(S)-羟基胆固醇 mPEG-PLA 纳米胶束较单纯20(S)-羟基胆固醇有更好的诱导成骨分化效果, 其作用机制可能是载药胶束长期稳定的释放20(S)-羟基胆固醇, 并有助于药物与细胞膜Smo受体结合, 激活促成骨分化的Hedgehog信号通路。

关键词 20(S)-羟基胆固醇 胶束 缓释 成骨分化

长链非编码RNA Nron在牙齿移动骨改建过程中的作用研究

张瑞林, 蔡明详, 陶狄珂, 薛徽, 王晓刚*, 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的: 正畸治疗中, 牙周组织的改建引起牙齿的移动, 其中牙槽骨的改建主要依赖于破骨细胞和成骨细胞的功能活动。正畸牙移动过程中, 破骨细胞是压力侧发生骨吸收的主要功能细胞。破骨细胞的数量及功能是决定正畸牙齿移动效率的主要影响因素, 其分化受许多因素直接或间接的影响。长链非编码RNA (long non coding RNA ,lnc RNA) 是一种转录本超过200个核苷酸的非编码RNA, 不具有编码蛋白的能力。其主要位于细胞核或细胞质内, 与编码RNA主要区别为, lncRNA的物种间保守性更低, 有更强的组织特异性和时间空间表达特异性。其主要通过调控基因转录, 转录后调控以及表观遗传调控等方式, 在细胞分化, 组织发育, 以及多种疾病的发生发展等方面发挥精准调控的作用。NRON (ncRNA repressor of the nuclear factor of activated T cells) 是2005年被鉴定到可以抑制NFAT蛋白入核的长链非编码RNA分子。NRON相对保守, 在小鼠中存在其同源基因Nron。研究报道, NRON在内皮细胞生长和HIV-1病毒感染与复制过程中有重要作用, 同时前期研究发现Nron在小鼠BMMs (bone marrow mesenchymal stem) 破骨向分化过程中表达水平显著下调并且能够抑制体外破骨细胞的分化。本研究通过应用Nron转基因小鼠, 建立小鼠正畸加力模型, 探究 Nron是否参与正畸牙齿移动中骨改建的过程及其作用机制。

材料与方法: 采用6-8周雌性 Nron转基因小鼠与野生型 (WT) 小鼠, 分别建立正畸加力模型。于术后7,14天取上颌骨样本, Micro CT进行牙齿移动距离及周围牙槽骨

2018全国口腔生物医学学术年会

CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

骨量分析; 上颌牙槽骨切片行H&E染色观察牙槽骨吸收情况及牙周膜的形态; TRAP (抗酒石酸酸性磷酸酶) 染色, 观察正畸加力建模小鼠牙槽骨中破骨细胞的数量; 免疫组织化学染色, 对比正畸加力模型小鼠中破骨相关基因变化; RT-PCR定量检测在加力1, 3, 5, 7天破骨相关基因表达变化。同时检测过表达NronNfatc1核定位的影响

结果: 1)野生型小鼠加力后上颌骨中 Nron表达显著高于对照组。

2)野生型小鼠加力后在分别在1, 5, 7天,上颌骨中 Nron表达逐渐降低。破骨细胞相关的基因表达逐渐增加。

3)正畸加力后, Nron转基因小鼠上颌骨中破骨细胞相关基因表达显著低于WT小鼠。

4)在正畸加力模型中, Nron转基因小鼠牙移动距离显著小于 WT 小鼠。

结论: 本实验通过构建Nron转基因小鼠及WT小鼠正畸加力模型, 从分子生物学观察两种小鼠牙齿移动距离及牙槽骨改建状况, 证实在正畸牙齿移动过程中, Nron的表达量和颌骨骨吸收成反比, Nron参与骨重建。

过表达TAZ对口腔舌鳞癌细胞增殖迁移和侵袭的作用及其机制探究

张雅菲, 文勇

1.山东大学口腔医学院种植科, 山东大学.2.山东省口腔组织再生重点实验室

摘要

目的: 探究过表达Tafazzin (TAZ) 对口腔舌鳞癌CAL-27、SCC-15细胞增殖迁移侵袭的影响及其作用机制。

材料与方法:

CAL-27和SCC-15细胞购于美国ATCC公司; DMEM培养基、PBS购于美国Hyclone公司; 胎牛血清、基质胶、transwell小室购于美国Corning 公司; CCK-8试剂购于日本同仁公司; EdU染色试剂盒购于广州锐博生物公司; 4%多聚甲醛、结晶紫购于北京索莱宝公司; trizolRNA提取试剂购于美国invitrogen公司; 反转录、PCR试剂盒均购于大连宝生物工程有限公司; RIPA裂解液PMSF、Cocktail购于上海碧云天公司; SDS-PAGE凝胶制备试剂、ECL发光试剂盒均购于武汉博士德生物公司; PVDF膜购于美国Millipore公司; 慢病毒载体LV5-homo-TAZ(NM_000116.4), LV5-NC由上海吉

玛公司包装合成；RNA引物由上海铂尚公司合成；TAZ、Erk、p-Erk、Akt、p-Akt、E-Cadherin、Vimentin抗体均购于美国CST公司；抗GAPDH抗体购于武汉三鹰公司；二抗购于美国Affinity公司。

将细胞分为过表达TAZ组 (overexpression TAZ, OE TAZ) 和过表达对照组 (negative control, NC) 两组。成功建立过表达TAZ的慢病毒载体：LV5-homo-TAZ和过表达对照LV5-NC，并使其分别转染CAL-27、SCC-15细胞，实时荧光定量PCR(qRT-PCR及Western Blot检测过表达效率。之后，通过CCK-8实验检测两组细胞的增殖情况能力；通过划痕实验检测两组细胞的迁移能力；通过transwell实验检测两组细胞侵袭能力。利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测两组细胞TAZ mRNA表达情况；利用Western Blot检测两组细胞总Akt、p-Akt、总Erk、p-Erk、上皮相关蛋白E-Cadherin及间充质相关蛋白Vimentin等相关蛋白表达水平。

结果:

qRT-PCR和western blot结果显示，过表达TAZ病毒转染成功，过表达组TAZ的mRNA水平与TAZ蛋白水平高于对照组。过表达组较对照组增殖能力增强，CAL-27细胞过表达TAZ培养48h后，较对照组开始出现差异，并且随着时间的增加，差异越明显，具有统计学意义。SCC-15细胞过表达TAZ培养24h后，即出现明显变化，且随时间加强。过表达组较对照组迁移侵袭能力亦明显增强，其中对细胞迁徙能力的影响呈时间相关性。western blot结果显示，细胞过表达TAZ后，在总Akt不变的情况下，p-Akt蛋白量升高；在总Erk不变的情况下，p-Erk蛋白量也升高；上皮相关蛋白E-Cadherin表达量降低，间充质相关蛋白Vimentin表达量升高，上皮间充质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) 相关蛋白E-钙黏连蛋白 (E-Cadherin) 降低，波形蛋白 (Vimentin) 升高。

结论:

过表达TAZ可能通过影响p-Erk、p-Akt、E-Cadherin、Vimentin的表达促进口腔舌鳞癌CAL-27、SCC-15细胞的增殖迁移和侵袭。

在小鼠神经嵴来源的颅颌面间充质细胞中条件性敲除Bmp2导致

Pierre Robin sequence

陈艺璇, 张彦定

BMP信号在颅面部器官的发育过程中发挥着至关重要的作用，一些BMP家族成员突变导致人类某些综合征的发生，其中包括Pierre Robin sequence (PRS)。在本实验中，我们利用 *Wnt1-Cre*和*Bmp2^{fl/fl}*转基因小鼠，构建出在颅颌面神经嵴细胞来源的间充质细胞中条件性敲除*Bmp2*基因的*Wnt1-Cre;Bmp2^{fl/fl}*小鼠。*Wnt1-Cre;Bmp2^{fl/fl}*小鼠的颅面部骨骼严重发育不良，表现出典型的PRS症状，可见腭裂、舌头异常抬高以及下颌后缩以及头盖骨发育不良，与人类的PRS表型极为相似。研究证明，过高的舌头阻碍上腭板的正常上抬，是造成腭裂发生的直接原因。对舌头细胞的增殖和凋亡情况检测发现，突变小鼠舌头细胞增殖和凋亡情况与野生型小鼠相比为出现异常。这些实验结果说明，腭裂和舌头异常抬高两种表型都不是由于组织本身缺陷造成的，而是外力造成，属于次级损伤。进一步检测发现，由于下颌骨祖细胞增殖数量明显减少，成骨细胞分化能力显著降低，导致转基因小鼠下颌骨体积明显变小，下颌后缩，下颌骨冠状突缺失，并由此导致了舌头在发育过程找那个无法正常下沉，上腭板不能上台从而发生了腭裂。我们的研究阐明了由*Bmp2*突变引起的PRS的发病机制，突出了BMP2在颅面部发育中促进成骨的作用，并强调了在胚胎发育过程中，上腭板、舌头和下颌骨形态发生过程中精确协调对正常形态建成的重要性。*Wnt1-Cre;Bmp2^{fl/fl}*小鼠有效地模拟了PRS的发病过程，对进一步深入研究其中所涉及的分子机制有重要的意义。

新发现的EphB4-TNFR2信号通路在TNF- α 促成骨分化中的作用

张钰 杨丕山教授

山东大学口腔医学院

目的:

低剂量肿瘤坏死因子- α (TNF- α)可促进成骨分化,而肿瘤坏死因子受体2 (TNFR2)和EphB4均是成骨分化的相关受体。两者在TNF- α 促成骨分化中的相互作用未见报道。本研究首次发现, TNF- α 可通过直接与TNFR2结合和通过EphB4促进TNFR2表达两种机制促进间充质干细胞成骨细胞分化。

材料与方法:

1. 低浓度TNF- α 对MC3T3-E1细胞TNFR1、TNFR2表达的影响

MC3T3-E1细胞在含有TNF- α (0.5 ng/ml) 的基础培养基或成骨诱导液中培养, RT-PCR、Western blot检测TNFR1、TNFR2 mRNA和蛋白的表达。

2. TNF- α 调控MC3T3-E1细胞成骨分化的信号通路

(1) 慢病毒感染MC3T3-E1细胞, 建立TNFR2基因干扰的MC3T3-E1细胞模型, 在含有TNF- α (0.5ng/ml) 的成骨诱导液中培养。Western blot检测EphB4及细胞成骨相关因子Runx2和BSP蛋白表达水平, 碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂盒检测细胞ALP活性。

(2) 应用TNFR2/TNFRSF1B/CD120b中和抗体竞争结合MC3T3-E1细胞内TNFR2的作用位点后, 应用RT-PCR和Western blot检测TNF- α 对EphB4、Runx2、BSP mRNA和蛋白表达水平的影响。

(3) 应用EphB4抑制剂 (NVP-BHG712) 抑制MC3T3-E1细胞内ephrinB2-EphB4正向信号后, 应用RT-PCR和Western blot检测TNF- α 对TNFR2、Runx2、BSP mRNA和蛋白表达水平的影响。

3. TNF- α 与TNFR2和EphB4结合研究。

免疫共沉淀检测TNF- α 与TNFR2和EphB4的结合。

结果

1. 低浓度TNF- α 促进MC3T3-E1细胞TNFR2的表达

与对照组 (0 ng/ml TNF- α) 相比, 0.5 ng/ml TNF- α 处理24、48小时后, MC3T3-E1细胞内TNFR1 mRNA和蛋白表达无明显变化, TNFR2 mRNA和蛋白表达明显升高。

2. TNF- α 调控MC3T3-E1细胞成骨分化的信号通路

(1) 与阴性对照病毒感染组相比, 慢病毒感染MC3T3-E1的TNFR2 mRNA及蛋白表达均明显降低, 低浓度TNF- α 对TNFR2基因敲低的MC3T3-E1细胞Runx2、BSP蛋白表达的促进作用显著降低, 但对EphB4蛋白表达的促进作用不受影响。

(2) 与对照组 (0 ng/ml TNF- α) 相比, TNF- α 处理24、48小时后, MC3T3-E1细胞EphB4蛋白的表达升高。TNFR2/TNFRSF1B/CD120b中和抗体预处理后加入TNF- α , MC3T3-E1细胞内EphB4表达较单独应用TNF- α 处理组无显著差异。

(3) 与对照组 (0 ng/ml TNF- α) 相比, TNF- α 处理24、48小时后, MC3T3-E1细胞TNFR2蛋白的表达升高。NVP-BHG712预处理后加入TNF- α , MC3T3-E1细胞内TNFR2表达较单独应用TNF- α 处理组显著降低。

3. TNF- α 可与TNFR2和EphB4直接结合

用TNFR2抗体能检测到TNFR2,表明TNFR2和TNF- α 结合而共沉淀; 用EphB4抗体能检测到EphB4,表明EphB4和TNF- α 结合而共沉淀; 用IgG抗体沉淀细胞裂解物不能共免疫沉淀TNFR2和EphB4; 证明TNF- α 在细胞内能与EphB4和TNFR2特异性结合发挥作用。

结论:

1. 低浓度TNF- α 对MC3T3-E1细胞TNFR1的表达几乎无影响,对TNFR2的表达有明显促进作用。
2. 通过基因敲低或中和抗体干扰TNFR2后,低浓度TNF- α 对MC3T3-E1细胞成骨分化的促进作用减弱,而对EphB4的表达量无影响。然而,应用EphB4抑制剂后,低浓度TNF- α 对TNFR2及细胞成骨分化的促进作用均减弱。
3. TNF- α 可与TNFR2和EphB4直接结合。
4. 这些结果提示, TNF- α 可通过直接与TNFR2结合和通过EphB4促进TNFR2表达两种机制促进间充质干细胞成骨细胞分化。

蛇床子素对牙周炎正畸大鼠牙周组织中TNF- α 表达影响的研究

赵刚 郝芳卉

佳木斯大学口腔医学院

摘要: 目的: 探讨蛇床子素对牙周炎大鼠正畸牙移动过程中牙周组织的影响。方法: 选取 60 只成年雄性 SD 大鼠, 随机抽取 6 只作为空白对照组 (N 组), 其余 54 只建立牙周炎模型, 四周后随机选取 6 只为炎症对照组 (P₀ 组), 剩余 48 只全部建立大鼠正畸牙移动模型, 随机分为牙周病正畸组 (P₁ 组), 牙周病正畸给药组 (P₂ 组), 每组分为 3d、7d、14d、21d 四个亚组 (n=6)。P₁ 组以灌胃的方式给予蛇床子素, P₂ 组给予等体积生理盐水, 分别于 3d、7d、14d、21d 处死大鼠取上颌骨, 测量牙移动距离, 行 HE 染色及免疫组化分析。结果: P₁ 组各亚组均较 P₂ 组牙周组织破坏严重, P₂ 组 (除 3d 组外) 均较 P₁ 组牙移动距离小, 且 TNF- α 表达低。结论: 选取的蛇床子素能降低牙周炎大鼠正畸加力后牙周组织中 TNF- α 的表达, 并且有利于牙周炎大鼠稳定的正畸牙移动。

关键词: 蛇床子素; 牙周炎; 正畸; TNF- α ;

创伤性颞下颌关节周围异位骨化的病理发展过程

赵闫

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面科

目的: 异位骨化即指在肌肉, 肌腱, 韧带以及其他软组织中形成软骨或成熟的骨组织。对于颞下颌关节来说, 创伤是导致其周围形成异位骨组织的重要因素。当长期大量的异位骨性组织形成在颞下颌关节周围时, 将会引起颞下颌关节强直, 从而引发病人张口功能受限, 甚至是面部畸形。当前, 异位骨化引发的关节强直的治疗方式主要是手术治疗。然而对创伤引起的颞下颌关节周围异位骨组织的病理发展过程以及分子细胞等发病机制不甚了解, 所以本课题将通过建立创伤性颞下颌关节周围异位骨化动物模型的基础上, 对其进行病理发展过程的研究和探讨。为创伤引起的颞下颌关节周围异位骨组织形成的防治提供思路。

材料与方法

(1) 动物模型构建: 将背景为C57BL/J的小鼠腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉。创伤性颞下颌关节的构建主要设立在左侧, 右侧未进行手术的部位作为空白对照。左侧关节周围区域进行备皮之后, 用75%的酒精进行消毒, 而后沿着颞骨颞弓的走行方向将关节周围的皮肤剪开大约1cm的皮肤切口。在面神经颞支及面部血管上方, 颞骨颞弓下方剪开肌肉组织, 来暴露颞骨颞弓, 在其下方将关节囊摘除, 暴露髁突, 并用眼科剪将其上的部分髁突软骨剪除。创口用3-0缝线缝合关闭。

(2) Micro-CT拍摄: 将经过颞下颌关节异位骨化模型建立之后的小鼠分别取术后30天, 90天, 180天各3只, 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后进行Micro-CT的拍摄, 对拍摄后的左侧颞下颌关节及其周围的组织变化进行分析。

(3) 组织学分析: 分别取异位骨化模型建立后的第30天, 90天及180天的小鼠, 颈椎脱位法处死, 剪去颅骨之外的皮毛, 离断整个颅骨并将其浸入4%的多聚甲醛中固定3天, 之后放置于0.5M的EDTA中进行脱钙2-3周。制作4 μ m厚的石蜡切片, 分别对不同时期的小鼠颅骨组织进行蕃红O-固绿染色。

结果:

(1) Micro-CT显示: 创伤性颞下颌关节周围的异位骨量逐渐增加, 下颌骨的偏斜程度逐渐增加, 与周围组织的粘连程度逐渐增加;

(2) 蕃红O固绿染色组织学分析显示: 创伤性颞下颌关节周围的异位骨组织在一个月, 三个月, 六个月分别呈现浅灰色, 橙红色和蓝绿色。

结论: 创伤性颞下颌关节异位骨组织从最初的纤维组织长入到颞下颌关节间隙, 然后血管组织侵入, 到软骨组织及最后的成熟骨性组织形成, 呈现随时间变化明显的软骨内成骨模式, 在这个成骨过程中, 异位骨组织对周边的组织破坏程度及小鼠的偏颌程度逐渐

加重。

软骨组织工程用羧甲基壳聚糖/氧化海藻酸钠复合水 凝胶的制备及体外评估

赵艳红, 滕彬宏, 李云洁, 黄颖
天津医科大学口腔医院

目的: 优化羧甲基壳聚糖/氧化海藻酸钠 (CMCS/OSA) 复合水凝胶制备工艺, 并体外评估 CMCS/OSA 水凝胶应用于软骨组织工程支架的性能及可行性。

材料与方法: 利用羧甲基壳聚糖内的氨基与氧化海藻酸钠内的醛基所发生的席夫碱反应, 以不同交联比例 (2: 1、1: 1、1: 2) 制备 CMCS/OSA 复合凝胶, 通过扫描电镜、凝胶流变分析、体外溶胀率和降解率检测、软骨粘附性测试等方法评估不同交联度水凝胶的微观形态、理化性能, 探究可以应用于软骨修复再生水凝胶材料的制备方法。以 CMCS/OSA 水凝胶作为培养细胞的三维体系, 将人脐带间充质干细胞负载于水凝胶内, 通过扫描电镜、细胞增殖 (CCK8 检测)、Live/Dead 染色方法评价水凝胶的细胞生物相容性, 以制备满足软骨再生领域需求的水凝胶。

结果: 以羧甲基壳聚糖内的氨基与氧化海藻酸钠内的醛基不同交联比, 制备出各组份的水凝胶。通过对各组份凝胶理化性能的评价发现: 当氨基和醛基比例为 1: 1 时, 扫描电镜可见均匀和密集的多孔结构; 成胶时间可控制在 2min; 水凝胶与软骨组织的粘附拉力为 $146.20 \pm 5.87 \text{ Pa}$, 明显高于氨基/醛基比例为 2: 1 的水凝胶 (粘附拉力为 $112.64 \pm 7.34 \text{ Pa}$) ($P < 0.05$); 溶胀率和降解率都较氨基/醛基比例为 2: 1 的水凝胶稳定。氨基/醛基比为 1: 1 制备出的羧甲基壳聚糖/氧化海藻酸钠水凝胶对细胞的粘附、生长和增殖无影响, 体外具有良好的细胞生物相容性。

结论: 氨基与醛基比为 1: 1 时制备出的 CMCS/OSA 复合水凝胶有望作为一种仿生支架材料应用于软骨组织修复和再生领域。

miR-155 在牙槽骨重建中的作用机制研究

赵志芳, 邓润智

南京大学医学院附属口腔医院 南京市口腔医院

摘要

目的: 研究 miR-155 对成骨细胞骨分化的调节作用以及作用机制。

材料与方法: 利用分段酶消化法从新生c57小鼠牙槽骨中获得成骨原代细胞, 显微镜下观察细胞形态, 然后采取ALP染色和茜素红染色对其进行鉴定。并将原代成骨细胞细胞分为对照组、诱导组、miR-155 组和 miR-155阴性对照组, 对照组用 α -MEM 培养基培养, 诱导组在 α -MEM培养液中添加50 μ M 抗坏血酸, 10mm β -磷酸甘油和100nm地塞米松进行成骨诱导, miR-155 组和 miR-155阴性对照组在成骨诱导之前分别转染 miR-155 mimic 和 miR-155 mimic negative, 诱导2天。

结果: ①茜素红染色及磷酸酶活性测定: 诱导组细胞茜素红着色强度、碱性磷酸酶活性和 mRNA 表达显著高于对照组($P < 0.01$); miR-155 组茜素红着色强度明显低于诱导组, 碱性磷酸酶活性和 mRNA 也明显低于对照组($P < 0.01$), ②荧光报告基因检测和 western blot 检测: miR-155可与 HIF-1 α mRNA 3' 非编码区结合, 并明显降低c57小鼠原代成骨细胞中 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达($P < 0.01$)。

结论: miR-155 可通过负性调控HIF-1 α 表达, 抑制c57小鼠原代成骨细胞的成骨分化。

唾液腺细胞中 TLR9 信号的激活对自噬和凋亡的影响及其分子机制初探

傅稼耀 石欢 叶蕾 吴书凤 俞创奇 郑凌艳

上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院 口腔外科

国家口腔疾病临床医学研究中心

上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所

背景: 前期研究发现舍格伦综合征患者唾液腺细胞中存在 TLR9 蛋白异常高表达, 但 TLR9 的改变对唾液腺细胞的影响仍不清楚。本实验拟探究 TLR9 信号通路的激活对唾液腺细胞自噬及凋亡的影响, 并初步探究其分子机制。

方法: 1. 应用 CpG Odn 激活人下颌下腺细胞系 HSG 的 TLR9 信号通路, 同时构建 TLR9 过表达慢病毒转染 HSG 细胞系, WB 法观察下游信号 p38 和 JNK 的磷酸化水平, 评估 TLR9 通路的激活情况。在上述模型中, 通过 WB 法观察凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 的表达, Image J 灰度检测分析其比值; Cleaved-Caspase 3 活性检测观察凋亡因子 Caspase 3 的裂解情况; Hoechst 染色统计凋亡细胞的数量, 探究 TLR9 通路激活对 HSG 细胞凋亡的影响。通过 WB 法观察自噬蛋白 LC3B 和 p62 的表达; mRFP-GFP-LC3B 荧光转染 TLR9 模型细胞系, 激光共聚焦显微镜下观察细胞内自噬小体和自噬溶酶体的数量改变, 电镜下切片观察细胞内自噬小体的数量改变, 评估 TLR9 通路激活对 HSG 细胞自噬的影响。2. 分别采用 p38 的抑制剂 SB239063 和 JNK 抑制剂 SP600125 处理 TLR9 通路激活的 HSG 细胞, 采用上述方法观察 p38 和 JNK 通路抑制后, HSG 细胞自噬和凋亡水平的改变。

结果: 1. 采用 CpG Odn 激活 HSG 细胞内 TLR9 信号通路后, 下游 p38 和 JNK 的磷酸化水平显著上调, 但相关信号于 6 小时后出现衰减。同时, HSG 细胞内自噬水平出现一过性上升, 而凋亡水平则随时间增加而上升。过表达 TLR9 同样激活了下游 p38 和 JNK 信号通路, 并使自噬和凋亡一直维持在较高的水平。2. 干预 HSG 细胞内 p38 的信号传递后, 其自噬和凋亡水平相比 TLR9 激活时出现了一定程度的下调。而干预 JNK 信号传递则明显抑制了 HSG 细胞的凋亡, 但自噬水平并没有出现下降。

结论: 本实验观察了 TLR9 在唾液腺细胞中异常高表达对细胞本身的影响, 发现其下游 p38 和 JNK 通路在调控唾液腺细胞自噬和凋亡时扮演着不同的角色, 为靶向 TLR9 进行舍格伦综合征的治疗提供新的理论依据。

骨质疏松大鼠骨髓巨噬细胞的体外培养研究

周玲^{1,2,3} 许雄程^{1,2,3} 王松^{1,2,3} 何梦娇¹ 骆凯^{1*}

1. 福建医科大学附属口腔医院; 2. 福建省高校口腔医学重点实验室; 3. 福建医科大学口腔医学研究院

目的: 体外分离培养绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMO)

大鼠骨髓巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMMs) , 探讨PMO状态下大鼠BMMs的生物学活性, 以期探讨PMO的发病机制与防治提供实验依据。

方法: 选择雌性3月龄SD大鼠, 采用双侧卵巢切除术建立PMO动物模型, 术后6周、12周比较假手术 (Sham) 组和去卵巢 (OVX) 大鼠体重, 术后12周收集两组大鼠股骨进行组织学染色观察以确定动物模型是否成功建立。分离培养Sham组和OVX组大鼠BMMs, 倒置显微镜对细胞形态进行观察, 采用免疫荧光染色法分析比较Sham组和OVX组大鼠BMMs细胞表面极化标记物趋化因子受体7 (CC-chemokine receptor 7, CCR7) 和甘露糖受体1 (mannose receptor C-type 1, MRC1) 的表达情况。

结果: 术前两组大鼠体重无明显差异, 术后两组大鼠体重均有所增加, OVX组大鼠术后6周、12周体重均明显大于Sham组。组织学染色结果显示术后12周, Sham组大鼠股骨远端骨小梁排列较为整齐连续, 呈网状结构; OVX组大鼠股骨远端松质骨吸收明显, 骨小梁变细、不连续且数目明显减少。上述结果提示采用双侧卵巢切除术可成功构建大鼠PMO动物模型。倒置显微镜下观察可见体外培养的Sham大鼠BMMs主要为长梭形, OVX组大鼠BMMs以多角形及煎蛋样为主。免疫荧光染色结果显示, 相较于Sham组, OVX组大鼠BMMs高表达M1型巨噬细胞标记物CCR7, 而M2型巨噬细胞标记物MRC1的荧光强度表达较低。

结论: 采用双侧卵巢切除术可成功建立PMO动物模型, 去卵巢可影响大鼠BMMs的生物学活性, PMO状态下BMMs倾向于向M1型极化。

原癌基因SRSF3是重要的自噬负调控因子

周璐 郭继华 贾荣*

武汉大学口腔医学院 湖北省口腔基础医学重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地暨口腔生物医学教育部重点实验室 (武汉大学)

目的:

自噬是依赖溶酶体途径对胞浆大分子物质和细胞器进行降解的一种过程, 在进化过程中高度保守。随着对其机制的深入了解, 自噬已经被证明参与多种疾病, 包括肿瘤。RNA的可变剪接又称选择性剪接, 是指转录后的前体mRNA通过不同的剪接加工方式, 产生不同的mRNA剪接异构体的过程, 也是在进化过程中高度保守的一种细胞调控方

式。目前这两种重要细胞生物学过程之间的关系还不清楚。本研究旨在研究自噬与RNA可变剪接之间的可能调控关系。RNA的可变剪接主要是由RNA可变剪接调控因子进行调控。目前发现RNA可变剪接与口腔鳞状上皮癌的形成、进展、预后都有着重要的关系。其中丝氨酸/精氨酸富集剪接因子3 (serine/arginine-rich splicing factor 3, SRSF3) 是一个重要的可变剪接调控因子, 已被证明是一个原癌基因, 在多种肿瘤中都高表达, 对于肿瘤的形成, 发展和维持都有重要的作用。SRSF3与自噬的关系尚不明确。本研究将探索在口腔鳞癌中SRSF3与自噬的关系。

材料与amp;方法:

1. 应用RT-PCR技术, 筛选在低氧诱导自噬条件下, 口腔鳞状癌细胞中显著变化的可变剪接调控因子, 并利用免疫印迹实验验证其表达。

2. 应用过表达质粒或siRNA来增强或降低口腔癌细胞系 (CAL 27细胞, SCC-9细胞和FaDu细胞) 中SRSF3的表达, 通过免疫印迹实验检测自噬表达相关指标p62和LC3B的表达, 用激光共聚焦观察GFP-LC3融合蛋白的表达情况。

3. 在增强或降低SRSF3表达的口腔癌细胞系中, 用RT-PCR和免疫印迹实验检测自噬相关基因的表达变化。

结果:

1. 在低氧诱导自噬的CAL 27细胞, SCC-9细胞或FaDu细胞中, SRSF3的表达显著低于正常条件培养的细胞, 且SRSF3与自噬表达相关指标呈负相关的关系。

2. 降低SRSF3的表达后, 细胞的自噬水平增加, 而增加SRSF3的表达可以抑制低氧诱导的自噬。

3. 降低SRSF3的表达后, 自噬的相关基因FoxO1, p65和BECN1的表达增强, 而增加SRSF3则产生相反的结果。

结论:

SRSF3在口腔癌细胞中通过下调下游自噬相关基因FoxO1, p65和BECN1的表达, 而起到抑制自噬的作用。

DMP1对骨折愈合过程中血管内皮细胞连接的影响

周梦琪, 孙瑶*

同济大学附属口腔医院, 上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的: 机体的稳态需要血管内外物质正常进出, 而血管内皮细胞相互连接所形成的屏障是血管发挥这种物质交换的结构基础。一旦内皮细胞连接松散, 血管通透性增加将使血管中的细胞, 分子等物质大量外溢, 进而导致机体微环境发生变化, 影响骨折愈合等骨修复过程, 然而引起血管通透性增加的机制尚未完全明确。其中牙本质基质蛋白1 (DMP1) 作为一种细胞外基质蛋白, 现已发现在血管内皮中有表达, 其糖基化产物DMP1-PG是一种蛋白聚糖, 与血脑屏障的紧密连接相关。小鼠DMP1唯一糖基化位点突变后S89G-DMP1小鼠DMP1糖基化水平显著下降。本研究通过应用S89G-DMP1小鼠, 观察血管生成及血管内皮细胞连接对骨折愈合的影响。

材料与方法: 采用 3-4周S89G-DMP1和野生型 (WT) 小鼠, 血管内皮细胞原代培养, 观察血管内皮细胞的连接及血管相关标识物表达情况; 3, 6, 9个月S89G-DMP1和野生型 (WT) 小鼠, 建立股骨骨折模型, RT-PCR定量检测骨折后1周骨髓腔中骨折愈合相关炎症基因表达变化; Micro CT分析骨折愈合情况; 小鼠骨髓置换实验, 对比血管通透性差异; 免疫荧光染色, 观察血管内皮细胞形态变化。

结果: (1) S89G-DMP1小鼠股骨骨髓腔巨噬细胞数目显著高于WT组, 骨折后1周骨髓腔IL-6, TNF- α 表达高于WT组, 骨痂部位IL-6表达低于WT组; (2) S89G-DMP1小鼠血管内皮细胞排列较WT组疏松, 骨折后血管生成减少, 构型紊乱, 血管相关标志物tie2, VEGF表达减少; (3) S89G-DMP1小鼠骨髓置换后骨髓腔中外溢的荧光物质高于WT组; (4) S89G-DMP1小鼠骨折愈合延迟, 骨痂密度降低, 骨折线明显。

结论: 本研究通过构建DMP1糖基化位点突变后的S89G-DMP1小鼠, 发现突变鼠血管内皮细胞连接疏松血管生成障碍, 骨折愈合能力减弱, 揭示了DMP1影响血管生成及血管内皮细胞连接紧密性, 进而影响骨折愈合。

软组织中过表达Fgf8抑制下颌骨中经典BMP信号导致小颌畸形

周楠, 王瑜, 高珺, 刘静, 陈晓艳, 李楠, 刘超*, 肖晶*
大连医科大学口腔医学院口腔病理系&大连市口腔基础研究重点实验室

目的: 小颌畸形被认为导致Pierre Robin 序列征(Pierre Robin sequence , PRS)的始动因素, 一般认为下颌骨缩短导致使口咽部空间减小, 从而引起舌体变高后移, 并阻碍两侧腭板抬升导致腭裂。以往对小颌畸形的病因学研究都集中在下颌骨本身, 对于组织之间的相互作用是否影响下颌骨发育及引起小颌畸形尚不明确。我们先前研究发现, Fgf8能够抑制各种颅颌面组织, 包括下颌骨、Merkel' s软骨和下颌软组织的分化和形成。在本研究中, 通过用 *Osr2-cre*在下颌周围组织中持续表达 *Fgf8*, 探讨下颌周围软组织的分化对下颌骨发育的影响, 及其导致小颌畸形的作用。

方法: 将 *Osr2-cre*小鼠分别与 *Rosa26R-Fgf8*和 *mT/mG*双荧光报告小鼠交配, 获得 *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠及 *Osr2-cre;mT/mG*小鼠。 *Osr2-cre;mT/mG*小鼠冰冻切片及荧光显微镜下观察 *Osr2-cre*的表达模式。骨(茜素红)/软骨(阿尔新蓝)染色法观察下颌骨及Merkel' s软骨结构及形态的变化。Masson染色法观察口腔颌面部组织形态。BrdU标记法检测细胞增殖情况。采用免疫组化法检测p-Smad1/5/8蛋白水平的改变。

结果: E12.5至E16.5天, *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠表现明显“开口状”; E14.5~E16.5天, *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠出现明显的下颌短小后缩。骨/软骨染色显示, E14.5及E16.5天的 *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠下颌骨短小, 近端部骨化严重减少, Merkel' s软骨变短。E14.5和E16.5天的舌矢状面Masson染色显示, *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠舌体出现明显高耸后坠。在E13.5天下颌骨即将矿化区, *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠表现出间充质细胞凝集减少及细胞增殖减少, 并且在E14.5天表现出下颌骨矿化减少。免疫组化结果显示, 在E13.5天 *Osr2-cre;Rosa26R-Fgf8*小鼠的下颌骨化区, p-Smad1/5/8蛋白分布水平显著降低。*Osr2-cre* (绿色荧光) 在 *Osr2-cre;mT/mG*小鼠下颌骨上并不表达, 而是表达在下颌骨周围的软组织上。

结论: 下颌骨周围软组织持续表达Fgf8信号, 可能通过其他因素抑制骨化区的典型BMP信号, 导致下颌骨矿化减少, 进而引起小颌畸形, 提示组织之间的相互作用能够影响下颌骨的发育。然而, 周围组织是通过什么机制影响骨化区典型BMP信号还有待进一步研究。

Berberine对LPS刺激条件下大鼠骨髓来源的间充质干细胞的成脂/ 成骨分化的调节作用

周蓉, 刘海霞, 朱雪琴, 祁胜财*, 徐远志*
同济大学附属上海市第十人民医院口腔科

目的: 为探索间充质干细胞在口腔疾病治疗中的潜在应用, 以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 为工具分子模拟口腔炎症环境, 研究化合物小檗碱 (berberine, BBR) 对骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC) 成脂/成骨分化能力的影响。**方法:** BMSC细胞在成脂诱导液中培养, 同时给予不同浓度的BBR与LPS共孵育, 培养14天。提取细胞总RNA和蛋白, RT-PCR和Western blot检测细胞因子和成脂相关基因的表达差异以及对NF- κ B信号通路的影响, 油红染色用于检测成脂分化水平, CCK-8检测细胞活力。**结果:** 化合物BBR在20 μ M以下时对细胞活力无影响。与对照组相比, LPS刺激组BMSC细胞向脂肪细胞分化效率更高, BBR给药组分化效率则低于对照组; 同时发现BBR加LPS共孵育组分化效率较LPS刺激组更低; 此外, LPS刺激组MCP-1/IL-6/TNF α /IL-1 β mRNA水平相较于对照组分别有5倍、7倍、13倍、3倍的增加, LPS刺激同时给与不同浓度的BBR干预, MCP-1/IL-6/TNF α /IL-1 β mRNA水平均不同程度的下调, 明显呈现剂量依赖效应, 且具有统计学差异。LPS还可引起的TGF β mRNA表达下调, 该作用也可以被BBR浓度梯度地逆转; BBR对LPS引起的NF- κ B 通路中p65和I κ B α 蛋白的磷酸化活化有明显抑制作用; 以上结果表明BBR能有效调节炎症因子相关通路, 降低促炎因子的表达提高抑炎因子的表达, 从而缓解了LPS诱导的促成脂作用。此外, 我们发现BBR可浓度依赖地上调骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) mRNA水平, 提示其具有促进BMSC成骨分化的潜力。**结论:** BBR可显著抑制LPS引起的促炎细胞因子的表达, 并抑制BMSC向脂肪细胞分化, 同时BBR能提高成骨相关基因的转录水平, 具有潜在的促进骨修复作用。

大鼠慢性牙周炎对脑认知功能的影响

周薇¹, 胡苡², 宋忠臣²

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院上海口腔医学研究所口腔微生态与系统性疾病实验室; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院牙周病科

研究目的: 本研究旨在通过建立慢性牙周炎模型, 探讨牙周炎对动物认知功能的影响及其可能机制。

材料与方法: 通过向SD大鼠双侧上颌第一磨牙龈沟内注射P. gingivalis来源的脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)致大鼠慢性牙周感染模型。采用旷场实验和Morris水迷宫实验评估大鼠的自主活动能力及学习记忆功能。采用免疫组化染色, Iba1和GFAP分别检测皮层和海马中小胶质细胞和星形胶质细胞。

实验结果: 研究结果显示P.gingivalis-LPS不影响大鼠自主活动, 但P.gingivalis-LPS可损害大鼠空间学习和记忆能力。在定位航行实验中, 随着第1天到第5天训练次数的增多, 各组大鼠寻找平台的潜伏期均不断缩短, 显示出有差异的学习能力。P.gingivalis-LPS组第3-5天的潜伏期显著长于对照组。在空间探测试验中, 与对照组相比, P.gingivalis-LPS组平台上的穿越次数显著减少、目标象限游泳距离百分比及时间百分比显著下降。Morris水迷宫结果表明, P.gingivalis-LPS可以损害大鼠的学习记忆能力。免疫组化染色显示P.gingivalis-LPS组皮层和海马中小胶质细胞和星形胶质细胞的胞体增大并伴有不规则突起, 提示小胶质细胞和星形胶质细胞均被激活。

结论: 牙周致病因子可影响脑的学习记忆功能, 牙周病致病因子引起的神经炎症可能在认知功能障碍的发生发展过程中起重要作用。

I型BMP受体ACVR1在成牙本质细胞极性维持中的作用研究

周怡君¹, 刘苍维¹, 闫广兴¹, 胡月¹, 郝新青¹, 史册¹, 孙宏晨^{1, 2, *}

¹ 吉林大学口腔医学院病理科; ² 中国医科大学口腔医学院

目的: 成牙本质细胞极性的维持, 对其定向分泌及矿化牙本质具有重要意义, 并可能进而影响牙本质的功能。研究表明, 在间充质细胞中条件性敲除*Acvr1*, 则小鼠成牙

本质细胞在形成牙本质的过程中难以维持其极性。本实验旨在研究I型BMP受体ACVR1在成牙本质细胞极性维持中的作用。

材料与amp;方法: 通过 *Cre-loxP* 系统构建条件性基因敲除的C57小鼠, 对照组为(*Acvr1* *fx/+*; *Osterix-Cre (+)/(-)*; *RS/+*), 实验组为(*Acvr1* *fx/-*; *Osterix-Cre (+)/(-)*; *RS/+*)。选取出生当天及出生后21天的小鼠, 通过X-gal染色确定 *Osterix-Cre* 在下颌切牙及下颌第一磨牙中的表达; 以HE染色的方法显示小鼠下颌切牙及下颌第一磨牙中成牙本质细胞的形态位置, 并进行分析; 采用real time PCR方法检测下颌切牙及下颌第一磨牙中细胞顶底极性及平面极性相关基因的表达; 通过免疫荧光染色检测下颌切牙及下颌第一磨牙成牙本质细胞中高尔基体的形态位置, 以及细胞顶底极性和平面相关蛋白标志物的分布及表达水平。

结果: 在出生当天, 实验组和对照组小鼠下颌切牙及下颌第一磨牙的成牙本质细胞呈高柱状或立方状, 且均可建立其极性, 细胞核位于远离基底膜的一侧。但在出生后21天, 相较于对照组, 我们发现实验组(即条件性敲除 *Acvr1* 的小鼠)中, 下颌切牙及下颌第一磨牙中成牙本质细胞部分细胞形态明显改变, 由高柱状或立方状变为矮柱状或多角形, 某些细胞甚至丧失与其他细胞间的连接; 部分细胞丧失其极性, 细胞核由远离基底膜的一侧移动至细胞中段或靠近基底膜的一侧, 高尔基体与细胞核的相对位置发生紊乱, 不再仅居于近基底膜侧, 而变得较为分散, 部分分布于核周; 细胞极性相关基因(如 *Vangl* 等) 表达明显降低, 细胞极性相关蛋白标志物表达水平降低且分布更为不规则, 如极性蛋白 *PARD3* 表达水平降低, 且在部分成牙本质细胞中由原顶端聚集变为弥散分布的状态。

结论: I型BMP受体ACVR1可能通过影响细胞极性相关蛋白的表达, 进而影响成牙本质细胞极性的维持。

MicroRNA-141对牙髓干细胞增殖及迁移能力的影响

周洲, 李泽汉, 闫明, 汪延秋, 庞希瑶, 许涛, 于金华*

南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学口腔医学院

【摘要】

目的 检测微小RNA (MicroRNA, miRNA) 141在牙髓干细胞 (Dental pulp stem cell,

DPSC) 增殖及迁移过程中的作用, 探讨miR-141对DPSC增殖能力的影响。

材料与方法 体外构建miRNA-141的mimics和inhibitor, 转染得到稳定高表达和低表达miRNA-141的DPSC。通过流式周期、CCK-8和Edu染色检测增殖能力的变化情况, 观察miRNA-141对DPSC增殖的影响。通过划痕实验检测miRNA-141对DPSC迁移的影响。

结果 将稳定高表达miRNA-141的DPSC与对照DPSC的流式周期检测结果比较发现, 增殖能力明显减弱 ($P < 0.01$), CCK8结果也显示高表达miRNA-141的DPSC增殖能力降低 ($P < 0.01$), Edu染色结果与流式周期检测和CCK-8结果一致。划痕实验结果表明高表达miRNA-141的DPSC迁移能力降低 ($P < 0.01$)。相反的, 将稳定低表达miRNA-141的DPSC与对照DPSC的流式周期检测结果比较发现, 增殖能力明显增强 ($P < 0.01$), CCK8结果与流式周期检测结果相一致, Edu阳性细胞数目显著升高 ($P < 0.01$)。划痕实验证实低表达miRNA-141的DPSC迁移能力增强 ($P < 0.01$)。

结论 miR-141参与了DPSC的增殖过程, 高表达miR-141可抑制DPSC的增殖和迁移能力; 低表达miR-141可促进DPSC的增殖和迁移。

【关键词】 microRNA-141, DPSC, 增殖, 迁移

含辛伐他汀的梯度结构电纺丝屏障膜的研发及其体内外促成骨作用的研究

朱慧勇, 余丹, 黄崇上, 周颖, 张亚敏, 刘杭飞, 孙霞飞, 王家雄
浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科

摘要

目的: 采用同轴电纺和混合电纺技术制备具有梯度结构的纳米纤维屏障膜, 并在核壳结构中载入促成骨药物辛伐他汀, 评价该屏障膜在GTR/GBR技术中的应用前景。

材料与方法: 以生物可降解的聚己内酯(PCL)和明胶(Gelatin)为原料, 通过同轴电纺和混纺技术制备纳米梯度电纺纤维膜, 同时在核(PCL)壳(Gelatin)结构中载入具有促成骨作用的辛伐他汀, 形成具有生物诱导活性的药物控释系统: PCL-PCL/Gt-simvastatin

membrane (A膜) ; mixed PCL-PCL/Gt-simvastatin membrane (B膜)。扫描电镜 (SEM) 观察电纺膜表征及梯度结构, 分别测定比较电纺膜疏松面和致密面的纤维直径、孔隙大小。体外模拟体内环境, 采用高效液相法检测电纺膜的药物缓释功能。骨髓间充质干细胞 (MSC) 接种A膜, B膜同轴面, 体外复合培养, 激光共聚焦扫描显微镜、SEM观察不同时间点MSC在电纺膜上粘附增殖分布情况, 并采用实时荧光定量PCR检测不同阶段MSC成骨分化情况。成纤维细胞 (HF) 分别接种于A膜, B膜PCL面, 激光共聚焦显微镜观察HFs侵入梯度电纺膜的深度及分布。选取18只2月龄雄性新西兰大白兔, 随机分组, 即A组 (A膜), B组 (B膜), C组 (空白对照组, 不置膜), 无菌条件下制备兔颅骨骨缺损模型, 分别在术后4w、12w处死, Micro CT及组织学观察, 比较各组动物模型中早期骨愈合和新骨形成量的差异, 以及纤维组织在骨缺损区的侵入深度, 以评价具有梯度结构B膜的屏障作用。

结果: 通过静电纺丝技术可以制备出具有梯度结构的纳米纤维电纺膜, 其疏松面 (PCL/Gt-simvastatin层) 纺丝直径 419.28 ± 59.23 至 444.62 ± 96.53 nm, 孔径大小为 30.27 ± 4.23 至 31.84 ± 4.43 μm ; 致密面 (PCL层) 纺丝直径 228.58 ± 98.12 至 254.73 ± 50.68 nm, 孔径大小为 13.88 ± 4.38 至 14.75 ± 2.96 μm , $P < 0.05$, 存在显著性差异。SEM观察可见通过混纺技术制取的B膜存在明显的过渡层, 使得PCL层和PCL/Gt-simvastatin层融为一体; 而A膜则见PCL层和PCL/Gt-simvastatin层分层明显, 局部无连接。梯度结构屏障膜中simvastatin累积释放量约 28.66 μg , 呈线性相关, A膜较B膜累积释放量稍高, 表明B膜中梯度结构更有利于药物的缓慢释放。体外实验, 显示了MSC在电纺膜上可很好地生长增殖。激光共聚焦观察示MSC在电纺膜疏松面侵入深度较HF在电纺膜致密面的侵入深度大; 同时, HF接种于电纺膜致密面的侵入深度, B膜浅于A膜, 表明B膜较A膜更具屏障作用。实时荧光定量PCR检测成骨特异性基因ON和Cbf- $\alpha 1$, MSC复合A膜和B膜培养后第1, 7, 14, 21d, 两组成骨基因表达均无统计学差异 ($P > 0.05$)。体内实验Micro-CT检测显示, 不同时间点 (4W, 12W) 兔颅骨新生骨体积 (BV, mm^3)、骨密度 (BD, mg/mm^3) 及骨体积分数 (BV/TV, %), A、B组明显大于C组, 存在显著性差异 ($P < 0.05$)。组织学结果显示A、B组在骨愈合初期即表现出明显骨膜反应, 大量新骨增生, C组由于纤维组织首先生长, 其成骨作用的启动速度和数量均较A、B组缓慢且弱小, B组由于具有梯度结构对纤维组织起到了较好的屏障作用, 其成骨作用持续性优于A组。

结论: 含辛伐他汀的梯度结构纳米纤维电纺膜可作为GTR/GBR技术中生物屏障膜而广泛应用于临床各种骨缺损再生中。通过同轴电纺和混纺电纺技术可使屏障膜满足多项生物功能的要求 (生物降解性, 生物活性诱导, 生物屏障作用, 以及骨传导), 在骨组织再生工程中具有巨大的应用前景。

含生物活性的梯度结构纳米纤维屏障膜的体内外活性研究

朱慧勇, 余丹, 黄崇上, 周颖, 刘杭飞, 王家雄, 张亚敏, 钱可嘉
浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科

摘要

目的: 采用同轴电纺和混合电纺的方法制备纳米梯度纤维膜, 并在核壳结构中载入生物活性因子辛伐他汀, 评价含生物活性的梯度结构纳米纤维屏障膜在GTR/GBR技术中的应用前景。

材料与方法: 以生物可降解聚己内酯(PCL)和明胶(Gelatin)为原料, 通过同轴静电纺丝和混合电纺丝制备成具梯度结构的纳米纤维膜 (PCL-PCL/Gelatin-辛伐他汀), 即梯度结构由单纯PCL层经混纺技术逐步过渡到核壳结构PCL/Gelatin层, 以分别成为梯度膜的致密面和疏松面, 同时在核壳结构的外壳纺液直接混合生物活性因子将辛伐他汀载入PCL/Gelatin层, 形成具有生物诱导活性的药物控释系统。

扫描电镜观察电纺膜致密面、疏松面的表征及断层结构, 并分别测定膜的纤维直径、孔隙率。采用密度梯度离心法获取人骨髓间充质干细胞 (hMSCs), 体外扩增至第三代, 分别接种于PCL-PCL/Gelatin-辛伐他汀电纺膜同轴面和PCL-PCL/Gelatin电纺膜同轴面, 体外复合培养1、7、14、21d, 通过激光共聚焦扫描显微镜、扫描电镜观察hMSCs在电纺膜上生长粘附情况, 并采用实时荧光定量PCR检测不同阶段hMSCs成骨分化情况。选取36只2月龄雄性新西兰大白兔, 随机分组, 即实验组 (PCL-PCL/辛伐他汀-Gelatin混合电纺膜, A组), 对照组 (PCL-PCL/Gelatin混合电纺膜, B组), 空白对照组 (不放置膜, C组)。无菌条件下制备兔颅骨骨缺损模型, 分别在术后4w、12w处死, 通过颅骨骨缺损影像学及组织学观察, 比较各组动物模型中早期骨愈合和新骨形成量的差异, 以及电纺膜在体内降解情况。

结果: PCL-PCL/Gelatin-辛伐他汀电纺膜为纳米级纤维丝构建的无纺结构, 电纺丝均直接均在纳米级别, 孔隙分布均匀, 似天然ECM。体外细胞-电纺膜共培养, 显示了细胞在电纺纳米纤维膜上可很好地生长增殖。实时荧光定量PCR检测成骨特异性基因, hMSCs复合电纺膜培养后1d, 两组各基因表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养后7d, 有药组各成骨分化相关基因表达量迅速增加, ON和Cbf- $\alpha 1$ 基因表达量达峰值, 明显高于无药电纺膜组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。培养后14d, Cbf- $\alpha 1$ 基因表达量略有下降, 但在培养21d后表达量又上升, 相同时间点两组间各基因表达比较有差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); ON基因表达量在14d时达到高峰, 后略有下降, 但相同时间点两组间各基因表达比较有差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。体内动物模型结果显示A组在骨愈合初期即表现出明显骨膜反应, 大量新骨增生, C组由于纤维组织内生长, 其成骨作用的启动速度和数量均较A组缓慢, 且弱小, B组由于PCL对纤维组织的屏障作用, 其成骨作用的启动速度和数量介于A组和C组之间。

结论：梯度纳米结构电纺膜复合生物活性因子辛伐他汀，可作为GTR/GBR技术中生物屏障膜而广泛应用于临床各种骨缺损再生中。电纺技术制作工艺的灵活简便性，使电纺膜可满足多项生物功能的要求（可控生物降解性，生物活性诱导性，生物屏障/传导性），生物活性因子辛伐他汀的廉价性，提示其作为骨组织工程中巨大的应用前景。

关键词：引导组织再生，同轴静电纺丝，混合电纺，人骨髓间充质干细胞，辛伐他汀，兔颅骨缺损模型

KLF2通过调控FGFR3促进人间充质干细胞的干性维持

朱慧勇，舒展浩，周颖，余丹，黄崇上，张亚敏，刘杭飞，孙霞飞，王家雄，
毕玲，陈引，钱可嘉

浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科

研究目的：

KLF2是胚胎干细胞（ESCs）增殖分化相关的转录因子，在维持ESCs自我更新方面具有重要作用。最近在间充质干细胞（MSCs）中也报导了KLF2的表达，但KLF2在MSCs中的作用尚不清楚。本研究探索了KLF2对MSCs干性维持的作用及调控的分子机制，为MSCs在组织工程及临床应用上的转化奠定基础。

研究方法：

通过siRNA转染使KLF2转录因子在MSCs中敲低，进一步通过cck-8实验，克隆形成实验，q-PCR及三向诱导分化实验验证KLF2转录因子在MSCs干性维持中的作用。

接着运用chip-sequence筛选出与KLF2转录因子相结合的靶基因，将该靶基因在MSCs中敲低，检测MSCs克隆形成能力及多向分化能力的影响，验证靶基因在MSCs干性维持中的作用。

研究结果：

chip-sequence提示FGFR3是KLF2的下游靶基因。当将KLF2敲低后，FGFR3的表达量也随之降低，同时MSCs的克隆形成能力、干性相关基因表达及三向诱导分化能力均明显下调。而单纯敲低FGFR3也使MSCs的干性维持能力显著下调。

研究结论：

KLF2通过调控FGFR3的表达促进MSCs的干性维持。

关键词： KLF2; FGFR3 ; 间充质干细胞; 干性; 分化

NRAGE调控牙釉质发育不全的分子机制

朱雪琴 汪饶饶 徐远志* 祁胜财*

上海市第十人民医院

摘要

目的：有研究发现神经营养素受体相互作用的MAGE同源物（NRAGE）与骨的发育及代谢相关，也能够抑制小鼠牙髓细胞的牙源性分化。但是，关于NRAGE基因在小鼠牙釉质发育中发挥的作用少有研究。本研究旨在研究NRAGE基因在小鼠牙釉质发育中发挥的作用并揭示相关分子机制。

材料和方法：本研究使用micro-CT、扫描电镜、HE组织染色方法研究NRAGE基因敲除后小鼠牙釉质矿化程度及结构、成釉细胞形态的变化。使用免疫组织化学方法检测野生型小鼠和NRAGE基因敲除小鼠的成釉细胞中自噬相关蛋白ATG5和ATG7的表达情况。在体外实验中，使用小鼠成釉细胞系（ALC）来进行研究，并在该细胞中敲除NRAGE基因。使用茜素红染色和检测碱性磷酸酶活性来反映成釉细胞的矿化程度，使用流式细胞术检测野生型和NRAGE基因敲除成釉细胞的细胞周期和凋亡水平。此外，使用氯喹二磷酸盐（CQ）抑制细胞自噬后检测成釉细胞矿化能力的变化。

结果：在小鼠中，敲除NRAGE基因导致小鼠牙齿釉质结构发生变化，矿化程度降低。基因敲除鼠的成釉细胞形态发生变化，免疫组化结果显示在成釉细胞中自噬相关蛋白表达增高，这可能与小鼠牙齿釉质发育不全相关。NRAGE基因敲除促进成釉细胞系矿化结节形成和碱性磷酸酶活性，但是这些效果可以被自噬抑制剂氯喹二磷酸盐逆转。此外，在成釉细胞系中敲除NRAGE基因可以促进细胞周期，抑制细胞凋亡水平。

结论：本研究发现，NRAGE基因缺失影响了自噬相关通路，从而导致小鼠的釉质发育不全。

雷帕霉素在炎症状态下对牙髓干细胞分化能力的影响

朱钊 宋佳欣 单兆臣

首都医科大学口腔医学院口腔颌面外科门诊

【摘要】 目的 观察雷帕霉素 (RAPA) 在炎症状态下对牙髓干细胞 (DPSCs) 增殖和凋亡、成骨及成脂分化能力的影响。**方法** 体外培养第四代人牙髓干细胞, 加载1000 ng/ml 脂多糖 (LPS) 作为炎症刺激, 加入50 ng/ml雷帕霉素, 检测炎症状态下人牙髓干细胞增殖能力、凋亡及成骨成脂分化能力改变, 并检测相关基因水平的变化。**结果** 雷帕霉素在炎症状态下对人牙髓干细胞增殖能力及凋亡没有明显影响。但是雷帕霉素可以增强炎症状态下人牙髓干细胞成骨能力, 降低成脂能力。同时, 检测发现ERK1/2及JNK mRNA 水平下降。**结论** 雷帕霉素通过靶向抑制mTOR通路, 进而降低下游ERK1/2及JNK的表达水平, 从而在炎症状态下发挥促进人牙髓干细胞成骨能力, 降低成脂能力的作用。

【关键词】 雷帕霉素; 牙髓干细胞; 炎症; 成骨及成脂分化

Effect of Rapamycin on differentiation capacity of dental pulp stem cell under inflammatory conditions

ZHU Zhao, SONG Jia-xin, SHAN Zhao-chen.

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Capital Medical University School of Stomatology

[Abstract] Objective To evaluate the effect of rapamycin on the proliferation, apoptosis, osteogenesis and adipogenic differentiation capacity under inflammatory condition. **Methods** The fourth generation of human dental pulp stem cell (hDPSCs) cultured in vitro were used in this experiment, and 1000 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) was added as inflammatory stimulation. Then we added 50 ng/ml rapamycin and detected the change of proliferation, apoptosis, and osteogenesis/ adipogenic differentiation capacity. Also the relative gene expression was checked. **Results** Rapamycin had no significant influence on the proliferation and apoptosis of hDPSCs under condition of LPS stimulating. While rapamycin enhanced the osteogenesis capacity of hDPSCs which was weakened under inflammatory condition. Meanwhile, rapamycin downregulated the adipogenic capacity of hDPSCs with

LPS stimulating. The relative gene level of ERK1/2, JNK was down-regulated.

Conclusion Rapamycin promoted the osteogenesis capacity and decreased the adipogenic capacity of hDPSCs under condition of inflammation through down-regulating the ERK1/2, JNK level via targeted inhibiting mTOR pathway.

[Key words] Rapamycin; Dental pulp stem cell; Inflammatory condition; Osteogenesis and adipogenic differentiation

全基因组测序技术探寻非综合征型唇腭裂家系内的致病基因

左伊宁 何淼 边专

武汉大学口腔医学院口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室

摘要

目的:唇腭裂是一种常见的颅面先天性疾病,根据全身是否伴发其他畸形,唇腭裂可以分为非综合征型唇腭裂和综合征型唇腭裂,其发病原因公认与环境因素和遗传因素有关。本研究的目的在于探寻唇腭裂疾病潜在遗传因素,寻找其致病基因或易感基因。

研究对象和方法:选取一个遗传性非综合征型唇腭裂家系内的成员为研究对象,以先证者及家系内所有患者为实验组;以家系内正常人作为对照组,进行完整的全基因组测序。选择Illumina PE150二代测序平台进行全基因组测序,测序深度不低于30x。经过数据质控,比对参考基因组、SNP /InDel 检测与注释、及SNP /InDel位点分析、SV检测并注释、CNV检测并注释、高频SNP位点验证等过程,使用ANNOVAR软件将变异位点与多个数据库内的已知信息进行分析比对,分析其变异频率;利用各类软件评估基因功能,预测基因致病性及氨基酸保守性,对变异的基因进行筛选,得到候选基因突变列表。通过回顾文献综述对这些候选基因进行进一步的挑选并对其进行同源性分析。

结果:经过各种软件的分析评估,20个错义突变位点被列为可能致病的候选基因,通过文献回顾我们发现其中 LMBRD1基因可能与唇腭裂相关,曾报道过该基因的缺陷

会引起综合征型腭裂。本次测序结果中LMBRD1中存在一个非同义替换单核苷酸变异c.1192T>C, 这种变异被预测是有害的 (POLYPhen V2 Score=0.999, SIFT Score=0, MutationTaster Pred=D)。此种错义突变使得一种氨基酸改变, 利用Uniprot和ClustalX V2.1对该突变基因编码的蛋白进行同源性分析, 发现此氨基酸在脊椎动物中高度保守。

结论: 由LMBRD1基因突变是公认的导致Cobalamin F (cbIF) disorder的病因, 扰乱维生素B12的代谢, 从而导致发育迟缓、全血细胞减少和心脏缺陷等临床症状, 但该基因与唇腭裂疾病的关联性报道研究并不多。我们的研究结果表明LMBRD1基因突变可能是引起该家系唇腭裂的致病基因或相关的易感基因, 但还需要通过桑格测序验证该家族内患者基因变异和显性遗传模型, 并且其致病的机制还需要通过分子细胞实验及动物实验进一步加以证明。

唇腭裂潜在致病风险的单核苷酸多态性研究

孟沛琦 林久祥 陈峰

北京大学口腔医院正畸科

目的: 唇腭裂是颌面部最常见的出生缺陷, 发病率因种族差异有所不同。唇腭裂病因复杂, 既有遗传因素又有环境因素 (如母亲营养状态、烟、酒精等) 的作用, 给唇腭裂的遗传风险评估造成较大困难。目前已经有多个全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 发现了一些唇腭裂相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 但是每一个位点对唇腭裂的遗传贡献率尚不清楚。本研究的目的是: 比较这些唇腭裂相关的SNP位点在维族和汉族唇腭裂发生中分别所起的作用, 探索唇腭裂发病风险预测的最小SNP集合。

材料与方法: 本研究从截至2018年1月发表在高水平杂志上的6篇唇腭裂相关的GWAS文章中共筛选出43个唇腭裂相关的SNP位点。我们收集了103例汉族患者、504例汉族对照、279例维族患者和205例维族对照的外周血样本, 分别检测上述43个SNP位点的基因型。利用机器学习的方法, 通过逐步递增和逐步移除, 进一步筛选出对唇腭裂发病风险预测至关重要的SNP位点。

结果: 通过logistic回归, 从43个唇腭裂相关的SNP位点中筛选出最优的6个, 对汉族人群中唇腭裂患者和健康人有较好的区分效果, 区分效力达0.87。在这6个SNP位点中有4个与营养代谢相关, 包括叶酸代谢相关基因*MTHFR*编码区的rs1801133和rs1801131, 以及维生素A转运相关蛋白RBP4基因非编码区的rs10882272。此外, 这两个营养代谢相关基因的纯合突变基因型在汉族人群中唇腭裂组和对照组的基因型频率有显著差异 ($p < 0.001$), 而在维族人群中则无显著差异。

结论: 营养代谢相关基因的变异在唇腭裂的发生中可能起重要作用。我们猜测: 对于备孕期及孕早期妇女, 尤其是携带有相应缺陷基因者, 针对其基因型个体化补充相应剂量的叶酸或 / 和维生素A或许能降低胎儿患唇腭裂的风险。

可注射成型壳聚糖-含银生物玻璃水凝胶的生物活性 及抗菌性在活髓切断术中的应用

朱宁馨 王媛媛 秦满
北京大学口腔医院

目的:

临床上, 常见因龋、牙外伤或发育异常等因素累及牙髓, 保留有活性的牙髓组织以促进牙髓牙本质复合体的形成、牙根继续发育、根管壁增厚, 对年轻恒牙的长期保留具有重要意义, 活髓保存治疗的重要性越发受到重视。但是, 对于弥漫性炎症影响的牙髓组织, 尚无有效的抗炎盖髓剂, 需着眼于具有生物活性的新材料。本课题用壳聚糖-甘油磷酸钠水凝胶包裹含银生物玻璃 (Ag-BG) 微粒, 检测其物理性能及抗菌活性, 对炎症反应性牙髓细胞模型的抗炎、诱导成牙本质活性, 以及早期弥漫性牙髓炎活髓切断模型的盖髓效果, 旨在研究其对于炎症牙髓的生物活性。

材料与方法:

合成可注射成型壳聚糖-甘油磷酸钠含银生物玻璃水凝胶 (CS/Ag-BG), 在 α -MEM培养基中浸泡24小时制备浸提液, 并检测材料表面形态及离子释放率。

分离培养人牙髓干细胞, 检测材料对细胞增殖粘附的影响, 以大肠杆菌内毒素刺

2018全国口腔生物医学学术年会

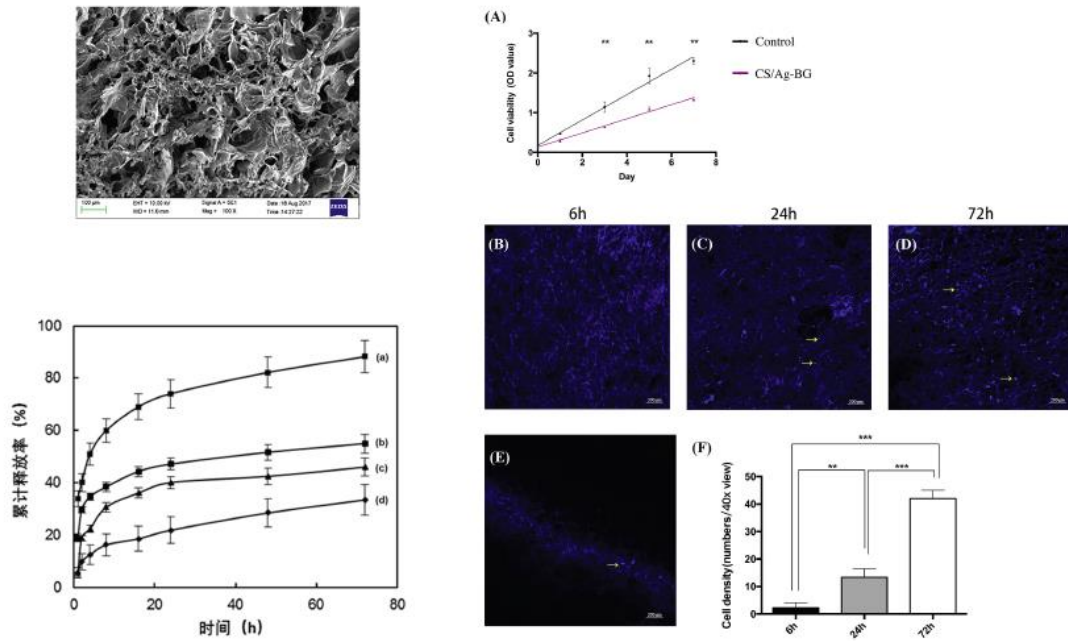
CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

激细胞, 建立炎性牙髓细胞模型, 经qPCR、Western blot、免疫化学染色检测CS/Ag-BG对细胞炎症因子及成骨相关因子表达程度的影响, 并通过Western blot及细胞荧光染色初步探索材料抗炎机制。

建立大鼠早期弥漫性牙髓炎模型, 行改良活髓切断术, 以CS/Ag-BG盖髓, MTA作为阳性对照, 组织切片染色, 观察修复性牙本质形成的情况, 以及剩余组织内成骨、成神经、成血管相关标记物的表达。

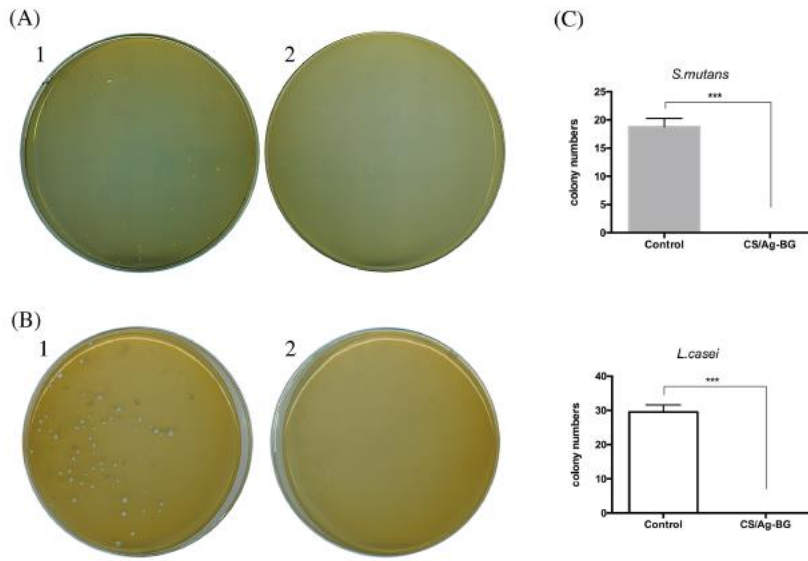
结果:

I



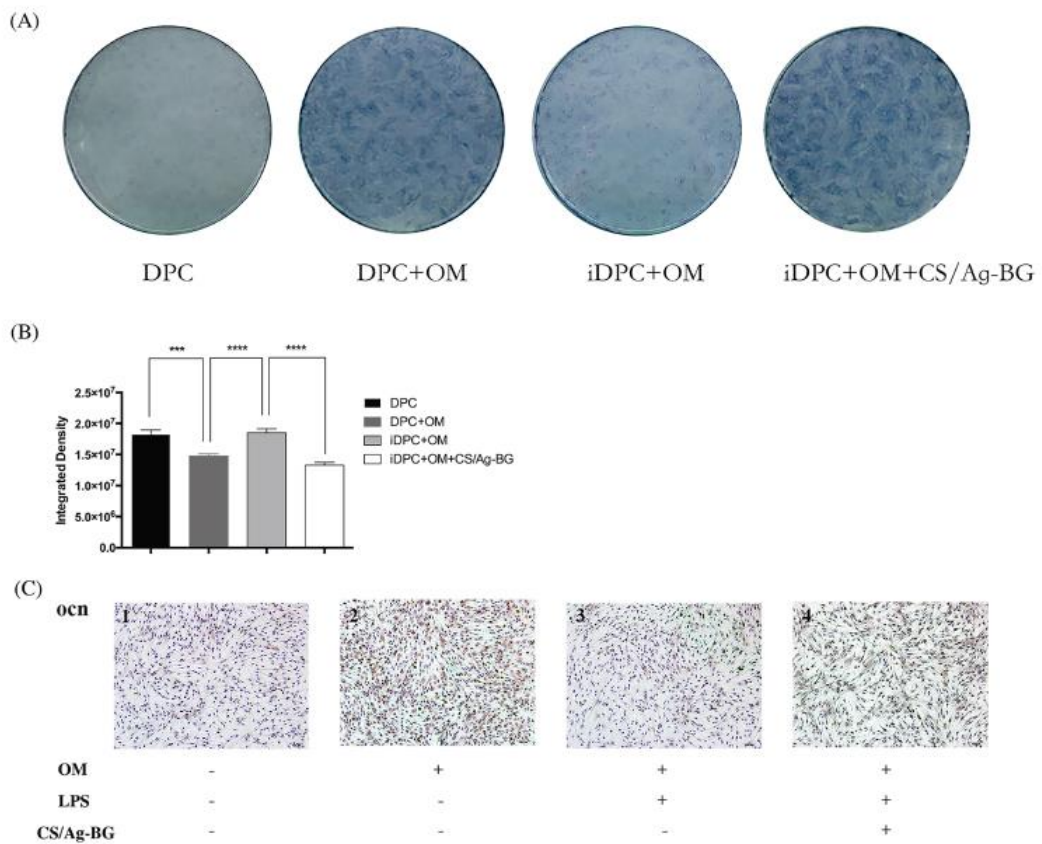
扫描电镜下可见CS/Ag-BG具有多孔状结构, 孔径约60-80 μ m; 将不同含量纳米银的颗粒浸泡在蒸馏水中24-72小时, 银离子缓慢稳定释放, 72小时基本达平台期, 表明有效成分能够稳定缓释。CCK-8实验表明CS/Ag-BG不影响牙髓干细胞增殖, 并且共聚焦显微镜下可以观察到粘附在凝胶表面的细胞数量稳定增多。

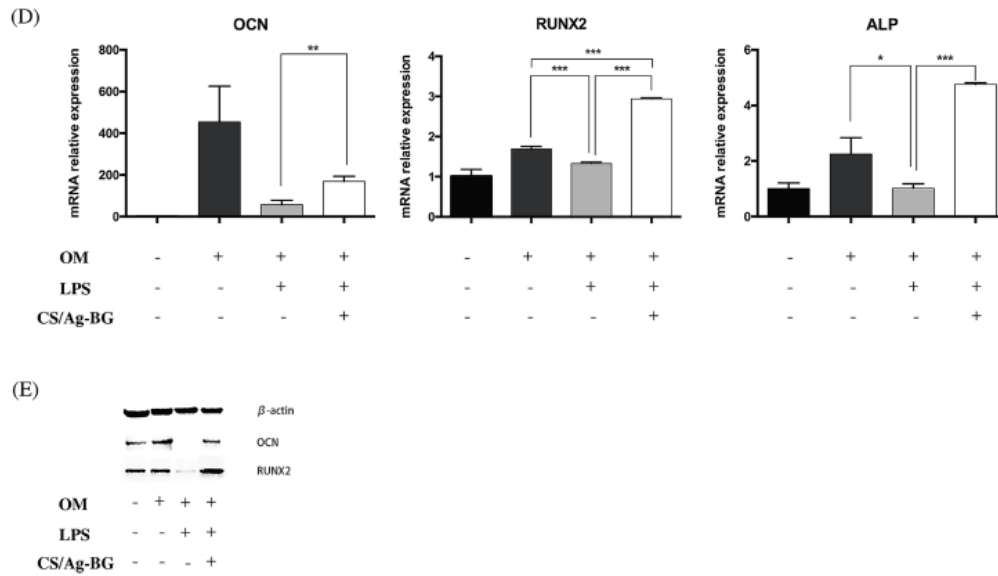
II



变形链球菌及乳酸杆菌菌落计数实验表明，CS/Ag-BG具有显著抑菌作用，组间聚落数具有显著性差异。

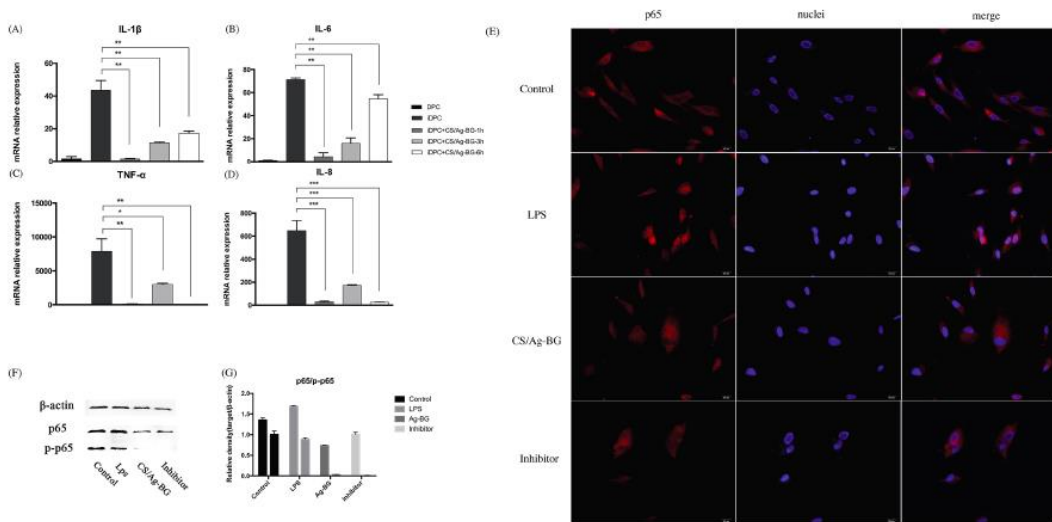
III





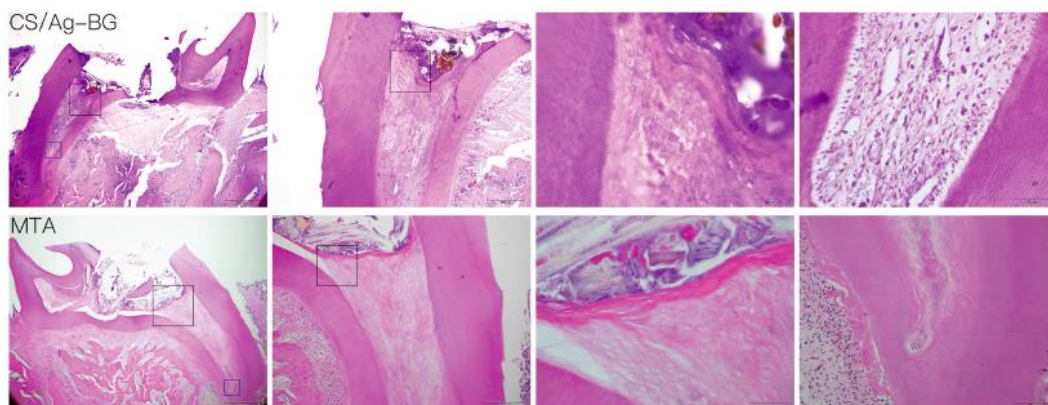
碱性磷酸酶染色实验表明，CS/Ag-BG能提高碱性磷酸酶的表达，骨钙素（Osteocalcin）免疫化学染色结果表明CS/Ag-BG能上调OCN的表达，染色结果与qPCR结果一致。qPCR与Western blot结果说明CS/Ag-BG能提高OCN及RUNX2的表达。

IV



Quantitative PCR结果显示，CS/Ag-BG能显著下调炎症性牙髓干细胞中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及IL-8四种炎症因子的mRNA表达水平，且1h时抑制作用最显著。Western blot结果显示CS/Ag-BG能显著抑制p65磷酸化，并且细胞荧光染色结果表明CS/Ag-BG能抑制p65入核。

V



大鼠实验性牙髓炎盖髓实验的HE染色结果显示，8周后CS/Ag-BG组与MTA组均形成完整的冠方封闭。在MTA组，根尖处的牙髓组织已经失去活性形态，细胞核染色不清；CS/Ag-BG组可见纤维样牙髓组织，细胞核染色明显，表明根方牙髓组织仍具有活性。

结论：

本实验表明可注射成型壳聚糖-含银生物玻璃水凝胶具有利于细胞增殖黏附的表面结构，操作性良好，不抑制牙髓干细胞的增殖，无明显细胞毒性，能稳定释放银离子，具有显著的抗菌性，并且，该材料具有显著的抗炎作用，可上调牙髓干细胞成骨及成牙本质分化相关标记物的表达水平。在大鼠弥漫性牙髓炎模型中，该材料作为盖髓剂可形成良好冠方封闭，并保留部分根方牙髓组织活性，证实其良好的生物活性。该材料仍需进一步验证抗炎及促分化的细胞机制。

UNC5B调控人脂肪干细胞定向分化的分子机制研究

胡心怡^{1, 2}, 刘云松¹, 张萍^{1*}, 周永胜^{1*}

1.北京大学口腔医院; 2.深圳大学总医院

目的：研究表明，轴突导向因子Netrin-1可通过抑制其受体UNC5B介导的细胞凋亡，维持胚胎干细胞的自我更新及多向分化潜能。本研究旨在探索UNC5B对间充质干细胞定向分化的调控机制，为利用人脂肪间充质干细胞（hASCs）修复口腔颌面部骨及软组织

织缺损提供理论依据, 促进骨再生及软组织再生技术的发展。

材料与方法: 利用hASCs构建UNC5B稳定敲低细胞系; 成骨诱导后通过碱性磷酸酶染色及定量、茜素红染色及定量、实时定量PCR、裸鼠背部植入实验, 研究UNC5B对hASCs体外成骨分化以及体内新生骨生成的影响; 成脂诱导后通过油红O染色、实时定量PCR、裸鼠背部植入实验, 研究UNC5B对hASCs成脂分化的作用; 通过RT-qPCR, Western blotting实验探索UNC5B调控hASCs定向分化的分子机制。

结果: UNC5B蛋白表达水平在成骨分化过程中逐渐降低, 在成脂分化过程中显著增加; UNC5B敲低的细胞体外成骨分化能力显著降低, 体内新生骨生成受到明显抑制; UNC5B敲低后, hASCs体外成脂分化能力均显著增强; UNC5B通过调控 BMP 信号通路促进hASCs成骨分化; UNC5B对hASCs成脂分化的调控依赖于JNK信号通路。

结论: UNC5B通过调控BMP信号通路促进脂肪干细胞成骨分化; 通过调控JNK信号通路抑制脂肪干细胞成脂分化, 在干细胞的定向分化中起重要调控作用。

载脱落乳牙干细胞和骨形态蛋白的可注射性微球 协同促进骨再生的研究

方滕姣子, 李晓霞, 赵玉鸣, 葛立宏*
北京大学口腔医学院儿童口腔科

目的:

种子细胞作为组织工程中的核心部分具有至关重要的作用, 脱落乳牙牙髓干细胞 (SHED) 具备较强的自我增殖能力和多向分化潜能, 且其旁分泌营养功能在募集干细胞和改善微环境方面有着显著的优势, 因此在组织工程领域具有良好的应用前景。为了探究SHED细胞作为种子细胞在促进骨再生方面的作用, 本研究基于传统聚乳酸纳米纤维微球 (PLLA nanofibrous microspheres, PLLA NF-Ms) 的基础上, 对材料进行不同的表面修饰, 分别获得细胞微载体和可用于缓释蛋白的微球支架, 以探究该复合体系在修复骨缺损、促进骨再生方面的作用。

材料与amp;方法:

利用传统的热致相分离和溶剂挥发法合成PLLA纳米纤维微球,表面分别进行涂布聚多巴胺 (polydopamine, PDA) 和接枝肝素-多巴胺 (Heparin-Dopamine, Hep-Dopa) 的处理,获得细胞微载体和蛋白载体。将SHED细胞接种在PDA-NF-MS上预培养7天,同时利用Hep-Dopa NF-MS负载BMP-2。通过扫描电镜 (SEM)、接触角实验对三种微球进行表征,利用激光共聚焦 (LCSM)、SEM和MTT检测细胞在微球支架上的黏附、伸展和增殖。将两种复合微球支架混合后植入裸鼠颅骨4mm直径缺损区域,4周和8周进行micro-CT影像学和组织学检测。

结果:

三种NF-MS粒径大小基本相同,分布在50-200微米之间。经PDA表面改性后,PLLA微球表面更亲水,PDA-NF-MS表面可见有散在的纳米级PDA颗粒均匀分布。与普通的PLLA NF-MSs相比,SHED细胞在PDA-NF-MS上黏附的细胞数目要多,且增殖活性更强。表面接枝Hep-Dopa的NF-MSs其蛋白包封率显著增加,且BMP-2得到了缓慢的释放。荧光标记的蛋白质在微球中均匀分布,证实了BMP-2的成功负载。体内实验结果显示,载有SHED细胞的复合微球支架组可见周边有大量的血管生成,双载组修复颅骨缺损的效果显著优于其他单载组。

结论:

通过对PLLA纳米纤维微球的表面改性,我们成功的合成了有利于干细胞黏附、增殖的细胞微载体和缓释蛋白的微球支架。此外,本研究还发现SHED细胞可通过介导微环境参与修复骨缺损,同时能够与BMP-2蛋白协同促进骨再生。

变形链球菌跨膜蛋白MapZ对细菌分裂蛋白FtsZ的调控机制研究

李永亮

北京大学口腔医院 颌面外科 第二门诊部

目的:

微生物是口腔生态系统中的重要组成成分之一。深入研究口腔微生物的生理行为，既有助于回答基本的生命科学问题，也有助于深入了解微生物在口腔疾病发生发展的重要作用。二分裂是细菌细胞的重要的增殖方式，FtsZ是细菌二分裂过程中最重要的核心蛋白，能够在细菌的分裂位点上形成环形结构（Z-ring）从而介导二分裂的发生。近年来，在肺炎链球菌中发现了一种全新的以跨膜蛋白MapZ介导的FtsZ调控机制，并可能广泛存在于链球菌属中。但是MapZ对FtsZ的调控方式仍不清楚，本研究旨在进一步明确链球菌中MapZ蛋白对FtsZ的调控机制。

材料与方**法**：

为了进一步明确MapZ对FtsZ的作用机制，本研究以口腔中的变形链球菌作为研究对象。通过同源重组技术对变形链球菌的smMapZ（smMapZ）进行基因敲除，研究MapZ在变形链球菌中的功能；利用荧光蛋白对MapZ和FtsZ进行特异性荧光标记，结合全内反射荧光显微镜和超高分辨率荧光显微镜技术研究MapZ和FtsZ的空间定位以及其运动特性；利用单分子追踪技术研究了活细菌中MapZ单个分子的运动行为。

结果：

变形链球菌中smMapZ的菌细胞二分裂中起着重要作用，并在菌细胞中呈现与分裂周期相关的空间分布特点；通过描述FtsZ在变形链球菌中的动态运动过程，定量地得出了体内FtsZ的运动速率，并且首次发现了FtsZ能够在Z-ring之间发生转移；进一步分析发现smMapZ的缺失可以导致分裂早期FtsZ出现不受限制的运动行为，而处于收缩期的FtsZ则表现出更短的持续时间；超高分辨率荧光显微技术和单分子追踪结果显示MapZ能够在分裂位点处形成一个不均一的环性结构，且该环形结构在FtsZ运动过程中保持静止不动的状态。

结论：

综上，本研究在变形链球菌中描述了MapZ的特性与功能，并研究了MapZ对FtsZ运动的影响，提出了一种全新的对FtsZ的调制机制：MapZ能够在分裂位点形成环性结构，并发挥轨道作用引导或限制FtsZ在此处的运动，从而调控FtsZ在正确的分裂位点上形成FtsZ环。

糖尿病对牙周炎及牙周健康者龈下菌群的影响

卢洪叶、徐菁玲、和璐、杨炳涛、张琳、孟焕新*

北京大学口腔医院

目的: 全球有3.71亿人患有糖尿病, 严重地降低人们健康水平, 增加了医疗卫生的负担。流行病学研究和动物实验证明牙周病与糖尿病有很强的相互关系, 糖尿病的发生会导致牙周炎, 同时牙周炎也会增加糖尿病的风险及严重程度2-5倍。但是这两种疾病的相互作用机制尚不清楚。龈下微生物是牙周炎的始动因子, 也可以从牙周组织进入血液影响糖尿病。本研究的目的是 (1) 分析糖尿病和牙周炎之间的双向关系; (2) 探究龈下微生物对糖尿病和牙周炎的潜在协同相互作用中发挥的作用; (3) 挖掘龈下微生物影响两种疾病发展的机制。

材料与方法: 本研究共纳入45人: 牙周炎伴糖尿病者15人 (T2DM+CP其中控制良好者5人、控制一般者5人、控制差者5人)、糖尿病者 (T2DM) 10人、牙周炎者 (CP) 10人、健康者 (P) 10人。牙周检查指标包括: 菌斑指数 (Plaque index, PLI)、探针深度 (Probing depth, PD)、出血指数 (Bleeding index, BI)、附着丧失 (Attachment loss, AL)、失牙数 (Tooth loss, TL)。全身指标包括: 血糖、血脂、血细胞相关指标。取16、21、24、36、41、44六个位点的龈下集合菌斑, 通过16S rRNA基因测序。

结果: 共检测出1596328片段包括12个门、26个纲、39个目、66个科、129个属、269个种。T2DM+CP、T2DM、CP和H的菌群多样性与结构有明显差异。相比H组, T2DM者含有较多的 *Spirochaetes*、*Proteobacteria* 门, 较少的 *Actinobacteria*、*Saccharibacteria* TM7。相比T2DM组, T2DM+CP者含有较多的 *Saccharibacteria* TM7、*Chloroflexi*、SR1, 较少的 *Proteobacteria*、*Spirochaetes*、*Bacteroidetes*。

结论: 牙周健康的情况下, 血糖会影响龈下细菌构成, 糖代谢为主的细菌会增加, 平衡被打破, 龈下菌群结构变复杂。在患有牙周炎的情况下, 龈下菌群组成以牙周致病菌为主, 而糖尿病对龈下菌群结构的影响较小。

牙周炎患者颊黏膜微生物群落结构研究

石梦¹ 危伊萍¹ 路瑞芳¹ 聂勇² 胡文杰¹ 吴晓磊²

1 北京大学口腔医学院·口腔医院 牙周科, 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 2 北京大学工学院 能源与资源系

目的: 分析慢性牙周炎患者、侵袭性牙周炎患者和牙周健康者颊黏膜微生物群落结构特点及差异, 探索牙周炎患者口腔微生物的多样性及其改变在牙周炎发病中的作用。

方法: 在北京地区纳入 11 名慢性牙周炎患者 (ChP), 12 名侵袭性牙周炎患者 (AgP) 和 9 名牙周健康者 (HP), 共计收集 32 个颊黏膜拭子样本。提取样本的基因组 DNA, 对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增, 使用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序, 对得到的测序结果在物种多样性、相对丰度等方面进行生物信息学分析。

结果: ①ChP、AgP、HP 三组颊黏膜样本共得到 480 个 OTU, 归属于 12 个门、30 个纲、53 个目、89 个科和 162 个属; ②两种类型牙周炎组较健康组 ACE 指数和 Shannon 指数有所增加; ③三组共有的优势菌门是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门, 拟杆菌门、梭杆菌门在 AgP 组中显著增加, 放线菌门则在 HP 组中显著增加; 三组共检出 16 个共有优势菌属, 韦永氏球菌属在 ChP 及 AgP 组丰度均较 HP 组有显著增加, 梭杆菌属、卟啉单胞菌属在 AgP 组中丰度显著增加, 而链球菌属、罗氏菌属在 HP 组丰度显著增加; ④根据 Unweighted Unifrac 距离可知, 牙周健康者间的颊黏膜微生物群落结构表现出最大的差异, 而牙周炎患者间的差距变小。

结论: ①慢性牙周炎患者、侵袭性牙周炎患者和牙周健康者口腔颊黏膜微生物群落结构存在一定异同, 牙周炎组较健康组物种丰富度及多样性显著增加; ②牙周炎患者和牙周健康者口腔颊黏膜微生物群落的菌门丰度不同但种类可能恒定; ③颊黏膜微生物群落结构会因牙周健康状态的不同而发生改变, 变化包含已知的、与牙周炎的发病有密切关系的菌门、菌属, 说明颊黏膜可能是部分牙周致病菌除唾液外的“储存库”; ④牙周健康者的颊黏膜微生物群落异质性相较于牙周炎患者更高, 牙周炎患者间的颊黏膜微生物群落结构差异变小, 说明牙周炎这一状态不仅会影响龈下菌斑, 同时也会导致口腔内其它生境的微生物群落结构发生改变。

人 β 防御素4应用于乳牙盖髓治疗的基础研究

翟越

北京大学口腔医院

目的: 探索人 β 防御素4 (human β defensin, HBD4) 在乳牙牙髓细胞中的表达情况, 研究HBD4在乳牙牙髓细胞中的抗炎功能及HBD4诱导乳牙牙髓细胞在炎症微环境下成骨矿化的能力。

材料与amp;方法: 搜集5-7岁健康儿童滞留乳牙, 组织块法提取乳牙牙髓细胞, 选择第3-5代乳牙牙髓细胞进行实验。炎症因子TNF- α 和IL-1 α 联合刺激乳牙牙髓细胞, 比较刺激前后HBD1-4 mRNA表达水平; 运用Octet分子相互作用仪检测HBD4与LPS之间的相互作用; LPS刺激细胞后, 比较HBD4处理组与对照组之间乳牙牙髓细胞中MAPK p42/44磷酸化水平; 比较HBD4诱导7天后, LPS刺激组与对照组乳牙牙髓细胞中碱性磷酸酶活性及诱导14天后成骨标志物mRNA表达水平。

结果: 炎症因子TNF- α 和IL-1 α 联合刺激乳牙牙髓细胞后, HBD1-4表达水平较对照组升高, 且HBD4表达水平最高; HBD4抑制LPS刺激下乳牙牙髓细胞炎症因子的表达; HBD4对LPS有亲和力, 随着浓度升高, HBD4对LPS亲和力增高, 同时HBD4能降低LPS刺激下乳牙牙髓细胞中MAPK p42/44磷酸化水平, 说明HBD4通过直接结合LPS抑制乳牙牙髓细胞中MAPK信号通路从而抑制LPS引起的炎症反应; HBD4升高LPS刺激下乳牙牙髓细胞矿化诱导 7天后碱性磷酸酶活性以及诱导14天后成骨标志物的表达水平。

结论: HBD4在炎症条件下乳牙牙髓细胞中高表达, 且具有抗炎和炎症微环境下诱导矿化的能力, 有潜力作为一种生物相容性良好的乳牙盖髓剂应用于乳牙炎症牙髓的治疗。

白芍总苷对口腔扁平苔藓来源间充质干细胞的作用研究

赵忠芳 韩莹 王衣祥* 刘宏伟*

北京大学口腔医院

背景: 口腔扁平苔藓 (Oral Lichen Planus, OLP) 是一种T细胞介导的慢性炎性口腔黏

膜病。间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) 治疗是有望应用于临床的新型治疗方式。白芍总苷 (Total Glucosides Of Paeony, TGP) 是对OLP治疗有效的中药, 但是其具体的治疗机制尚不清楚。

目的: 探讨OLP来源MSCs免疫调节功能变化及TGP对MSCs功能的影响和相关机制。

材料与方法: IHC、FC、RT-PCR、细胞转染技术, ELISA和免疫印迹等方法探讨白芍总苷对口腔扁平苔藓来源间充质干细胞的影响及相关机制

结果: 1. 相比于正常口腔黏膜, OLP病损中IL-6、TNF- α 、TGF- β 、IL-10的表达明显升高; OLP-MSCs炎症调节相关因子的表达与病损组织相一致。2. TGP明显降低MSCs分泌IL-6和TNF- α , 但显著升高其分泌TGF- β 和IL-10。3. OLP-MSCs低表达miR-124-3p而高表达t-STAT3和p-STAT3; TGP能够逆转异常表达的miR-124-3p/STAT3轴。

结论: OLP-MSCs功能表型是异常的, 这与其所处的微环境相关。TGP能改善MSCs异常功能表型, 其可能通过miR-124-3p/STAT3通路实现。

钛种植体表面微纳形貌在促骨整合过程中相关

lncRNA-mRNA共表达机制研究

郑燕 郑云飞 贾凌飞 张宇 林野

北京大学口腔医学院, 北京, 100081

目的: 口腔种植修复的关键要素是快速稳定的骨整合, 前期有研究表明对钛种植体表面进行喷砂加酸蚀 (SLA) 粗化处理形成的微纳形貌能促进种植体骨整合。且近年来, 有研究表明, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 可通过转录及转录后水平调控骨整合中的成骨分化过程。本研究旨在鉴定SLA-Ti在骨整合过程中发挥主要作用的优势 lncRNA 及其靶基因, 从而为阐明种植体骨整合过程中成骨分化的分子调控机制提供新思路。

材料与方法: 制备钛片并分成两组, 普通光滑钛片 (SMO-Ti) 和经过SLA处理后的钛片 (SLA-Ti)。使用扫描电子显微镜 (SEM) 和X射线衍射仪 (XRD) 对表面微观结构进行检查, 通过使用接触角仪检查不同组别钛片的接触角和表面能。使用动物模型验证试样的成骨能力的差异。定性和定量观察了不同诱导条件下人骨髓间充质干细胞

(human bone marrow mesenchymal stromal cells, hBMSCs) 的生长特性及其成骨潜能, 收集细胞总 RNA 进行高通量芯片筛选、使用生物信息学方法评估 mRNA 和 lncRNA 的基因表达谱并进行 qPCR 验证。

结果: 经验证, SLA-Ti 表面物理表征与 SMO-Ti 的不同; SLA-Ti 可以促进 hBMSCs 的黏附, 促进细胞在材料表面的延展; 上调成骨相关基因: OPN、OCN、BMP2、RUNX2。SLA-Ti 表面增强细胞在钛表面碱性磷酸酶的分泌和钙结节形成; 大鼠股骨内植入的种植体中, SLA-Ti 表面新骨形成和骨结合均有提高。与 SMO-Ti 相比, SLA-Ti 上的 hBMSC 分化相关的 lncRNA 显示出明显差异, 以此可以构建用于理解差异表达的 lncRNA 的作用的 lncRNA-mRNA 共表达网络。其中, HOXD-AS1 / FGF10, IGF2-AS / GLI2 和 HIF1A-AS1 / VEGFA 的表达差异明显。

结论: SLA-Ti 表面的钛可以增强 hBMSCs 的成骨向分化。培养在 SLA-Ti 表面的 hBMSCs 呈现与 SMO-Ti 表面不同的 mRNA 和 lncRNA 的独特基因表达谱, 并涉及与骨形成相关的差异表达基因的子集。此外, 经过构建并分析 mRNA 和 lncRNA 的共表达网络, 发现差异表达包含 HOXD-AS1 / FGF10, IGF2-AS / GLI2 和 HIF1A-AS1 / VEGFA 等。**lncRNA-mRNA 共表达的差异可能成为种植体骨整合过程中成骨分化的潜在分子调控机制。**

白细胞介素1-β调控三叉神经节钠离子通道1.7表达的机制

张鹏 甘业华

北京大学口腔医院 青岛市市立医院*

目的: 疼痛是颞下颌关节紊乱病 (temporomandibular disorders, TMD) 患者就诊主要原因, 但其具体机制尚未明了。目前用于缓解 TMD 疼痛的非甾体类抗炎药主要机制是抑制 COX-2 活性, 减少 PGE2 合成。细胞因子如白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 可通过激活 COX-2 增加 PGE2 合成参与炎性痛, 但其具体靶点尚不完全明了。电压门控钠离子通道 1.7 (Nav1.7) 在炎性痛中发挥重要作用。本课题组前期研究发现, PGE2 通过其受体 EP2 上调三叉神经节 (trigeminal ganglion, TG) Nav1.7 表达进而参

与TMJ炎性痛，但PGE2上游调控因子及EP2下游调控Nav1.7表达的机制仍不明了。卫星胶质细胞 (satellite glial cell, SGC) 通过细胞因子参与炎性痛。因此，本研究拟在大鼠离体培养TG及TMJ炎症模型中，探讨IL-1 β 能否调控神经元Nav1.7表达，并探讨TMJ炎症时IL-1 β 是否来源于SGC及其是否通过调控神经元Nav1.7表达，从而参与TMJ炎性痛。

材料与方法：雄性SD大鼠TG离体培养，单独应用IL-1 β 、forskolin (腺苷酸环化酶激动剂) 或分别联合应用COX-2抑制剂NS-398、PGE2受体EP2抑制剂PF-04418948、蛋白激酶A (protein kinase A, PKA) 抑制剂H89或PKI-(6-22)-amide，采用实时定量PCR、Western blot、及免疫组织荧光实验评估TG内Nav1.7、COX-2、及p-CREB

(p-cAMP-response element binding protein) 的表达及定位；应用染色质免疫沉淀法检测CREB是否与大鼠Nav1.7启动子结合。应用大鼠脑立体定位实验于TG内直接注射IL-1 β 或应用完全弗氏佐剂诱导TMJ炎症，并于TG内直接注射SGC活化抑制剂fluorocitrate，观察TG内IL-1 β 、COX-2、p-CREB、及Nav1.7的表达及大鼠摆头阈值的改变。

结果：IL-1 β 可上调TG内Nav1.7、COX-2、p-CREB 表达，但Nav1.7和p-CREB表达的上调均可被NS-398、PF-04418948、H89、及PKI-(6-22)-amide阻断；forskolin亦上调TG内Nav1.7表达。IL-1 β 增强CREB与Nav1.7启动子的结合。于TG内直接注射IL-1 β 或诱导TMJ炎症均上调TG内COX-2、p-CREB、Nav1.7的表达。此外，诱导TMJ炎症可激活TG内SGC；于TG内直接注射fluorocitrate可完全阻断因TMJ炎症上调的SGC内的IL-1 β 、COX-2及神经元内的p-CREB、Nav1.7表达，且部分阻断TMJ炎症导致的大鼠摆头阈值下降。

结论：诱导TMJ炎症后激活TG内SGC，促进激活的SGC内IL-1 β 表达上调，进而促进COX-2表达上调，使得PGE2产生增加，进而激活神经元内EP2/PKA/CREB通路，使得Nav1.7表达上调，进而促进TMJ炎性痛。

METTL3通过影响MyD88可变剪接来调控LPS 诱导的人牙髓细胞炎症反应

冯智慧

中山大学光华口腔医学院附属口腔医院

目的: 研究RNA甲基化酶METTL3对LPS诱导的人牙髓细胞炎症反应的调控作用

材料与方法: 1 $\mu\text{g/ml}$ *Pg* LPS处理人牙髓细胞0、3、6、12、24 h, qRT-PCR、western检测LPS刺激前后人牙髓细胞METTL3 mRNA及蛋白表达量的变化。m6A RNA Methylation Quantification Kit检测LPS刺激前后人牙髓细胞m6A修饰水平。蛋白芯片检测敲低METTL3及LPS刺激24h炎症因子表达量的变化, ELISA验证表达有差异的炎症因子, western检测敲低METTL3及LPS刺激前后NK- κ B 和MAPK信号通路。RNA-seq检测敲低METTL3及LPS刺激后mRNA可变剪接体的表达, RT-PCR验证RNA-seq结果。

结果: LPS刺激促进人牙髓细胞m6A及METTL3表达。敲低METTL3及LPS刺激的人牙髓细胞IL-6, IL-8, GRO, Gro- α , RANTES表达明显降低, 抑制NK- κ B 和MAPK信号通路的激活。RNA-seq及RT-PCR结果表明敲低METTL3及LPS刺激后MyD88的一种可变剪接体MyD88S表达量增加。

结论: RNA甲基化酶METTL3通过影响MyD88可变剪接来调控LPS诱导的人牙髓细胞炎症反应

黄连素调控肠道微生物对OVX大鼠牙周炎 病理性骨吸收的治疗作用及机制研究

郑乐铭

口腔疾病研究国家重点实验室 (四川大学),
四川大学华西口腔医院牙体牙髓科

目的: 探索黄连素对雌激素缺乏背景下牙周炎病理性骨吸收的治疗作用与相关机制, 为

绝经后骨质疏松与牙周炎慢性病共同危险因素防控策略提供依据。

材料与amp;方法：本研究将24只10周龄磁性Sd大鼠随机分为A（卵巢切除+牙周炎+去离子水，OVX+Peri+Veh）、B（卵巢切除+牙周炎+黄连素，OVX+Peri+Ber）、C（假手术+牙周炎+去离子水，Sham+Peri+Pro）、D（假手术+牙周炎+黄连素）四组，基线时收集粪便样本，开始Ber/Veh灌胃处理，灌胃2周后行OVX/Sham术，手术3周后采取双侧上颌第一磨牙结扎建立牙周炎模型，建模四周后开始收集粪便、上颌骨、血清和肠道上皮样本。后续评估上颌骨骨量及骨微结构，探明全身及局部免疫状态，分析肠道菌群组成及肠道上皮屏障功能。

结果：通过对OVX及Sham组大鼠牙槽骨的相关组织学研究发现：黄连素处理可以抑制雌激素缺乏导致的牙槽骨吸收与骨微结构的破坏，抑制雌激素缺乏状态下牙槽骨破骨细胞活性，提高成骨活性，从而改善雌激素缺乏所导致的牙槽骨代谢异常。继而对两组大鼠的肠道菌群及肠道黏膜屏障进行了相关分析，发现：黄连素改变里肠道菌群结构和组成，显著增加肠道产丁酸菌丰度和相应的肠道丁酸水平；改善了肠道屏障形态学的完整性，提高了肠道屏障紧密连接蛋白的表达，降低了血清中炎症因子水平。同时，还对大鼠口腔内的菌群进行了分析，证明黄连素官微处理对其牙周菌斑的菌群结构和组成无影响，说明黄连素是作用于肠道菌群以此来改善牙周炎性骨吸收。

结论：肠道菌群失调是雌激素缺乏背景下牙周炎骨吸收的重要因素。黄连素可通过富集肠道产丁酸菌丰度，增加丁酸含量，增强肠道屏障功能，纠正全身及局部炎症状态，抑制雌激素缺乏背景下的牙周炎性吸收。

hh基因的组蛋白二价修饰在牙上皮干细胞命运

选择过程中的作用及机制研究

李飞飞^{1,2}，周雅川¹，皮彩霞¹，余钊源¹，徐欣¹，叶玲¹，周学东¹，郑黎薇^{1,2}

四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室

四川大学华西口腔医院儿童口腔科

目的

组蛋白二价修饰指基因的启动调控区域同时存在H3K4me3及H3K27me3这两种功能相互拮抗的修饰状态。有研究报道，该修饰参与干细胞的干性维持和谱系定向调控。

然而尚未有研究报道组蛋白二价修饰在牙发育,尤其是成釉器发育过程中的作用。因此本研究拟探究组蛋白二价修饰在牙上皮干细胞(DESCs)命运选择过程中的作用及机制。

材料与方法

小鼠切牙终生萌出,且存在定位明确的牙上皮干细胞龛,是研究干细胞理想模型。本研究利用小鼠切牙模型,通过机械分离取得处于命运选择不同阶段的牙上皮组织。此外,我们分离切牙上皮干细胞龛,即唇侧颈环,并培养、鉴定DESCs。然后通过BMP4诱导DESCs成釉向分化,并用IF, IHC, RT-qPCR, WB等分子生物学技术检测DESCs成釉向分化过程中组蛋白二价修饰的时空改变,筛选关键组蛋白修饰酶。同时,利用ChIP-qPCR检测体内、外成釉分化过程中Shh启动调控区域的组蛋白二价修饰改变。最后通过siRNA及腺病毒转染干预关键组蛋白修饰酶,利用RT-qPCR, WB, ChIP-qPCR验证该组蛋白修饰酶调控Shh表达的作用及机制。

结果

我们发现在DESCs命运选择过程中存在组蛋白二价修饰状态的改变,尤其以H3K27me3的改变较为显著。H3K27me3在暂时性扩增细胞(TA)及前成釉细胞(PAB)显著减弱,而Ezh2介导上述过程。敲低Ezh2后,DESCs的干性指标Sox2下降,而成釉向分化基因Amelx表达增强。Ezh2过表达后,DESCs干性未出现显著改变,而成釉向分化受到抑制。进一步机制研究发现,Ezh2通过介导Shh启动子区域H3K27me3的形成,从而调控Shh的表达及其下游的Ptch1/Gli1信号通路,且这种调控作用是甲基转移酶活性依赖的。体外实验结果证明,敲低Ezh2可导致Shh/Ptch1/Gli1信号通路激活,Gli1与Amelx启动子结合上升;相反,过表达Ezh2可抑制Shh/Ptch1/Gli1信号通路,导致Gli1与Amelx启动子结合下降。体内实验结果证明,在TA及PAB区域,组蛋白二价修饰介导Shh转录激活,引起Ptch1/Gli1信号通路活化,使Gli1与Amelx启动子结合上升,从而促进DESCs成釉向谱系定向分化。

结论

Ezh2介导的组蛋白二价修饰通过Shh/Ptch1/Gli1信号通路调控DESCs命运选择。

探究DNA四面体纳米材料对小鼠神经干细胞生物学行为的影响

马文娟, 战雨汐, 张雨欣, 毛陈晨, 邵晓茹, 谢雪萍, 林云锋
四川大学华西口腔医学院

目的:

探究DNA四面体纳米材料 (TDNs) 对小鼠神经干细胞的增殖、迁移及分化等生物学行为的影响, 进而验证TDNs在神经组织再生修复方面的潜能。

材料与方法:

首先, 通过CCK8实验研究不同浓度TDNs对小鼠神经干细胞增殖的影响, 筛选出药物的最佳浓度, 并使用流式细胞术验证TDNs对小鼠神经干细胞细胞周期的影响, 进一步通过Western Blot及qPCR等技术研究Wnt/ β -catenin信号通路中 β -catenin、Lef-1及Cyclin-D等基因及蛋白的表达的影响。其次, 通过划痕实验、transwell实验验证TDNs对小鼠神经干细胞的迁移作用的影响, 并进一步通过Western Blot及qPCR等技术研究RHOA/ROCK2信号通路中RhoA、Rock及Vinculin等基因及蛋白的表达的影响。最后, 经诱导分化后, 通过免疫荧光、Western Blot及qPCR等技术, 研究TDNs对小鼠神经干细胞分化的影响, 并进一步通过Western Blot及qPCR等技术研究对Notch信号通路中Notch-1、Hes-1及Hes-5等基因及蛋白的表达的影响。

结果:

- 1、TDNs对神经干细胞发挥作用的最佳浓度是250 nM。
- 2、CCK8实验证明TDNs可促进小鼠神经干细胞增殖, 流式细胞术验证TDNs可以促进小鼠神经干细胞的S期细胞比例进而促进神经干细胞增殖。此外, TDNs可以激活Wnt/ β -catenin信号通路中 β -catenin、Lef-1及Cyclin-D等基因及蛋白的表达。
- 3、划痕实验、transwell实验证明TDNs可促进小鼠神经干细胞的迁移, 且TDNs可以激活RHOA/ROCK2信号通路中RhoA、Rock及Vinculin等基因及蛋白的表达。
- 4、免疫光技术、Western Blot及qPCR等实验证明TDNs可以促进 β -III-tubulin的基因及蛋白的表达。此外, TDNs可以抑制Notch信号通路中Notch-1、Hes-1及Hes-5等基因及蛋白的表达。

结论:

TDNs对小鼠神经干细胞的最佳浓度是250 nM。TDNs可通过: (1) 激活Wnt/ β -catenin信号通路促进小鼠神经干细胞的增殖; (2) 激活RHOA/ROCK2信号通路促进小鼠神经干细胞的迁移; (3) 抑制Notch信号通路促进小鼠神经干细胞的神经元向分化。因此, TDNs在神经组织的再生修复中具有优异的潜能。

低氧诱导因子-1 α 通过Noggin影响牙周膜干细胞的成骨分化

刘志华

陆军军医大学大坪医院口腔科

目的: 牙周炎微环境伴随氧含量的降低, 低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是体内主要的应对低氧的转录因子。本实验探讨HIF-1 α 是否可通过调控Noggin (骨形成蛋白的抑制因子) 的表达来干扰牙周膜干细胞 (PDLSCs) 的成骨分化。

材料与方法: 首先培养及鉴定人牙PDLSCs。构建低氧 (3%) 环境, 以低氧处理PDLSCs后, 提取常氧及低氧的PDLSCs mRNA进行测序, 从中筛查出与成骨相关的差异表达基因NOG, 通过实时定量qPCR及Western blot验证NOG在PDLSCs中的表达。随后, 在PDLSCs成骨分化过程中检测HIF-1 α 与NOG的表达变化特点。为了明确HIF-1 α 与Noggin蛋白的调控关系, 分别以二氯化钴 (CoCl_2 , HIF-1 α 的激动剂) 与可溶性鸟苷酸环化酶激活剂 (YC-1, HIF-1 α 的抑制剂) 处理PDLSCs, 并以NOG siRNA、重组人Noggin处理PDLSCs, 通过qPCR及Western blot检测HIF-1 α 与Noggin的表达。进一步, 通过调控HIF-1 α 与Noggin, 对PDLSCs进行成骨诱导, 检测其成骨分化能力的变化, 并通过Western blot检测这一过程中HIF-1 α 与Noggin的变化特点。

结果: 所培养的人牙周膜细胞具有干细胞的多向分化能力, 间充质干细胞表面标志物阳性、造血干细胞表面标志物阴性。mRNA测序发现, 经低氧 (3%) 处理6小时后, PDLSCs中114种基因表达增加、42种基因表达减少, 其中与成骨相关的基因NOG表达增加, 而 CoCl_2 模拟的低氧微环境可造成PDLSCs中的Noggin蛋白表达增加。在PDLSCs成骨分化过程中, 成骨相关基因ALP、RUNX2、BMP2、OCN的表达呈现不同的增加趋势, HIF-1 α 与Noggin的基因表达也呈增加的趋势。进一步的研究发现, CoCl_2 处理PDLSCs后HIF-1 α 的表达增加, Noggin的表达增加。YC-1处理PDLSCs后, HIF-1 α 的表达减少, Noggin的表达减少。而通过NOG siRNA或重组人Noggin处理PDLSCs, Noggin的表达减少或增加, 而HIF-1 α 的表达不变。更进一步, 通过增加PDLSCs成骨诱导过程中HIF-1 α 或Noggin的表达, 发现钙化结节减少, 而在 CoCl_2 模拟的低氧微环境下的PDLSCs成骨诱导过程中, HIF-1 α 、Noggin的表达被检测到增加。此外, 在PDLSCs成骨诱导过程中, 通过YC-1减少HIF-1 α 的表达后发现钙化结节的形态及量也发生了变化。

结论: 本实验发现, 低氧可引起PDLSCs中Noggin的表达增加, HIF-1 α 可通过调控Noggin的表达干扰PDLSCs的成骨分化。

氧化石墨烯量子点通过ROS途径诱导人牙髓干细胞

成牙本质细胞向分化及细胞迁移

李欣聪¹, 禹怡君¹, 马兰¹, 任双双², 范瑞瑞², 苗雷英^{1*}

1. 南京大学医学院附属口腔医院牙体牙髓病科;
2. 南京大学医学院附属口腔医院牙周病科

摘要

作为一种重要的降解和循环系统, 自噬在调节干细胞分化中起着至关重要的作用。我们之前的研究表明氧化石墨烯量子点 (GOQDs) 是一种强大的干细胞生物标记剂, 在人牙髓干细胞(hDPSCs)的体外标记中几乎不存在细胞毒性。我们研究了GOQDs在自噬中的作用以及自噬在调节hDPSCs的迁移和成牙本质细胞向分化中的作用。进行透射电子显微镜检查, 免疫荧光染色和蛋白质免疫印迹法以评估hDPSCs的自噬活性;进行细胞迁移试验, 碱性磷酸酶染色和活性试验, 茜素红染色和实时定量荧光PCR检测以研究hDPSCs的迁移和成牙本质细胞向分化;检测活性氧 (ROS) 水平和ROS清除剂在自噬诱导中的作用。自噬抑制剂 (3-MA和巴弗洛霉素A1) 和携带Beclin1 shRNA序列的慢病毒载体用于自噬抑制。早期暴露于GOQDs促进了hDPSCs的成牙本质细胞向分化并提高了自噬活性。自噬抑制剂作用可抑制GOQDs诱导hDPSCs细胞迁移作用和成牙本质细胞向分化作用。此外, GOQDs作用可以部分通过缺氧诱导因子1 α / B细胞淋巴瘤2 / 腺病毒E1B 19K相互作用蛋白3 (HIF-1 α / BNIP3) 途径以ROS依赖性方式诱导自噬。研究表明GOQDs诱导hDPSCs细胞迁移和分化, 这可能通过ROS途径诱导的自噬来调节。

目的: 氧化石墨烯量子点 (GOQDs) 在人牙髓干细胞 (hDPSCs) 自噬中的作用以及自噬在调节hDPSCs的迁移和成牙本质细胞向分化中的作用

材料与方法: 氧化石墨烯量子点与人牙髓干细胞

1. 进行透射电子显微镜检查, 免疫荧光染色和蛋白质免疫印迹法以评估hDPSCs的自噬活性;
2. 进行细胞迁移试验, 碱性磷酸酶染色和活性试验, 茜素红染色和实时定量荧光PCR检测以研究hDPSCs的迁移和成牙本质细胞向分化;
3. 检测活性氧 (ROS) 水平和ROS清除剂在自噬诱导中的作用。

结果: 早期暴露于GOQDs促进了hDPSCs的成牙本质细胞向分化并提高了自噬活性。自噬抑制剂作用可抑制GOQDs诱导hDPSCs细胞迁移作用和成牙本质细胞向分化作用。此外, GOQDs作用可以部分通过缺氧诱导因子1 α / B细胞淋巴瘤2 /腺病毒E1B 19K

相互作用蛋白3 (HIF-1 α / BNIP3) 途径以ROS依赖性方式诱导自噬。

结论: 研究表明GOQDs诱导hDPSCs细胞迁移和分化, 这可能通过ROS诱导的自噬来调节。

变异链球菌耐氟性分子机制初探

廖莹^{1,2,3}, Bernd Brandt³, 李继遥², Wim Crielaard³, Cor van Loveren³, Dongmei Deng³

1. 南京大学医学院附属口腔医院2. 四川大学华西口腔医学院3. 荷兰阿姆斯特丹口腔医学中心 (ACTA)

目的: 氟化物在口腔临床的应用已超过五十年, 虽然氟化物可有效防龋, 但是长时间大量使用可能会导致口腔变异链球菌耐氟性的产生。前期对于这一现象机制的研究中未发现任何与耐氟性直接相关的染色体变异。本课题拟通过全基因组测序、转基因生物信息学分析及分子生物学相关技术, 筛选并验证与变链耐氟性相关的基因型变异, 探究变链耐氟性机制。

材料与方法: 利用全基因组鸟枪测序 (WGS) 技术和生物信息学分析, 识别耐氟变链C180-2FR基因组中单核苷酸多态性 (SNP); 通过实时定量PCR检测, 比较该耐氟菌株及其亲本菌株C180-2中与SNP相关的基因表达; 利用定向基因突变技术, 构建仅含目标突变位点 *mutp*-44A \rightarrow C的变链突变株; 通过检测突变株在含不同浓度氟化物环境中的生长和产酸情况, 研究其相对于野生株的耐氟性表型; 通过实时定量PCR进行基因表达分析, 验证点突变与耐氟性之间的关系。

结果: 耐氟变链C180-2FR基因组中共发现8个SNP, 其中6个位于基因编码区域, 2个位于基因间区域; 基因表达检测发现含SNP的基因间区域 (启动子) *mutp*的下游基因在C180-2FR中的表达显著高于野生株C180-2; 文献回顾证实下游基因 *perA*和 *perB* 编码氟转运体蛋白, 负责F⁻从胞内向胞外的转运; 基于变链野生株UA159, 引入定向突变 *mutp*-44A \rightarrow C, 成功构建变链突变株UF35; 表型实验显示UF35相比野生株可在更高浓度的氟化物环境中生长; UF35在中性 (pH 7.0) 与酸性 (pH 5.5) 含氟环境中的产酸能力均显著强于野生株; 基因表达检测证实UF35中 *mutp*下游基因表达显著高于野生株UA159。

结论: 变链耐氟性的产生是染色体变异的结果; 位于启动子 *mutp*-35因子内的突变可上调启动子活性, 使DNA链与RNA聚合酶结合力上升, 从而促进下游氟转运体编码基因转录, 加快F⁻外排, 维持细胞内F⁻的低浓度, 使变链细胞产生耐氟性。

内皮祖细胞通过HIF-1-EPO通路实现血管/骨重塑

禹怡君, 刘超, 苗雷英*
南京大学医学院附属口腔医院

目的: 由多种原因造成的骨缺损问题十分棘手, 研究其病理过程及修复方法显得极为重要。因此, 本篇着眼于研究缺氧微环境对内皮祖细胞及骨髓基质细胞的影响, 并且研究体外应用EPO产生的促进成骨和成血管的效果。

材料与方法: 在低氧和常氧环境下培养内皮祖细胞和骨髓基质细胞, 通过Western blot和Q-PCR的方法在不同时间点检测关键分子: HIF-1, VEGF以及EPO的表达。分别应用siRNA和HIF-1抑制剂2ME2来抑制HIF-1, 并研究VEGF和EPO随之发生的改变。在常氧培养条件下, 应用rhEPO处理内皮祖细胞和骨髓基质细胞, 研究rhEPO对成骨(BMP2, ALP)及成血管相关基因(VEGF, bFGF, eNOS)的表达的作用。

结果: 在低氧环境下, HIF-1的表达较常氧环境下显著升高, VEGF的表达受HIF-1调控, 变化与HIF-1表达保持一致。在6h开始, EPO的mRNA表达随着HIF-1受抑制而下调, 但蛋白水平的改变从12h表现出来。从12h之后, EPO随着HIF-1表达下调而下调, 该表现持续到检测最终时间48h。在常氧条件下, 使用rhEPO处理EPC和ST2细胞, 发现EPO可通过促进有丝分裂而促进EPC和ST2细胞增殖, 但不影响两种细胞的凋亡。而且使用EPO处理后, 上调了EPC和ST2细胞的BMP2, ALP, VEGF, bFGF, eNOS的表达, 采用茜素红染色ST2细胞, 发现矿化结节增多。

结论: 在EPC和ST2细胞中EPO表达均受到HIF-1表达的调控, EPO可促进成骨分化和成血管分化, 在促进骨再生方面非常有应用前景。

miR-876-5p通过调节波形蛋白(vimentin)的表达调控

头颈鳞癌细胞的侵袭和转移

目的: MicroRNA是能够调节大量生物学进程的一类非编码单链小RNA, 肿瘤的发生和发展与miRNA异常表达息息相关。在HNSCC中存在miRNA的异常表达, 并与肿瘤的增殖, 侵袭, 转移等诸多生物学行为紧密相关, 在HNSCC中发挥着至关重要的作用。然而, 并没有相关研究报道关于miR-876-5p在HNSCC中的作用机制。我们的研究致力于探究miR-876-5p在头颈鳞癌发生中的潜在作用机制。

材料与amp;方法: 划痕和侵袭实验研究miR-876-5p对HNSCC细胞迁移和侵袭能力的调节。QRT-PCR, 免疫印迹, 免疫荧光用于分析检测miR-876-5p在HNSCC细胞中对vimentin的调节影响。使用qRT-PCR分别测定有无区域淋巴结转移的HNSCC标本之间的miR-876-5p表达水平。双荧光实验验证miR-876-5p与靶基因波形蛋白(vimentin)的直接结合。通过单独转染和共转染miR-876-5p模拟物及过表达vimentin两种质粒进行功能回复表型实验, 验证在miR-876-5p是通过直接作用靶基因vimentin调节HNSCC细胞的迁移和侵袭能力。建立裸鼠皮下成瘤动物模型, 研究miR-876-5p在体内调节vimentin的表达情况, 建立裸鼠尾静脉注射转移动物模型, 验证miR-876-5p在体内对HNSCC细胞的侵袭转移能力影响。

结果: 与对照组相比, miR-876-5p模拟物能明显抑制HNSCC细胞的迁移和侵袭能力。并且我们发现, 相对于各自对照组, miR-876-5p模拟物组中, vimentin蛋白和mRNA水平明显降低, 而在miR-876-5p抑制剂组中升高, 这表明miR-876-5p在HNSCC细胞中抑制vimentin基因的表达。双荧光素酶报告基因检测实验验证了vimentin是miR-876-5p的功能性下游靶标。功能回复实验显示, 过表达vimentin和miR-876-5p分别能够促进和抑制HNSCC细胞迁移和侵袭能力, 然而将miR-876-5p模拟物和vimentin共转染能够将HNSCC细胞迁移和侵袭能力恢复到初始水平。综上所述, 我们认为miR-876-5p是通过作用靶基因vimentin调节HNSCC细胞的迁移和侵袭能力。通过裸鼠皮下成瘤实验验证miR-876-5p能减少瘤体内vimentin的表达量, 尾静脉注射肝转移实验证明miR-876-5p能够抑制HNSCC细胞的转移和侵袭能力。

结论: miR-876-5p通过直接作用靶基因vimentin进而调节HNSCC细胞的转移和侵袭能力。

Hippo通路TAZ-TEAD4轴调控SOX2机制研究

李晋

南京医科大学口腔医学院

目的: 探索Hippo通路TAZ-TEAD4轴调控干性调控相关分子SOX2相关机制, 从而为抗肿瘤治疗提供新的靶点和理论基础。

材料与方法: 1、利用流式细胞分选对头颈鳞癌细胞系进行CD44/CD133双色分析, 筛选出双阳性及双阴性的细胞亚群。筛选细胞亚群分别于体外行成球培养, 培养所得部分肿瘤球行CD44/CD133/DAPI免疫荧光染色验证筛选有效性, 另一部分提取蛋白, WB验证分选细胞亚群形成肿瘤球中TAZ和SOX2表达水平。3、利用慢病毒分别干扰和过表达头颈鳞癌细胞系内TAZ基因表达, WB验证SOX2及TAZ蛋白表达水平。4、应用免疫荧光方式对头颈鳞癌细胞系内TAZ与SOX2蛋白表达情况进行验证, 探究两种蛋白的细胞定位模式。5、收集头颈鳞癌患者病理标本, 并在知情同意及伦理委员会允许的情况下, 应用免疫组织化学染色检测TAZ与SOX2在头颈鳞癌组织中的表达水平。6、利用免疫共沉淀的方式验证内源性TAZ和TEAD4之间结合关系。7、利用NCBI、GeneBank等数据库检索SOX2基因的启动子区(1000bp)并以此区域设计突变, 将SOX2启动子区和突变启动子区分别构建双荧光素酶报告质粒, 利用HEK293T细胞将SOX2启动子区质粒与不同浓度的TEAD4过表达质粒共转染, 验证TEAD4是否参与SOX2基因的调控, 另将SOX2启动子区质粒或其突变质粒分别与TAZ和TEAD4进行共转染, 进一步探究TAZ和TEAD4对SOX2基因的调控中发挥的作用。

结果: 1、WB验证了在肿瘤干细胞(CD44CD133双阳性)中TAZ和SOX2的表达水平均高于非肿瘤干细胞, 慢病毒转染细胞系WB证明TAZ和SOX2存在联动效应。2、免疫组化及免疫荧光结果显示TAZ和SOX2核定位。3、免疫共沉淀及双荧光实验证实TAZ与TEAD4共同参与SOX2启动子区调控。

结论: TAZ-TEAD4复合物在细胞核内与SOX2启动子区结合, 启动SOX2的转录过程, 提示TAZ-TEAD4轴对头颈鳞癌治疗来说可能是潜在的分子标志物和靶向治疗目标。

担载氯己定的可降解纳米抗菌剂抑制口腔细菌生物膜形成的研究

路萌萌

目的：生物膜是口腔内细菌生存的主要形式，亦是促进牙周炎发生、发展的重要介质。虽然氯己定（Chlorhexidine, CHX）联合纳米银具有一定的抗生物膜作用，但联合给药具有靶向性差、毒副作用大等缺点，限制其临床应用。因此，本研究根据口腔生物膜的酸性和氧化还原微环境等特征，构筑出一种环境响应型药物递送系统以共载氯己定和纳米银，实现两药在生物膜微环境的精准释放，提高联合治疗效果并降低毒副作用。

材料与方法：采用一体化溶胶-凝胶法制备出纳米银掺杂的介孔二氧化硅纳米粒子（Ag-MSNs）并担载CHX，随后进行相关形貌、降解性能和释药趋势等性能的表征。以变形链球菌为研究对象，通过液体培养、平板培养和生物膜形成实验检测Ag-MSNs@CHX的抗菌和抗生物膜作用，利用激光共聚焦扫描显微镜和扫描电子显微镜进一步观察变形链球菌生物膜对Ag-MSNs@CHX的抑制作用。最后利用口腔上皮细胞和ICR小鼠模型，通过MTS法，相关生物因子检测试剂盒和HE染色法系统性评价Ag-MSNs@CHX的生物安全性。

结果：Ag-MSNs为在纳米尺度上精确可控的球状均一粒子，其可在GSH条件下快速降解，担载CHX后在低pH和高GSH条件下，CHX和银离子的释放量和释放速率均显著高于中性pH和低GSH条件。Ag-MSNs@CHX可剂量依赖性的抑制变形链球菌的生长和其生物膜形成，且其具备比Ag-MSNs或CHX更强而持久的抗生物膜形成作用。Ag-MSNs可减轻CHX对口腔上皮细胞的毒性作用，且口服暴露对受试小鼠血液学、血清生化学和组织形态学等指标无显著影响。

结论：本研究通过构筑生物可降解介孔二氧化硅纳米粒子实现了纳米银和CHX的共载，该纳米杀菌剂pH/GSH响应性的释放CHX和银离子，从而实现了对变形链球菌和的联合抗菌和抗生物膜形成的作用，并在体内外具备了较好的生物相容性。不仅为开发简便低廉、高效低毒的抗菌材料提供新思路，亦为联合银粒子和氯己定抗口腔生物膜的策略提供新材料。

主穹隆蛋白（MVP）调控破骨细胞的作用机制

袁礼婵，赵娜，郭舒瑜，马俊青*
南京医科大学口腔医学院

目的:

建立主穹隆蛋白 (MVP) 基因敲除的小鼠模型, 探究MVP在小鼠骨重塑中的作用及相关机制。

材料方法:

人骨肉瘤、骨巨细胞瘤标本组化观测MVP表达。培育MVP全基因敲除小鼠 (MVP^{-/-}, KO) 和MVP破骨细胞特异性敲除小鼠 (MVP^{fl/fl}LysM-Cre, CKO), micro-CT观察8周龄小鼠骨量的改变, 组化染色观察成骨、破骨细胞的变化。体外分离培养诱导破骨细胞, 细胞化学染色观察破骨细胞数量及细胞骨架的改变。RNA-Seq筛选MVP敲低后影响的下游靶基因, 选择CXCR5进行MVP结合位点的验证。斑马鱼中显微注射MVP的morpholino, 敲低MVP, 同时与CXCR5的mRNA共注射, 观测斑马鱼表型。

结果:

在骨改建活跃的骨肉瘤、骨巨细胞瘤所形成的破骨细胞样多核巨细胞中, MVP免疫组化阳性与TRAP阳性共定位, 提示MVP和破骨细胞间存在潜在的联系。micro-CT显示, MVP敲除小鼠 (KO) 股骨骨量下降, 其松质骨骨密度下降尤为显著, 骨组织三色染色、TRAP染色等显示KO组成骨细胞无明显变化, 破骨细胞功能增强, 钙黄绿素-茜素红体内荧光标记从动态组织学上说明了KO小鼠新生矿物质沉积率无明显变化。由此推断MVP主要通过影响破骨细胞功能调控骨改建, 其对成骨细胞的影响较小。于是培育MVP破骨细胞系特异性敲除小鼠 (CKO) 进一步探究。micro-CT及HE染色示, CKO同样股骨骨量下降伴骨小梁稀疏, 组织学TRAP染色示体内破骨细胞数量下降。细胞TRAP染色及鬼笔环肽染色显示, CKO形成的破骨细胞体积大, 细胞核数量多, 且有大量的肌动蛋白环 (actin ring) 结构形成。Western Blot显示, MVP的敲除促进了破骨细胞调节基因 (c-fos, Nfatc1, pu.1) 和功能基因 (Ctsk) 的表达。RNA-Seq技术比较对照组和CKO基因转录组, 筛选上调的CXCR5基因进一步研究。斑马鱼中敲低MVP后, 下颌骨骨密度下降, 且CXCR5的原位杂交显示MVP敲低后CXCR5的表达升高。

结论:

主穹隆蛋白 (MVP) 抑制破骨细胞的分化及功能, 在骨改建中起到重要作用。

M1型巨噬细胞激活AP1-IL6促牙周炎骨破坏的研究

朱丽芳 潘璐 李璐 刘来奎 徐艳*

摘要

目的: 构建牙周炎模型, 探讨M1/M2型巨噬细胞在牙周炎骨破坏中的作用及可能机制, 为牙周炎的临床治疗及预防提供新的实验和理论基础。

材料与方法: 构建小鼠牙周炎模型, 采用Micro CT对模型进行检测, 并通过HE染色和Masson三色染色检测骨组织破坏情况。HE染色和免疫组化检测牙周M1型和M2型巨噬细胞浸润情况。体外利用骨髓单核细胞诱导分化获得M1型和M2型巨噬细胞, 将其上清刺激成骨细胞MC-3T3 E1, 检测RUNX2, OPN, OCN的表达水平, 分析ALP活性和染色, 并通过RNA-seq和生物信息学比对筛查, 分析M1/M2型巨噬细胞在牙周炎骨破坏中的可能作用机制, 通过Western blotting 进行验证, 最后将M1型和M2型巨噬细胞上清分别刺激破骨细胞, 分析其对破骨细胞形成能力的影响。

结果: 采用丝线结扎野生型小鼠右侧第二磨牙, 结扎侧为实验组, 对侧为对照组, Micro CT示实验组较对照组牙槽骨吸收明显, 通过软件分析发现对照组中结构模型指数, 骨小梁分离度明显下降, 而在实验组中骨密度, 骨体积分数, 骨小梁厚度, 骨小梁数目明显下降。通过Masson三色和TRAP染色表明实验组中牙槽骨量减少, 骨吸收边缘可见大量的破骨细胞浸润。HE染色和免疫组化进一步发现, 牙周组织中纤维排列紊乱, 牙槽骨吸收表面可见大量的巨噬细胞浸润, 这些巨噬细胞高表达CD86和CD163。由此可见, M1型和M2型巨噬细胞在牙周炎骨破坏中发挥了重要作用。在体外实验中, 提取骨髓单核细胞将其诱导分化为M1型和M2型巨噬细胞, 并对其表型进行鉴定。将其上清分别刺激成骨细胞MC-3T3发现, RUNX2, OPN, OCN的表达水平下降, ALP 活性和染色降低, 其中M1发挥的作用更为明显, 通过RNA-seq和Western blotting进一步研究发现M1型巨噬细胞通过激活AP1, 上调IL6的表达在骨破坏中发挥作用, 并且激活了NFATc1的表达, 通过TRAP染色和免疫荧光发现, M1型巨噬细胞更能促进破骨细胞形成。

结论: 巨噬细胞在牙周炎骨破坏中发挥着重要作用, 其中M1型巨噬细胞通过激活AP1-IL6在骨破坏中发挥的作用更为明显。

唑来膦酸通过TLR-4介导的M1巨噬细胞极化来参与 双磷酸盐相关颌骨骨坏死的发病机制探究

朱伟文

南京医科大学口腔医学院

摘要

目的: 双膦酸盐颌骨坏死 (BRONJ) 是以下颌好发的由于注射双膦酸盐类药物而导致的拔牙创延迟愈合的并发症, 目前其发病机理尚缺乏研究, 并且暂无有效的治疗方法。通过建立BRONJ小鼠模型来寻找一种可能的BRONJ发病机制并且研究可行的BRONJ治疗方法或对BRONJ的治疗提供重要帮助。

材料与方法: 通过建立野生型以及TLR-4敲出小鼠BRONJ模型以探究BRONJ小鼠颌骨拔牙创巨噬细胞极化转化, 以及对拔牙创骨愈合CT评估来判断BRONJ小鼠发病状况; 在通过对体外培养的骨髓巨噬细胞表面流式细胞检测来判断其极性转化。

结果: 通过检测骨髓巨噬细胞的极性我们发现, 唑来膦酸可导致巨噬细胞M1极化。但在TLR-4敲出小鼠的骨髓巨噬细胞中我们并没有发现其M1极化的现象; 通过对野生型小鼠以及TLR-4小鼠注射唑来膦酸我们发现TLR-4小鼠的骨愈合明显好于野生型小鼠。

结论: 唑来膦酸通过TLR-4来促进了M1巨噬细胞的极化, 并且借此参与了BRONJ的发病。

敲低YY1通过蛋白磷酸酶2A介导的AKT T308位点 去磷酸化增强顺铂抗肿瘤作用

甘业华 赵璐

北京大学口腔医学院 *青岛市市立医院

目的:

顺铂是头颈部鳞癌一线化疗药物, 而获得性耐药是导致临床化疗失败主要原因之一。因此, 探讨顺铂耐药机制, 并寻找可增强顺铂抗肿瘤作用的联合用药方案及靶点, 具有迫切的临床需求。目前, 多种机制被认为参与鳞癌细胞顺铂耐药机制, 其中AKT过度活化被认为是顺铂耐药的重要原因之一, 然其具体机制仍不清楚。

转录因子YingYang1 (YY1) 与肿瘤发生发展密切相关。敲低YY1可逆转肿瘤细胞对

化疗药物的耐受。且YY1可通过mTORC2介导AKT S473位点磷酸化，而与AKT T308磷酸化位点的关系，尚未有报道。

丝/苏氨酸磷酸酶Protein phosphatase 2A (PP2A) 负责调控AKT的T308位点去磷酸化。PP2A全酶为异源三聚体，其中，催化亚基C代表了PP2A磷酸酶活性。催化亚基C含有 α 和 β 两个亚型， α 亚型由protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha (PPP2CA) 基因编码。PP2A磷酸酶活性缺失可导致肿瘤细胞对顺铂抵抗，提示PP2A亦可能参与AKT介导的顺铂耐药。

本研究发现YY1/PP2A/AKT信号通路参与介导顺铂耐药机制，为临床开发新的顺铂联合化疗方案及用药靶点提供实验依据。

材料与方**法**：

在三种口腔癌细胞中，应用慢病毒敲低YY1后与顺铂联合处理细胞，CCK-8法，DAPI染色法，transwell迁移及侵袭法，裸鼠成瘤实验验证敲低YY1与顺铂联合协同抑制肿瘤生长作用；realtime PCR法检测舌癌及癌旁组织中YY1 mRNA表达差异；应用AKT T308 位点磷酸化及去磷酸化特异性抑制剂及激动剂别与顺铂联合处理舌癌细胞，CCK8检测细胞增殖；磷酸酶免疫沉淀分析、realtime PCR及Western blot检测PP2A磷酸酶活性及PPP2CA mRNA及蛋白表达；荧光素报告基因方法、ChIP及DAPA实验验证 YY1是否结合于PPP2CA启动子并调控PPP2CA启动子活性。

结果：

敲低YY1可增强顺铂抗肿瘤作用；YY1在舌癌组织中较癌旁组织高表达；顺铂上调YY1的mRNA及蛋白表达、以及AKT磷酸化；顺铂耐药依赖于AKT的T308磷酸化；YY1通过结合到PPP2CA启动子抑制PPP2CA表达从而下调PP2A磷酸酶活性进而上调T308磷酸化。

结论：

敲低YY1通过上调PP2A活性促进AKT T308去磷酸化增强口腔癌细胞对顺铂的敏感性。

表皮生长因子EGF通过调控MAPK通路 促进MSCs迁移趋化及成骨-成神经转分化功能

曹杨杨，王立平，范志朋*

目的: 口腔临床组织再生修复关键问题之一是对不同修复阶段中缺损软硬组织再生的平衡和选择。作为对特定信号(组织损伤)的响应, 间充质干细胞(MSCs)可“转分化”为其他生发层细胞类型, 使得MSCs适应和创造利于组织修复的微环境。这一过程中, MSCs得以发挥良好再生潜能的基础是其向炎症缺损等特定靶位点的迁移趋化过程, 并借助其自/旁分泌调控机制完成对自/异体MSCs的募集和调动。EGF作为表皮生长因子EGF家族重要成员, 可激活酪氨酸激酶信号网络, 参与机体创伤修复过程。本研究旨在明确EGF对MSCs迁移/归巢能力和转分化功能的调控作用, 探究EGF对MSCs功能调控的可能机制, 并发现可能的关键调控细胞因子和关键效应靶点。

材料与方法: EGF慢病毒shRNA敲低人脂肪间充质干细胞(ADSCs)内EGF的表达, 重组人EGF蛋白(rhEGF)进行功能获得性实验; 体外划痕和Transwell实验检测迁移趋化能力; 体外成骨、成神经分化诱导实验观察成骨向、成神经向分化功能; Western blot检测ADSCs内信号分子的表达。

结果: 敲低EGF抑制ADSCs体外迁移趋化能力和成骨向分化能力, 促进ADSCs体外成神经向分化能力。rhEGF能有效挽救敲低EGF对ADSCs体外迁移趋化能力和成骨向、成神经向分化能力的影响。Western blot结果显示EGF激活ADSCs内p38 MAPK、JNK和ErK1/2信号通路; EGF激活p38 MAPK依赖于其激活JNK或ErK1/2信号通路。进一步, p38 MAPK特异抑制剂(SB203580)、JNK特异抑制剂(SP600125)、ErK1/2特异抑制剂(PD98059)能分别有效阻断rhEGF对ADSCs体外迁移趋化能力和成骨向、成神经向分化能力的挽救作用。

结论: 本研究发现EGF通过激活MAPK信号通路促进MSCs迁移/归巢能力和成骨-成神经转分化功能; 其中, p38 MAPK作为一个关键调控靶点参与这一调控过程; 阐明了MSCs迁移趋化及转分化过程中潜在的分子机制, 为临床条件下选择和平衡损伤组织的靶向再生提供了理论依据和候选靶点。

透明质酸和壳聚糖层层自组装负载淫羊藿苷加载在变性溶菌酶预处理钛表面的实验研究

宋云嘉, 马奥博, 李莺*, 张旭, 李长义*

目的: 作为牙列缺损修复治疗的有效手段, 种植义齿修复由于生物惰性而影响了其早期骨结合和稳定性。为了加快种植体与骨组织的早期骨整合, 本研究在钛表面进行变性溶菌酶预处理, 然后通过透明质酸和壳聚糖层层自组装加载淫羊藿苷。研究涂层对淫羊藿苷的缓释作用, 并进一步研究该新型表面改性方法的细胞反应和对动物体内骨整合的影响。

材料与方法: 在变性溶菌酶预处理钛表面制备经由透明质酸和壳聚糖层层自组装负载淫羊藿苷的涂层, 通过扫描电镜 (SEM) 和X射线光电子能谱分析 (XPS) 进行表面形貌和成分的特征。采用高效液相色谱分析淫羊藿苷释放规律。通过体外细胞实验观察涂层对成骨细胞的粘附、增殖和分化的作用; 经由大鼠体内动物实验检测涂层对骨结合的作用。

结果: SEM和XPS结果证实了涂层的成功制备, 药物释放检测提示涂层可以实现淫羊藿苷在种植体表面在两周的时间内缓释, 同时达到有效药物浓度。细胞实验显示, 与光滑钛片相比, MC3T3-E1细胞在加载淫羊藿苷涂层的钛表面表现出更好的粘附和增殖效果。此外, 碱性磷酸酶结果显示, 加载淫羊藿苷的钛片具有更强的促进成骨细胞成骨向分化的能力。在动物实验中, 双荧光染色、HE和Masson等染色结果均显示, 与光滑表面的种植体相比, 加载淫羊藿苷的钛种植体周围可见有更多的新骨生成。

结论: 本研究证明, 在变性溶菌酶预处理过的钛表面通过层层自组装技术可以有效的装载淫羊藿苷, 并且淫羊藿苷可以在早期成骨阶段达到缓释效果。该新型涂层可以促进成骨细胞的粘附、增殖及分化和体内早期的骨结合。本研究为种植体表面改性提供了一种新型绿色的促进骨结合药物的加载方法。

牙周膜成纤维细胞外泌体递送骨保护素对 正畸牙根吸收的作用及机制研究

刘蒙蒙 王云飞 隋昕 程抒华 尹悦 张旗
同济大学附属口腔医院 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心

目的:

正畸牙根吸收可引起牙齿脱落,尚无有效防治方法。骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 在牙周膜微环境发挥重要牙根保护作用。作为分泌型蛋白,外泌体是其分泌方式之一。但是,正畸牙根吸收微环境中OPG的细胞来源、分泌方式及作用机制尚不清楚。本研究拟探讨:①正畸牙根吸收过程中牙周膜OPG表达变化;②牙周膜成纤维细胞OPG表达及分泌方式(外泌体);③外泌体转运OPG对破骨细胞的影响;④外泌体转运OPG对正畸牙根吸收治疗作用。

材料与方法:①利用8周龄野生型小鼠建立正畸牙根吸收模型。建模后7天、14天、21天应用Micro-CT、H&E染色及TRAP染色检测牙根吸收变化,免疫组化检测牙周膜OPG的表达变化。②提取人牙周膜成纤维细胞,免疫荧光检测OPG表达。提取并鉴定牙周膜成纤维细胞外泌体,ELISA检测外泌体内OPG含量。③PKH26荧光标记外泌体与破骨前体细胞共培养,24h后检测破骨细胞摄取外泌体的能力。转染牙周膜成纤维细胞获得沉默及过表达OPG外泌体,与破骨前体细胞共培养,以空载体组外泌体为对照组。共培养9天后TRAP染色、qRT-PCR、骨吸收板及小鼠磨牙共培养检测对破骨细胞分化的作用。④建立正畸牙根吸收模型,牙周局部注射100 μ g OPG过表达外泌体及OPG沉默外泌体,7天后应用免疫荧光检测外泌体分布,14天后检测牙根吸收变化。

结果:①建模后7天未见明显牙根吸收,牙周膜内OPG表达量低于对照组。14天牙根压力侧出现多个吸收陷窝,OPG表达量较7天时明显降低。21天牙根吸收加重,OPG表达量明显下降。②免疫荧光示牙周膜成纤维细胞高表达OPG。ELISA示外泌体含有OPG。③免疫荧光示踪外泌体在破骨前体细胞周围聚集,说明破骨细胞摄取外泌体。TRAP染色等显示OPG过表达外泌体共培养组破骨细胞量显著少于对照组,小鼠磨牙粘附破骨细胞量显著减少,骨吸收板吸收陷窝显著少于对照组 ($P < 0.05$)。④注射过表达OPG外泌体组,正畸牙根吸收陷窝量较对照组明显减少,且外泌体与破骨细胞共定位。

结论:牙周膜成纤维细胞外泌体转运OPG抑制正畸牙根吸收。

细胞纤毛转运蛋白IFT140在跑步过程中的骨形成作用

陶狄珂, 张瑞林, 薛徽, 李功臣, 孙瑶*

目的: 正常的力学刺激对骨组织维持稳态具有重要作用, 而失重、制动等由于骨组织机械刺激的缺乏最终导致废用性骨质疏松的发生。为此, 跑步即为一种有效的预防保健措施, 其作为一种负重的运动方式, 对于骨量维持具有促进作用。在跑步运动过程中, 骨组织受到拉应力, 压应力和流体剪切力的作用, 然而, 骨组织中的细胞是如何响应跑步过程中的机械力作用并将其转化为生物化学信号的过程尚不明确。本研究旨在探究跑步运动过程中的骨组织力学响应和机械转导的方式, 研究跑步促进骨量增加的作用方式, 更好的用于预防废用性骨质疏松的发生。

材料与方法: 采用C57BL/6J野生型8周小鼠进行为期6周的跑台运动, 观察跑步对野生型小鼠骨改建的影响, 对比同龄非运动组, 利用micro-CT分析长骨骨量变化, H&E染色观察长骨形态学变化, IHC及qPCR观察成骨相关基因的表达变化, 荧光双标观察骨沉积率的变化, 验证跑步能否增加长骨骨量以及促进骨量增加的方式。采用转录组测序检测跑步运动对骨组织的生物学作用。利用 *Ift140^{flox/flox}* 小鼠与 *Osx-Cre* 工具鼠杂交, 观察 *Ift140^{flox/flox}/Osx-Cre* 小鼠对跑步刺激的响应能力。

结果: micro-CT分析显示野生型小鼠跑步组相较于非运动组长骨骨体积分数增加44%, 骨形成能力增加。跑步运动引起骨组织中纤毛相关的组装与聚集活动增加, IFT140表达水平升高。 *Ift140^{flox/flox}/Osx-Cre* 小鼠跑步组与非运动组相比骨量变化不明显, 骨形成能力未发生明显变化。

结论: 本研究, 通过构建成骨细胞特异性敲除细胞纤毛转运蛋白IFT140的小鼠模型, 发现敲除IFT140后其对跑步引起机械刺激的响应能力降低, 揭示了IFT140在跑步过程中参与机械刺激转导和骨量维持。

衰老对小鼠窦腔提升的成骨效果影响及机制探究

翁雨藤, 吴迪, 王佐林*

同济大学附属口腔医院, 上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的: 临床上, 上颌后牙区的种植手术常伴有局部可用骨高度不足, 尤其多见于老年患

者，而上颌窦底提升术常用于解决上述问题。骨组织的衰老常表现为骨再生及造血功能的下降，干细胞群的基因表达及表观遗传调控的改变以及局部成骨微环境中激素及生长因子水平的降低。基于之前的研究，衰老降低了骨改建的速率，严重影响了骨组织的创伤后修复过程。作为一种特殊的创伤后愈合过程，衰老对上颌窦提升术后的修复及成骨过程影响及相关机制尚不明确。为了阐明该问题，我们构建了基于年轻及衰老小鼠的窦腔内不植骨单纯提升模型，研究衰老对该手术愈合过程的影响及骨组织再生中的作用机制。

材料与amp;方法：采用2月龄与18月龄C57BL/6小鼠分别代表年轻及衰老小鼠，用微型种植体行双侧鼻底提升手术，于术后3、6、9、14、28天取材，观察各时间点窦腔提升术后年轻与衰老小鼠的局部提升区域组织愈合及骨组织形成情况。利用体视显微镜记录该术式全过程；利用micro-CT评估局部提升区域成骨骨质及骨量；利用H&E、Masson染色观局部骨组织形态学变化、TRAP染色定量局部破骨活性；利用激光显微切割结合微量RNA提取及建库技术，完成各时间点局部提升区域组织RNA测序并进行热图、火山图、KEGG、GO通路等分析，并筛选相关的作用基因；利用IHC及IF观察成骨相关标志物的表达变化及成骨相关功能细胞的时空定位及增殖凋亡分析。通过上述实验方法，探究衰老对上颌窦提升术后修复及成骨过程的影响及作用机制。

结果：小鼠窦腔提升模型成功建立；micro-CT分析显示衰老小鼠骨组织形成时间推迟、骨量及骨密度相较于年轻小鼠降低；组织形态学分析显示衰老小鼠骨组织形成及成熟延迟、局部破骨活跃；RNA-SEQ分析提示衰老小鼠局部组织成骨相关通路广泛下调，细胞增殖及分化效应减弱；IHC及IF显示衰老小鼠成骨相关基因表达下调且局部成骨功能性细胞数目减少，增殖活性降低。

结论：本研究通过构建小鼠窦腔提升模型，揭示衰老通过影响细胞功能进而影响上颌窦底提升术后的修复及成骨过程。

纤毛转运蛋白IFT140促进拔牙窝骨生成

周爽，李功臣，薛徽，陈雨贝，孙瑶*

同济大学附属口腔医院，上海牙组织修复与再生工程技术研究中心

目的：初级纤毛是位于细胞表面的突起状细胞器，几乎存在于所有细胞表面，向细胞内传递外界的力学、化学和生物信号。初级纤毛在骨骼发育与骨改建过程中发挥重要作用。

IFT140 (intraflagellar transport protein 140) 是构成纤毛正向运输蛋白复合体A的重要组成部分, 其缺乏会导致初级纤毛结构及功能异常, 引起严重的发育性疾病, 其中包括骨骼发育异常, 如分叉肋骨, 骨骺端膨大等。牙拔除术后拔牙窝内新生骨量不足, 将增加种植手术难度。拔牙窝内新骨形成是拔牙窝愈合的重要过程。本研究通过构建在前成骨细胞中条件性敲除IFT140的小鼠拔牙模型, 探讨纤毛转运蛋白IFT140对小鼠拔牙窝骨生成的影响及相关机制。

材料与方法: 构建基因条件性敲除小鼠模型, 将 *Ift140^{fl/fl}* 小鼠 (对照组) 与 *sp7-cre* 工具鼠杂交, 得到 *Ift140^{fl/fl};sp7-cre* 小鼠 (实验组)。于小鼠6周龄时拔除左侧上颌第一磨牙, 建立拔牙模型。分别于术后第1、2、3周, 对小鼠第一磨牙区的拔牙窝进行micro-CT扫描, 石蜡切片及组织学染色。分别提取对照组和实验组小鼠的BMSCs用于进行成骨诱导。在成骨诱导的不同阶段利用qPCR检测成骨相关基因的表达, 并采用针对纤毛相关标志物的免疫荧光染色观察初级纤毛形成情况。在成骨诱导晚期进行矿化结节的茜素红染色。

结果: 影像学分析发现, 术后3周, 对照组小鼠的拔牙窝基本愈合完全, 骨量平齐牙槽嵴顶端, 实验组小鼠的拔牙窝出现愈合延迟, 骨量明显不足。组织学染色发现, 与对照组相比, 同期实验组小鼠的拔牙窝骨组织染色面积比例较低, 而胶原染色的面积比例较高。体外实验发现, 实验组小鼠BMSCs在成骨诱导早期初级纤毛的出现率降低, 成骨相关基因的表达水平下降, 成骨诱导后期的矿化结节数目和面积均降低。

结论: 新骨形成是拔牙窝愈合的重要过程, *Ift140* 具有促进拔牙窝内新骨形成的重要功能, 其通过维持初级纤毛的结构和功能, 促进骨生成以及矿化。

Cyclophilin D在氧化应激诱导人牙髓细胞凋亡中作用研究

张肖榕¹, 郑冰冰¹, 金星¹, 虞其豪¹, 黄盛斌^{1,2}, 潘乙怀^{1,2}

¹温州医科大学口腔医学院; ²温州医科大学附属口腔医院

目的

研究证明, 氧化应激 (oxidative stress, OS) 介导的人牙髓细胞损伤是牙髓炎或牙髓损伤发生发展的重要病理机制之一。亲环蛋白D (Cyclophilin D, CypD) 是线粒体渗透性转变孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的一个关

键组成成分，它能促进mPTP的开放从而引起线粒体功能障碍，是控制细胞死亡的重要“门户”。然而，CypD介导的线粒体途径是否参与人牙髓细胞氧化应激损伤，其确切作用机制目前未见报道。

材料与方法

应用过氧化氢刺激原代培养的人牙髓细胞构建氧化应激损伤模型。选择适当浓度的线粒体膜通道抑制剂Cyclosporin A (CsA)、抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸 (NAC)、CypD小干扰RNA预处理上述模型。通过MTT测定评估细胞活力。通过流式细胞术和TUNEL测定分析凋亡率。通过蛋白质印迹检测蛋白质水平。分别用MitoSOX染色检测线粒体ROS水平、TMRM染色检测线粒体膜电位，Fluo-4-AM探针检测Ca²⁺水平和ATP检测试剂盒测定ATP生成。

结果

H₂O₂处理组的人牙髓细胞活力显著降低，凋亡增加，同时诱导线粒体功能障碍，表现为线粒体ROS水平增加，ATP下降，mPTP活化（MMP降低，细胞内Ca²⁺水平升高），CypD蛋白水平增加。NAC对人牙髓细胞凋亡和线粒体功能异常具有保护作用。通过化学性抑制剂CsA以及小干扰RNA抑制CypD表达显著缓解H₂O₂介导的线粒体功能障碍及细胞凋亡。

结论

- 1.CypD依赖的线粒体途径在H₂O₂诱导的人牙髓细胞凋亡中的起着关键作用。
- 2.CypD可能是预防氧化应激诱导牙髓炎或牙髓损伤的潜在治疗靶点。

MiR-15b通过结合IGF1、IGF1R 和BCL2调节

髌突肥大患者中髌突软骨细胞的增殖和凋亡

曹品银 柯金 房维 龙星

武汉大学口腔医学院颞下颌关节外科

目的：髌突肥大是以髌突异常增生为主要临床特征的疾病，伴随着软骨的异常增生。这种异常增生往往伴随着增殖和凋亡的异常改变。Bcl-2家族是调节凋亡的线粒体相关蛋白，是一种抗凋亡蛋白，在细胞凋亡调节中有重要作用。胰岛素样生长因子1 (Insulin like growth factor 1, IGF 1)是一种多功能肽，可以调节细胞生长，细胞分化，以及细胞外基质中多种蛋白的表达MicroRNA通过与靶mRNA结合，参与机体多种生理病理过

程。本实验通过验证髌突肥大患者髌突组织中增殖凋亡相关蛋白表达, 筛选增殖和凋亡相关microRNA分子, 进而验证相关microRNA在髌突肥大软骨中的作用。

方法: 取髌突肥大患者软骨组织和正常软骨组织, 通过免疫组化, RT-PCR和WB验证BCL2和IGF1及其受体在正常组织和髌突肥大组织中的表达改变。通过targetscan 查找与BCL2、IGF1及其受体相关microRNA,通过RT-PCR筛选出在髌突肥大和正常软骨中有统计学意义的microRNA。通过双荧光素酶实验判断microRNA与BCL2、IGF1及其受体三个目的基因的结合情况。改变microRNA, 通过RT-PCR和WB判断BCL2、IGF1及其受体的改变。并探究BCL2、IGF1及其受体的相关通路的激活状态。促进或抑制microRNA, 通过CCK8和细胞周期实验判断microRNA对增殖的影响, 通过Hoechst和流式细胞凋亡实验以及检测Caspase-3和FAS的表达判断microRNA对凋亡的影响。

结果: 髌突肥大软骨组织中BCL2、IGF1及其受体表达明显升高。通过targetscan查找出七个相关microRNA, 通过RT-PCR筛选出miR-15b的表达降低, 并具有统计学意义。双荧光素酶实验证实BCL2、IGF1及其受体均是miR-15b的靶基因。通过促进miR-15b的表达可见, BCL2、IGF1及其受体均降低, 抑制了JAK/STAT及PI3K/AKT通路, 促进了凋亡, 抑制了增殖, 出现了凋亡小体并且激活了FAS及。通过抑制miR-15b可见, BCL2、IGF1及其受体表达均升高, 细胞活性增强, 增强了增殖抑制了凋亡, FAS的表达降低。

结论: MiR-15b在髌突肥大软骨生长中起到一定的调节作用, 并通过BCL2和IGF1及其受体参与软骨细胞的增殖和凋亡。

MMP9缺失通过抑制成骨细胞的成骨分化功能延迟颅缝闭合

柴纪华

武汉大学口腔医院

颅缝在颅骨发育中起着重要作用。研究表明, 基质金属蛋白酶9 (MMP9) 通过促进血管入侵参与长骨发育。但MMP9在颅缝发育过程中的作用尚不清楚。在本研究中, 我们利用MMP9敲除 (*Mmp9*^{-/-}) 小鼠及其颅骨的成骨细胞来研究MMP9缺失在颅骨发育过程中的作用和机制。Micro-CT结果显示与WT小鼠颅骨比较, *Mmp9*^{-/-}小鼠的颅骨骨量少且其颅缝闭合延迟。抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色发现与WT小鼠颅骨比较, *Mmp9*^{-/-}小鼠的颅骨破骨细胞的数量减少。RT-PCR 检测 *Mmp9*^{-/-}小鼠颅骨组织

的破骨相关因子核因子受体激活因子 (RANK), 组织蛋白酶K (CTSK) 和c-Fos的mRNA 表达水平下调, 显示*Mmp9*^{-/-}小鼠破骨细胞功能受损。RT-PCR 检测*Mmp9*^{-/-}小鼠颅骨组织的成骨相关因子Runx2, 碱性磷酸酶 (Alp), 胶原蛋白1 (Col1) 和骨钙蛋白 (Ocn) 的mRNA表达水平低。颅骨成骨细胞体外培养检测与WT小鼠颅骨成骨细胞比较, *Mmp9*^{-/-}小鼠成骨细胞的分化能力减弱。将成骨细胞与破骨细胞共培养, 发现与*Mmp9*^{-/-}小鼠的破骨细胞共培养的成骨细胞的分化潜能显著降低。以上结果表明, MMP9缺失可抑制破骨细胞活性, 同时还可抑制成骨细胞的成骨分化功能, 从而延迟颅缝闭合影响颅骨发育。

目的:

我们利用MMP9敲除 (*Mmp9*^{-/-}) 小鼠及其颅骨的成骨细胞来研究MMP9缺失在颅骨发育过程中的作用和机制。

材料与方法:

转基因小鼠

Micro-CT

组织学染色: 茜素红阿尔新兰染色, HE, TRAP, MASSON, IHC, IF

细胞培养, 诱导分化, 茜素红染色, ALP染色

RT-PCR

结果:

Mmp9^{-/-}小鼠的颅缝闭合延迟。

Mmp9^{-/-}小鼠破骨细胞功能受损

Mmp9^{-/-}颅骨成骨细胞的分化减弱

结论:

MMP9缺失可抑制破骨细胞活性, 同时还可抑制成骨细胞的成骨分化功能, 从而通过延迟颅缝闭合影响颅骨发育。

唾液肿瘤细胞源性微囊泡在口腔癌进展中的作用研究

满其文 陈刚 赵怡芳

武汉大学口腔医学院

目的: 细胞源性微囊泡是活细胞在激活或凋亡状态下由胞膜出芽形成的直径在

100-1000 nm的囊泡。微囊泡可携带由母体细胞释放的特异性蛋白与核酸并大量存在于生物体液中。近年来，“液体活检”在肿瘤筛查、预后检测、药效评价等方面应用广泛。鉴于唾液采集方便、无创，与口腔癌组织直接接触且其中存在大量口腔癌特异性抗原，本研究旨在明确唾液细胞源性微囊泡的细胞来源及其在口腔癌预后和治疗中的潜在作用。

材料与方法：收集19例正常人，20例口腔黏膜不典型增生患者及69例口腔癌患者唾液并采用差速离心法分离，运用透射电镜、动态光散射技术、免疫荧光染色鉴定微囊泡；采用流式细胞术的方法检测各型细胞来源微囊泡的表达并分析其与临床组织病理特征及预后的关系。构建EGFR过表达细胞系（CAL27、SCC9及SCC25）并收集EGFR⁺微囊泡，并行细胞摄取，细胞迁移和细胞增殖实验检测EGFR⁺微囊泡对正常口腔黏膜上皮细胞的作用。体内在裸鼠舌癌移植瘤模型中，注射毛果芸香碱收集小鼠唾液并检测小鼠唾液中EGFR⁺微囊泡的表达及其与肿瘤生长和西妥昔单抗治疗疗效的关系。

结果：口腔癌患者唾液中的微囊泡总数较正常人及口腔黏膜不典型增生患者明显升高。唾液中的胞外微囊泡中有免疫细胞(CD4⁺和CD8⁺)、肿瘤细胞(EpCAM⁺或EGFR⁺)及血管内皮细胞(CD144⁺)释放的亚型微囊泡。在各亚型的微囊泡与口腔癌的组织病理特征的关系中，EGFR⁺微囊泡与口腔癌的T分级显著相关。唾液EGFR⁺微囊泡高表达患者较EGFR⁺胞外囊泡低表达患者预后差。在过表达EGFR的口腔癌细胞系分离获得的EGFR⁺微囊泡，可被正常口腔黏膜细胞摄取并显著促进其增殖和迁移能力。体内实验中，唾液EGFR⁺微囊泡与肿瘤的大小显著相关且唾液EGFR⁺微囊泡在西妥昔单抗治疗后显著降低。在裸鼠移植瘤动物模型中EGFR⁺微囊泡高表达可作为西妥昔单抗治疗有效的临床标志。

结论：唾液微囊泡中的肿瘤细胞源性微囊泡可作为口腔癌预后的评价指标并为西妥昔单抗应用提供参考。

CBP1通过调控STAT3外显子23的可变剪接抑制

致癌STAT3亚型的表达

王晓乐 郭继华 车晓轩 贾荣*
武汉大学口腔医学院

目的: STAT3在肿瘤的发生和发展中起着非常重要的作用。尽管通过多种方式对其活化和功能进行了广泛的研究,但到目前为止,在临床上还是缺乏有效的抑制STAT3的治疗方法。STAT3基因转录后产生的前体mRNA通过外显子23的可变剪接产生的两种亚型:STAT3 α 是较长的亚型并编码全长的致癌性的STAT3 α 蛋白,STAT3 β 较短并编码较短的肿瘤抑制性的STAT3 β 蛋白。在肿瘤发生发展过程中肿瘤细胞倾向表达STAT3 α 亚型。但到目前为止,尚不清楚STAT3外显子23的可变剪接是如何被调控的。本研究旨在研究STAT3可变剪接的调控机制及其与口腔癌发生发展的关系。

材料与方法: 设计构建可以模拟人STAT3外显子23可变剪接的mini基因,包含外显子22、内含子22和外显子23。在该 mini基因中,对外显子23的5'端的序列进行了系列突变,并将突变的质粒转染293细胞,检测外显子23的剪接变化,寻找对剪接起关键作用的序列。RNA pull-down实验来验证这些关键序列与RNA剪接调控蛋白PCBP1的结合。构建表达PCBP1的慢病毒,转染口腔癌细胞,观察细胞的生长,STAT3基因的可变剪接和蛋白表达,以及STAT3的靶基因的表达。

结果: 突变实验显示STAT3基因外显子23的5'端的部分序列突变后,STAT3 β 异构体的表达显著减少,STAT3 α 异构体的表达显著增加,说明外显子23的5'端存在外显子剪接抑制因子(ESS),其序列是“UCCCCCG”。RNA pull-down实验证实RNA剪接调控因子PCBP1与该ESS结合。RT-PCR及免疫印迹实验结果表明PCBP1的过表达显著降低了STAT3 α /STAT3 β 亚型的比例,抑制了STAT3 α 蛋白的表达和STAT3靶基因的表达。我们还发现PCBP1在正常上皮细胞中表达显著高于口腔癌细胞,STAT3 α 表达则相反;在口腔癌细胞中增加PCBP1表达,可以抑制细胞生长。挽救实验证实,PCBP1通过抑制癌基因STAT3 α 的表达而抑制癌细胞的增殖。

结论: 本研究首次证明PCBP1是调节STAT3外显子23的可变剪接的关键剪接调控因子,通过调控可变剪接促进肿瘤抑制性亚型STAT3 β ,抑制致癌亚型STAT3 α 表达,参与了口腔癌细胞生长增殖的调控。我们的研究结果为寻找新的抗STAT3癌症治疗方法铺平了道路。

基于纳米标记策略的口腔鳞癌细胞外囊泡体内外生物学行为研究

夏厚福, 余自力, 赵怡芳, 陈刚
武汉大学口腔医学院

目的: 细胞外囊泡 (Cell-derived microvesicles, MVs) 是细胞在激活、损伤或凋亡时分泌的直径介于100-1000 nm的膜性囊泡, 在大量生理病理过程中充当生物信息传递载体, 可作为许多疾病早期诊断及预后评估的重要指标, 并可用作疾病个体化靶向治疗的潜在载体。实现对胞外囊泡的标记示踪或成像是了解其生物信息传递规律及体内分布特点、阐明其生物学作用机制和开发治疗载体的关键。本研究的目的是利用纳米标记策略, 实现胞外囊泡多组份和多模态的高效无损标记, 并对口腔鳞癌细胞外囊泡体内外生物学行为进行可视化解析。

材料与方法: 超速离心法收获口腔鳞癌细胞外囊泡; 利用磷脂衍生物“自然嵌合”或电穿孔策略, 辅助多型量子点、荧光修饰核酸片段等实现胞外囊泡膜表面及其生物信息分子的荧光或核磁标记; 小动物荧光和磁共振成像仪监测胞外囊泡在体内动态分布及代谢规律; 借助激光共聚焦快速活细胞动态成像系统, 在三维空间和时间尺度上解析胞外囊泡向受体细胞传递生物信息分子的动态过程及机制。

结果: 利用Ag₂Se@Mn量子点优越的近红外荧光和磁共振双模态成像性能, 结合电穿孔技术首次实现人血液中胞外囊泡活体近红外荧光和磁共振双模态实时成像示踪, 揭示循环微囊泡在体内具有较强的整合素分子依赖的肿瘤靶向性。利用激光共聚焦快速活细胞动态成像系统, 成功解析口腔鳞癌细胞分泌的胞外囊泡以时间和温度依赖的胞吞途径进入受体细胞, 随后以典型的“三段式运动”在受体细胞中转运的动态过程。

结论: 本研究利用多重纳米标记策略, 系统研究了口腔鳞癌细胞外囊泡在活体内的动态分布及代谢规律, 并证实胞外囊泡在活体内具有较强的肿瘤靶向性; 初步探讨了细胞摄取胞外囊泡的机制和动态过程, 为研究胞外囊泡生物信息分子传递功能提供了新方法和理论基础。

EZH1在巨噬细胞调控骨缺损修复过程中的机制研究

贾筱诗, 许胡笛, Richard J. Miron, 尹程程, 张晓欣, 吴旻, 张玉峰
湖北省口腔基础医学重点实验室

目的: 作为一种重要的抗原呈递细胞, 已有研究证实巨噬细胞的M1/M2向极化在整个生物材料促进组织修复期间起到的调节作用。作为一种效果显著的骨缺损再生骨传导生物材料, 磷酸三钙 (TCP) 已广泛应用于各种临床探究。但成骨材料TCP通过调控巨噬细胞M2向极化, 进而促进骨缺损修复的具体机制仍未得到透彻研究。本文将深入研究控制M2巨噬细胞极化的潜在基因靶系统, 为最终建立适合骨修复的微环境提供有价值的见解。

材料与方法: 利用H&E染色及免疫组化观察骨缺损中埋植TCP周围巨噬细胞, 特别是M2型巨噬细胞浸润情况, 体外实验检测TCP促进成骨相关基因表达及对巨噬细胞M2向极化的调控作用。前期实验证实了EZH1在成骨与炎症相关的NF- κ B通路中的重要作用, 通过对EZH1在TCP刺激下表达降低的观察, 检测了沉默EZH1后对TCP调节巨噬细胞极化的影响。同时通过抑制NF- κ B通路, 验证EZH1与NF- κ B通路之间的相互作用。

结果: TCP的刺激能调控巨噬细胞M2向极化, 并促进骨缺损修复。在TCP浸提液刺激下, NF- κ B通路受到了抑制, 进而降低了EZH1的表达, 从而调节巨噬细胞向M2向极化, 并提高了成骨相关基因表达及成骨向分化。

结论: 作为已经广泛应用的成骨材料, TCP能显著性促进骨缺损的再生。而在骨再生的过程中, 巨噬细胞向M2型, 也就是为组织修复型巨噬细胞的极化能有效地促进骨缺损的修复。本文研究结果表明TCP通过EZH1与NF- κ B通路的相互作用, 能进一步调控巨噬细胞M2向极化, 进而促进骨缺损的修复。

柚皮苷改性的水凝胶纳米棒复合结构促进间充质干细胞的成骨分化

邵央婕, 俞梦飞, 王慧明

浙江大学医学院附属口腔医院

目的:

种植义齿是目前临床牙列缺损和缺失的重要修复方式, 而通过种植体表面改性促进骨结合仍是当前种植研究领域的热点与焦点。本研究设计了一种柚皮苷改性的水凝胶纳米棒

复合结构，探究其对于间充质干细胞生长和成骨分化的影响，为将来转化应用于临床，促进种植体的骨结合打下坚实的基础。

材料与方法：

本实验用水热反应法在石英板上构建纳米棒结构。将gelma 3M和collagen (10:1) 的混合液旋涂在纳米棒结构上，光固化，得到复合材料。将复合材料浸泡在1.4g/L柚皮苷溶液中10分钟，作为柚皮苷暴释的复合材料。将含有相同浓度柚皮苷的gelma 3M和collagen (10:1) 的混合液旋涂在纳米棒结构上，光固化，作为柚皮苷缓释的复合材料。大鼠间充质干细胞 (rbmsc) 培养在5种不同的材料表面：纯钛 (Ti)、纳米棒板 (ND)、水凝胶纳米棒结构复合材料 (G3-COL/ND)、柚皮苷缓释的水凝胶纳米棒结构复合材料 (G3-COL-NG/ND)、柚皮苷暴释的水凝胶纳米棒结构复合材料 (G3-COL/ND/NG)，通过细胞增殖实验、免疫荧光、q-PCR、ALP染色等方法检测细胞的生长和成骨分化。

结果：

细胞增殖实验表明，柚皮苷改性的水凝胶纳米棒结构复合材料明显能促进rbmsc的增殖，且柚皮苷暴释组对rbmsc的增殖促进作用更显著。免疫荧光实验表明，柚皮苷改性的水凝胶纳米棒结构复合材料明显能促进rbmsc的铺展。q-PCR和ALP染色实验表明柚皮苷改性的水凝胶纳米棒结构复合材料明显能促进rbmsc的成骨分化，且柚皮苷缓释组对rbmsc的成骨分化促进作用更显著。

结论：

柚皮苷改性的水凝胶纳米棒复合结构能促进间充质干细胞的生长和成骨分化。

KLF2通过调控FGFR3促进人间充质干细胞的干性维持

舒展浩

浙江大学医学院附属口腔医院

研究目的：

KLF2是胚胎干细胞 (ESCs) 增殖分化相关的转录因子，在维持ESCs自我更新方面

具有重要作用。最近在间充质干细胞 (MSCs) 中也报导了KLF2的表达, 但KLF2在MSCs中的作用尚不清楚。本研究探索了KLF2对MSCs干性维持的作用及调控的分子机制, 为MSCs在组织工程及临床应用上的转化奠定基础。

研究方法:

通过siRNA转染使KLF2转录因子在MSCs中敲低, 进一步通过cck-8实验, 克隆形成实验, q-PCR及三向诱导分化实验证实KLF2转录因子在MSCs干性维持中的作用。接着运用chip-sequence筛选出与KLF2转录因子相结合的靶基因, 将该靶基因在MSCs中敲低, 检测MSCs克隆形成能力及多向分化能力的影响, 验证靶基因在MSCs干性维持中的作用。

研究结果:

chip-sequence提示FGFR3是KLF2的下游靶基因。当将KLF2敲低后, FGFR3的表达量也随之降低, 同时MSCs的克隆形成能力、干性相关基因表达及三向诱导分化能力均明显下调。而单纯敲低FGFR3也使MSCs的干性维持能力显著下调。

研究结论:

KLF2通过调控FGFR3的表达促进MSCs的干性维持。

关键词: KLF2; FGFR3 ; 间充质干细胞; 干性; 分化

应用BIOMED-2 引物系统检测腮腺MALT淋巴瘤中的 Ig基因重排的初步研究

张亚敏, 朱慧勇*

浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科

目的: 回顾性研究腮腺黏膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤 (mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT lymphoma) 的临床及病理特征; 分析免疫球蛋白克隆重排检测对于腮腺MALT淋巴瘤的诊断价值; 探索Ig基因重排检测的引物设计。

材料与方法: 收集浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科从2009年至2017年期间通过H.E染色和/或免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) 方法确诊为腮腺MALT

淋巴瘤患者8例和腮腺淋巴上皮病变患者13例，并对其临床资料及组织切片进行回顾性分析。应用BIOMED-2引物系统对21份标本的福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE)组织切片进行DNA提取及PCR扩增，采用异源双链分析 (heteroduplex analysis, HA) 目标DNA片段的免疫球蛋白重链 (immunoglobulin heavy chain, IGH链) 的基因重排和轻链 (Kappa) 的限制性表达情况，检测分析标本组织细胞的克隆性。

结果：（1）经基因重排检测，17名患者被确诊为腮腺MALT淋巴瘤，其中47.06%患者有舍格伦综合征病史多年；（2）应用IGH VH-JH FR1, FR2, FR3, IGK V κ -J κ , 和 IGK (V κ -Kde and intron-Kde) 作为基因重排引物的检出率分别是76.47%, 82.35%, 88.24%, 29.41%和35.29%，此外，联合应用IGH VH-JH FR1, FR2, FR3作为基因重排引物检出率为100%；联合应用IGK V κ -J κ , 和 IGK (V κ -Kde and intron-Kde) 作为基因重排引物检出率为58.82%。

结论：（1）经常规组织学检测方法（HE染色，免疫组化）诊断为淋巴上皮病变的病人，若合并舍格伦综合征病史，建议进一步行基因重排检测，降低误诊率；（2）应用BIOMED-2引物系统对腮腺MALT淋巴瘤组织进行免疫球蛋白基因重排检测是高度可靠的诊断方法；（3）联合应用IGH-FR3, IGK V κ -J κ 和IGKV κ -Kde and intron-Kde基因片段作为引物进行基因重排检测，可提高检测的特异性和检测效率。

不同尺度的亚细胞形貌对间充质干细胞的影响

朱恬尔

浙江大学

研究目的：

通过操控材料表面特性可以影响间充质干细胞（MSC）形态、行为乃至谱系分化命运，本实验旨在探究不同尺度的亚细胞形貌对间充质干细胞的影响及其可能的机制。

研究方法：

本实验在设计了直径分别为5 μ m、10 μ m、20 μ m，深度为2 μ m的不同亚细胞图案（平

行图案、网格图案、网点图案)的石英片,以光滑石英片为空白对照,培养人骨髓间充质干细胞(hBMMSC),CCK8法比较细胞粘附和增殖差异,免疫荧光染色比较细胞的骨架排列、黏着斑面积、YAP/TAZ的表达及定位,qPCR比较MSC成骨相关基因的表达情况。

研究结果:

hBMMSC在不同图案的基板上细胞粘附及增殖无明显差异,免疫荧光的结果显示hBMMSC的细胞核倾向于附着在图案的凹陷处,不同基板上细胞形态及细胞核形态呈现明显差异,尺度越小基板细胞形态和核形变形越明显,但黏着斑的成熟程度却与图案尺度相反,q-PCR结果显示,MSC的成骨相关基因(RUNX-2、OCN、COL-1)表达量在相同尺度下有平行图案>网点图案>网格图案的趋势,并且成骨分化程度与YAP/TAZ的核浆分布比例有关系。

研究结论:

不同的亚细胞形貌通过影响细胞形态,通过影响黏着斑的成熟、细胞骨架排列,将这种物理刺激转换为机械力信号并传导到细胞核,细胞核的改变影响了YAP/TAZ相关蛋白的表达及核定位,并最终影响了骨髓间充质干细胞的分化命运。

关键词:

间充质干细胞;成骨分化;细胞形态;材料亚细胞形貌

PRF通过ERK信号通路调控SCAP主导的牙髓再生

毕静,刘尧,陈旭

1. 中国医科大学口腔医学院儿童口腔科, 2. 辽宁省口腔疾病重点实验室, 3. 辽宁省口腔疾病临床医学研究中心

目的: 牙髓再生治疗是年轻恒牙牙髓病及根尖周病治疗的新选择,近年,不断有病例报道将富血小板纤维蛋白(PRF)应用于牙髓再生治疗中,取得了理想的预后,因此PRF成为牙髓再生治疗中较理想的生物支架。根尖牙乳头干细胞(SCAP)来源于年轻恒牙

根尖部发育中的组织，与牙根形成关系密切，是参与牙髓再生治疗的主要干细胞。本研究通过体外实验研究PRF对SCAP生物学性能的影响，初步探索相关分子机制，并构建裸鼠背部牙根片段种植模型联合应用、观察牙髓再生，为优化年轻恒牙牙髓再生治疗提供实验基础。

材料与方法：体外实验：抽取志愿者新鲜血液，提取PRF，制备不同浓度的PRF条件培养基，预处理SCAP，检测SCAP增殖能力及细胞周期的变化情况及SCAP中Runx2、ALP的表达及SCAP的矿化能力。探索ERK信号通路中p-ERK、ERK的表达情况，并检测加入ERK信号通路抑制剂PD98059后p-ERK及ERK的表达情况。

体内实验：分为四组，SCAP细胞膜片+PRF组，SCAP细胞膜片组，PRF组及空根管组。将PRF膜与SCAP细胞膜片分别剪碎后混匀，放入牙根片段内，植入裸鼠背部皮下，2个月后组织学观察。

结果：1/8 PRF组能够明显促进SCAP的增殖，而1/4、1/2 PRF对SCAP的增殖能力无明显影响。细胞周期的结果显示PRF能够促进SCAP的分化，并且有一定的浓度依赖性，随着PRF浓度的升高，SCAP分化能力逐渐加强。PRF能够提高SCAP的ALP及DMP-1的表达水平，并促进SCAP的矿化能力，其中1/8 PRF对SCAP的促进作用最为显著。PRF能够明显提高SCAP中p-ERK的表达水平，但对ERK的水平无明显影响。我们选择1/8PRF组进行ERK信号通路的探索，发现PD98059能够有效抑制PRF对SCAP中p-ERK水平的上调。进一步实验表明，PD98059阻断ERK信号通路后，p-ERK表达下降，成骨/成牙本质相关蛋白表达降低，SCAP矿化能力减弱。动物实验发现SCAP细胞膜片与PRF联合应用组中，根管内壁可见成牙本质细胞，根管内有均质的牙本质形成和新生血管；SCAP细胞膜片组中，根管内壁可见成牙本质细胞形成，根管内可见新生血管（图4）；而PRF组与空根管组均无明显血管及牙本质样组织形成，可见大量的炎性细胞。

结论：PRF通过调控ERK信号通路上调SCAP的增殖、成骨/成牙本质向分化能力，从而促进牙髓再生。

Klotho蛋白对人牙周膜干细胞氧化应激损伤的保护作用的研究

陈焕、黄晓君、林雪峰、王彦*

目的:

干细胞相关骨组织工程在治疗骨缺损相关疾病(如牙周炎、牙槽骨萎缩或缺损、骨质疏松症等)中具有良好的应用前景。研究发现,干细胞移植中种子细胞对于氧化应激或炎症等不良环境的抵御能力是影响移植成功的关键因素。Klotho作为抗衰老基因,其编码的klotho蛋白中分泌型蛋白进入体循环中,有调节能量代谢和应激抵抗等作用。

本研究探索了Klotho蛋白对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)在氧化应激损伤时的保护作用及代谢调节机制,以期能明确氧化应激环境对干细胞的功能和代谢的影响,为维持干细胞活性,提高骨组织工程的治疗成功率提供研究依据。

材料与方法:

1. 采用酶消化联合组织块法分离培养原代hPDLSCs,并进行干细胞鉴定。
2. 不同浓度的Klotho蛋白处理hPDLSCs,通过MTT法观察处理后的hPDLSCs增殖活性,检验Klotho蛋白的细胞毒性,找到适宜的实验浓度。
3. 采用过氧化氢处理hPDLSCs构建体外氧化应激模型。应用实验浓度的Klotho蛋白对过氧化氢诱导前的hPDLSCs进行预处理。通过MTT法检测细胞增殖、超氧化物歧化酶(SOD)活性实验检测细胞抗氧化能力、丙二醛(MDA)含量检测反映细胞脂质氧化水平、DCFH-DA检测活性氧含量(ROS)反映细胞内氧化应激水平、流式细胞仪检测细胞凋亡情况。通过上述指标来综合评价Klotho蛋白预处理对hPDLSCs氧化应激损伤的保护作用。
4. 应用Klotho蛋白过氧化氢诱导前的hPDLSCs进行预处理,然后进行成骨诱导。通过qPCR、Western Blot、茜素红染色及碱性磷酸酶活性检测,观察Klotho蛋白对氧化应激后hPDLSCs成骨分化能力的影响。
5. 通过代谢仪的线粒体压力测试,观察Klotho蛋白对氧化应激后hPDLSCs的线粒体呼吸功能的影响。

结果:

1. 在100ng/ml-500ng/ml浓度范围的Klotho蛋白对hPDLSCs无毒性作用。本研究选用150ng/ml为实验浓度。
2. Klotho蛋白预处理能够提高氧化应激后hPDLSCs增殖能力和细胞内SOD活性,减少MDA含量和ROS水平,减少细胞凋亡。
3. Klotho蛋白预处理能够保护氧化应激后hPDLSCs的成骨分化能力。
4. Klotho蛋白预处理能够维持氧化应激后hPDLSCs的线粒体呼吸能力,保护细胞的代谢功能。

结论:

Klotho蛋白可以提高hPDLSCs抗氧化应激能力,抑制细胞凋亡,并通过维持细胞

的代谢功能保护hPDLSCs的干性。

R-spondin1对骨组织及骨髓间充质干细胞的

S-放射保护作用及其机制研究

陈晓丹¹, 谭家莉¹, 张炜真^{2, 3*}, 程斌^{1*}

1. 中山大学光华口腔医学院, 附属口腔医院, 广东省口腔医学重点实验室;
2. 北京大学基础医学院; 3. General Surgery, University of Michigan

目的: 验证R-spondin1对骨组织是否具有放射保护作用; 阐明R-spondin1对骨组织的放射保护的细胞学基础, 探讨R-spondin1对辐射后骨髓间充质干细胞(BMSC)命运转归的影响及其机制。

材料与方法:

1. 采用小鼠胫骨放射损伤模型, 显微CT扫描、HE染色明确R-spondin1对辐射后骨量及骨髓脂肪化的影响;
2. 体外分离培养小鼠BMSC, 检测X线辐射后BMSC中R-spondin1表达的变化; qRT-PCR、平板克隆形成实验、茜素红染色、油红O染色验证R-spondin1对辐射后BMSC自我更新能力及成骨、成脂向分化潜能的影响;
3. 结合RNA sequence分析, Western Blot、电镜观察、自噬双标腺病毒感染探讨R-spondin1对辐射后BMSC自噬及自噬调节通路mTOR-p70S6K的影响; 采用3-MA、CQ或Atg5 siRNA抑制自噬, 探讨R-spondin1是否通过促进自噬调控辐射后BMSC命运转归。

结果:

1. 2Gy X线辐射后小鼠胫骨密度降低, 结构模型指数升高, 骨量/总体积降低, 骨髓脂肪化; R-spondin1降低辐射后结构模型指数, 减轻髓腔脂肪化。
2. X线辐射促进BMSC中R-spondin1的表达; R-spondin1促进辐射后BMSC干性及成骨相关指标的转录, 促进 BMSC克隆及矿化结节形成, 同时抑制成脂相关指标的转录, 减少脂滴形成;

3. R-spondin1促进辐射后BMSC自噬,抑制辐射引起的mTOR-p70S6K通路相关分子的磷酸化; R-spondin1通过促进辐射后BMSC自噬维持其自我更新能力及成骨向分化潜能,抑制其成脂向分化。

结论:

辐射微环境下, R-spondin1通过mTOR-p70S6K通路激活BMSC自噬,维持BMSC的自我更新能力及成骨向分化潜能,抑制其成脂向分化,从而维持骨量,抑制骨髓脂肪化,对BMSC及骨组织起辐射保护作用。

牙龈卟啉单胞菌改变机体免疫应答加重脑部认知障碍

池莉、成宵、冯玉琨、孙建波、裴中、滕伟

中山大学附属口腔医院

中山大学附属第一医院

目的:大量研究表明牙周炎与阿尔兹海默症之间存在密切联系。牙周炎常见致病菌牙龈卟啉单胞菌吞噬进入胃肠道后,可能通过改变全身免疫状态,对脑部的认知功能产生影响。本研究主要探讨牙龈卟啉单胞菌进入胃肠道后如何影响全身免疫状态,进而影响脑部认知功能。

材料与方法:8周龄及9月龄C57小鼠各分为牙龈卟啉单胞菌(P.gingivalis, Pg)处理组和空白对照组。使用牙龈卟啉单胞菌制备的混悬液灌胃处理,一周三次,共四周。Even's blue法检测低龄鼠血脑屏障功能,双光子激光共聚焦显微镜观察脑血管旁间隙物质代谢速率。流式细胞检测血液、脾脏、肠系膜淋巴结(MLN)、大脑组织免疫细胞的改变情况,免疫荧光染色A β 1-42、Iba-1、GFAP分别标记淀粉样蛋白斑块,小胶质细胞和星形胶质细胞。Western blot检测皮层及海马区TNF- α 、IL-6的表达量。脑片Tunel染色评估脑内细胞凋亡情况。水迷宫、旷场实验和Rotarod实验分别检测小鼠空间记忆能力、自主运动行为探索能力和被动运动能力。

结果:Pg处理一个月后,低龄鼠海马区血脑屏障通透性增加,小胶质细胞活化明显,血管旁间隙物质排泄速率减慢($p < 0.5$)。高龄鼠脑内活化的小胶质细胞所占比例增加,Tunel染色显示颞叶皮层凋亡细胞增多,大脑海马区可见淀粉样蛋白斑块形成。高龄鼠皮层及海马区TNF- α 、IL-6表达量较低龄鼠少,Pg处理后表达量更少。血液中CD45^{hi}CD11b⁺Ly6c⁺($p < 0.001$)、CD8⁺TNF- α ($p < 0.1$)和CD4⁺TNF- α 细胞数量均减少,MLN中CD45^{hi}CD11b⁺CD68⁺($p < 0.5$)和CD45^{hi}CD11b⁺CD206⁺($p < 0.1$)数量均减少。脾脏中CD8⁺TNF- α 和CD4⁺TNF- α 细胞数量均增多($p < 0.1$)。

小鼠自主运动能力和行为探索能力稍有下降, 空间记忆能力下降 ($p < 0.5$) 和被动运动能力下降明显 ($p < 0.001$)。

结论: 牙龈卟啉单胞菌可使低龄鼠脑部功能部分受损, 高龄鼠除脾脏外其他部位免疫功能均受到抑制, 这些改变使脑内淀粉样蛋白沉积增多, 凋亡神经细胞增多, 进而加重了小鼠的认知功能障碍。

载NELL1蛋白二氧化钛纳米管阵列的制备及其体外生物学评价

李家妍 王阶达 吴淑仪* 李彦*

中山大学光华口腔医学院 附属口腔医院修复科, 广东省口腔医学重点实验室

目的: 制备搭载颅颌面骨组织特异成骨诱导因子——尼尔样 I 型蛋白 (NEL-like protein-1, NELL1) 的功能化二氧化钛纳米管 (TiO₂ nanotubes, TNT) 阵列, 并用人颌骨骨髓间充质干细胞对材料生物相容性及成骨诱导能力进行体外评价, 为进一步优化种植体表面改性、提高种植体-骨结合提供新方向。

材料与方法: (1) 使用阳极氧化法在纯钛表面制备 TNT, 并通过聚多巴胺 (polydopamine, DOPA) 涂层加载重组人 NELL1 蛋白。场发射扫描电镜 (FE-SEM) 观察材料表面形貌; X 射线光电子能谱 (XPS) 分析材料表面元素组成; 傅里叶红外光谱仪 (FTIR) 分析材料表面分子官能团; 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 测试材料表面粗糙度; 接触角测试仪测试材料表面亲水性。(2) 分离、提取、培养人颌骨骨髓间充质干细胞, 通过 cck-8 法测定细胞在材料表面的增殖活性、荧光染色和扫描电镜观察材料表面细胞粘附及骨架形态。(3) 通过碱性磷酸酶活性测定、qRT-PCR、Western Blot、免疫荧光染色及胞外基质矿化茜素红染色评价材料体外成骨诱导能力。

结果: (1) FE-SEM 可见所制得 TNT 管径约 80~100nm, DOPA 和 NELL1 蛋白沿纳米管管壁黏附, 加载后纳米管管腔形态仍可见。XPS 及 FTIR 结果显示, 加载 DOPA 和 NELL1 后对应元素含量增加, 并出现相应元素或官能团特征峰, 表明 DOPA 和 NELL1 加载成功。TNT 组表面粗糙度最高、亲水性最佳, 加载 DOPA 和 NELL1 后粗糙度逐渐下降, 加载 DOPA 后亲水性下降, 继续加载 NELL1 后亲水性上升。(2) 生物相容性相关检测结果显示, 加载 DOPA 和 NELL1 后对材料表面细胞增殖活性无明显影响, 但细胞在 NELL1 组伸展最佳, 细胞骨架清晰。(3) 体外成骨相关检测结果显示, 加载 NELL1 后可上调人颌骨骨髓间充质干细胞 *Alp*、*Runx2* 和 *Opn* 基因的表达水平, 同时上调 RUNX2 和 OPN

的蛋白表达水平,且ALP活性及胞外矿化能力显著高于其余组,其差异具有统计学意义。

结论: (1) 重组人NELL1蛋白可通过聚多巴胺涂层成功加载在二氧化钛纳米管表面。

(2) 载NELL1蛋白二氧化钛纳米管阵列可促进人颌骨骨髓间充质干细胞体外成骨分化。

白色念珠菌ADH诱导人单核细胞系THP-1向巨噬细胞样分化

刘杨澜, 欧玉雪, 胡雁*

中山大学光华口腔医学院, 附属口腔医院; 口腔医学研究所,
广东省口腔医学重点实验室

目的: 白色念珠菌是人类常见的机会致病菌。本课题组前期体内实验证明白色念珠菌重组乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase,ADH)对小鼠念珠菌感染具有免疫保护作用。本研究拟在观察并研究ADH对人单核细胞系THP-1的分化作用,并初步探讨其分子作用机制。

材料与方法: 分子克隆构建质粒、克隆、表达、纯化白色念珠菌重组ADH; LDH检验ADH细胞毒性; PMA作为阳性对照, 未处理细胞作为阴性对照, 倒置显微镜观察ADH刺激THP-1分化后形态; 结晶紫染色, 乙醇脱色后酶标仪检测595 nm吸光度下细胞的黏附力; 流式细胞术检测细胞对白色念珠菌的吞噬率; 涂板法检测细胞对白色念珠菌的杀伤力; 流式细胞术验证巨噬细胞表面标志物CD86, CD11b的表达情况; ELISA检测细胞因子分泌情况。倒置显微镜, Western blot, 流式细胞术, ELISA实验探究ERK1/2通路抑制剂U0126对ADH刺激THP-1分化的抑制作用。

结果: 成功合成分子量为38 kDa重组ADH; 排除ADH对THP-1的细胞毒性; 倒置显微镜观察到300 nM ADH能刺激THP-1细胞48小时后由类圆形的悬浮状态分化为多触角的贴壁细胞, 其黏附力, 吞噬力, 杀伤力以及巨噬细胞表面标志物CD86, CD11b较未处理组均明显增加 ($P < 0.05$); 且ADH刺激THP-1大量分泌前炎症因子IL-1 β , IL-6, TNF- α ($P < 0.05$), 与200 nM PMA作为阳性对照组无明显差异。ERK 1/2通路抑制剂U0126 10 μ M预处理THP-1 (1 h) 观察到ADH刺激THP-1 (48 h) 后其形态无明显改变; p-ERK的蛋白水平显著降低, CD86, CD11b表达明显受抑制 ($P < 0.05$); IL-1 β , IL-6, TNF- α 的分泌显著降低 ($P < 0.05$)。

结论: 白色念珠菌重组ADH能够刺激人单核细胞系THP-1向巨噬细胞样分化, ERK1/2通路参与其分化过程。本研究进一步暗示了ADH作为白色念珠菌抗原蛋白在宿主免疫防御过程中发挥重要作用。

姜黄素对人牙周膜干细胞氧化应激损伤的保护作用研究

谭灵屏、曹泽源、林雪峰、王彦*

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院

广东省口腔医学重点实验室

目的

口腔颌面部疾病, 包括畸形、外伤、感染、肿瘤, 都会造成的颌面部骨组织缺损, 严重降低患者生活水平。骨组织再生为治疗口腔颌面部骨组织缺损提供了一种新的方法, 然而干细胞移植后因移植部位的非特异性炎症和氧化应激等也会影响细胞干性的本身的活性和功能。姜黄素是一种多酚类抗氧化剂, 来源于印度草本植物姜黄, 可缓解脂质过氧化、硝基自由基或低氧对组织造成的损害。

本研究目的是探讨姜黄素对人牙周膜干细胞 (hPDLSCs) 氧化应激损伤的保护作用及分子机制, 为骨组织工程中维持干细胞的活性, 促进其成骨向分化提供思路及理论依据。

材料与方法

1. 采用酶消化联合组织块法分离培养hPDLSCs, 利用克隆形成实验、多向分化实验、流式细胞术进行干细胞鉴定。

2. 采用不同浓度的过氧化氢处理hPDLSCs, 选择适合浓度的过氧化氢构建体外氧化应激模型。

3. 应用姜黄素对过氧化氢诱导前的hPDLSCs进行预处理。通过检测细胞增殖, 细胞内SOD活性、MDA含量、活性氧含量以及细胞凋亡等指标综合评价姜黄素预处理对人牙周膜干细胞氧化应激损伤的保护作用。

4. 应用姜黄素对过氧化氢诱导前的hPDLSCs进行预处理, 再进行成骨诱导。通过qPCR、Westernblot、茜素红染色、碱性磷酸酶活性检测等, 观察姜黄素对氧化应激

后hPDLSCs成骨分化能力的影响。

5.检测Erk1/2信号通路相关蛋白的表达情况,探索姜黄素对hPDLSCs氧化应激损伤发挥保护作用的分子机制。

结果

1. 本研究分离培养的hPDLSCs具有较强的自我更新能力、多向分化能力,表面标志物CD44、CD90、CD105、CD166表达阳性,CD34、HLA-DR表达阴性。
2. 姜黄素预处理能够提高氧化应激后hPDLSCs增殖能力,增强hPDLSCs内SOD活性,减少MDA含量,降低细胞内ROS水平,减少细胞凋亡,激活Erk1/2通路从而保护氧化应激损伤后干细胞成骨分化能力。

结论

姜黄素可以提高hPDLSCs抗氧化应激能力,抑制细胞凋亡,通过激活Erk1/2信号通路促进细胞骨向分化,发挥对hPDLSCs氧化损伤的保护。

ICOS/ICOSL信号轴的表达与根尖周炎的炎性浸润 和牙槽骨破坏的相关性

陶祎伟 张晓磊 邢泉*

中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院

目的:根尖周炎是常见的慢性炎症性疾病,其主要特点是根尖区的牙槽骨吸收,牙髓治疗是目前常用的治疗方式,但仍有少量治疗后效果不佳。而根尖周炎的骨吸收常常认为是免疫系统介导的破骨细胞数量及活性增加的结果,T细胞在这一过程中起关键性作用。ICOS是一种T细胞应答的重要刺激分子,主要表达在活化的T细胞表面,有文献报道其可能参与调节类风湿关节炎的局部免疫。但目前尚无文献研究ICOS/ICOSL通路是否参与调节慢性根尖周炎的局部炎症反应。因此本文初步研究ICOS/ICOSL信号轴在根尖周炎进展过程的时空表达,并且通过构建大鼠根尖周炎不同进展阶段的模型,检测ICOS-ICOSL是否参与调节慢性根尖周炎的炎症反应和牙槽骨吸收。从而为慢性根尖周

炎的临床治疗提供新思路。

材料与方法： 60只Wistar大鼠下颌第一磨牙进行开髓，并将髓腔暴露于口腔环境中，构建实验性根尖周炎。分别于0天、7天、14天、21天、28天、35天处死，取下颌骨分别进行Micro-CT、HE染色、IHC、qPCR,观察根尖周炎疾病的不同时期炎症程度以及ICOS/ICOSL、RANKL、F4/80的表达情况。此外，取临床根尖周手术患者刮除的炎症组织，与健康智齿的牙周膜。分别进行免疫荧光染色和qPCR,检测ICOS/ICOSL在人体慢性根尖周炎的表达及定位。

结果： 1.ICOS/ICOSL在实验组（7-35天组）均高表达，而且呈现特异性时空分布。且与根尖周病变的体积大小($r = 0.951, p < 0.001$)、巨噬细胞阳性细胞的数量($r = 0.972, p = 0.972$)和ICOSL阳性细胞的数量($r=0.986, p < 0.001$)成呈明显相关性。同时在人体根尖周组织检测中，ICOS的表达无论基因水平还是细胞水平，炎症组中均高于对照组。

结论： 1.ICOS/ICOSL信号轴可能参与慢性根尖周炎的免疫调节。

2.ICOS/ICOSL信号轴与根尖周炎的炎症浸润以及牙槽骨破坏吸收相关

METTL3通过PI3K-AKT信号通路调节BMSCs成骨分化

田程

中山大学附属光华口腔医学院

目的： 观察骨髓间充质干细胞向成骨细胞诱导分化过程中，发现RNA甲基化酶METTL3表达情况随成骨分化天数增加其表达增加，敲低METTL3后，成骨分化表达下降，提示RNA甲基化酶METTL3可能影响骨髓间充质干细胞成骨分化。RNA-seq检测敲低METTL3前后相关信号通路表达，验证METTL3受信号通路影响从而影响成骨分化。

材料与方法： 抽取2-3周龄SD大鼠股骨骨髓,全骨髓贴壁法培养获得骨髓间充质干细胞(BMSCs),流式细胞术检测BMSCs鉴定;免疫学表型,第三代BMSCs向脂肪细胞和成骨细胞方向诱导分化,诱导21 d后的脂肪细胞应用油红O染色进行鉴定,成骨细胞应用茜素红染色进行鉴定; PCR, western blot方法检测成骨诱导培养7d, 14d后的第三代BMSCs中RUNX2, SP7, METTL3以及ALKBH5的表达情况。慢病毒转染敲低METTL3, PCR, western blot方法检测成骨诱导培养7d, 14d后BMSCs中RUNX2, SP7表达, RNA-seq

检测敲低METTL3前后相关基因表达，信号通路富集情况RUNX2，SP7表达

结果：流式细胞术检测,CD29+、CD44+表达量分别为97.4%和99.64%，CD34、CD45的表达率分别则为0.79%和1.27%;在脂肪培养基诱导下,油红O染色阳性。在成骨培养基诱导下,茜素红染色阳性。BMSCs经矿化诱导培养后表达RUNX2，SP7;随着成骨诱导的天数增加，RNA甲基化酶METTL3表达升高，去甲基化酶ALKBH5表达下降。慢病毒转染敲低METTL3，成骨诱导培养7d，14d后BMSCs中RUNX2，SP7表达均下降；RNA-seq检测敲低METTL3前后相关基因表达信号通路富集情况，发现PI3k-AKT信号通路富集程度较高，WB验证敲低METTL3后，AKT磷酸化表达降低。

结论：1、采用全骨髓贴壁培养法可获取数量多且纯度较高的BMSCs。2、成骨诱导培养BMSCs，伴随成骨诱导天数增加，RNA甲基化酶METTL3表达升高；敲低METTL3后诱导成骨，成骨指标RUNX2，SP7表达降低，提示m6A修饰增加，在成骨过程中发挥正向调控作用；3、RNA-seq检测，富集程度较高，提示METTL3影响成骨分化可能是通过PI3k-AKT信号通路。

内质网分子伴侣Calnexin抑制T淋巴细胞

抗肿瘤反应的机制研究

王茜 陈一辰 马达 房娟 王智*

中山大学光华口腔医学院附属口腔医院

目的：探究肿瘤细胞内质网分子伴侣Calnexin(CNX)膜表达对T淋巴细胞抗肿瘤反应的抑制作用及其可能机制。

材料与方法：1、利用 Real time RT-PCR、Western blotting、免疫荧光和流式细胞术(FACS)探究CNX在口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞系及组织中的表达；2、利用357例病理随访资料完善的OSCC患者组织微阵列，免疫组化实验分析CNX表达，采用Kaplan-Meier方法描述生存曲线，单因素及多因素COX风险比例模型分析Calnexin表达与预后的相关性；3、将CFSE标记的健康供体和OSCC患者PBMCs加入扣有anti-mCD3和CNX重组蛋白或Flag蛋白的孔板中共孵育，FACS检测T细胞增殖、酶联免疫吸附测定(ELISA)检测T细胞效应分子分泌；4、将 1×10^7 慢病毒感染构建稳定沉默

CNX或空载的HSC3细胞于NCG鼠皮下成瘤，尾静脉输注OSCC患者外周血单个核细胞(PBMCs)构建人源化小鼠模型；将 1×10^6 慢病毒感染构建稳定沉默CNX基因或空载的B16细胞系于B6鼠皮下成瘤，腹腔注射CNX重组蛋白或Flag蛋白，每2日测量肿瘤大小以获生长曲线。成瘤后2-3周取瘤体和外周淋巴细胞行FACS分析；5、利用焦磷酸盐测序分析CNX重组蛋白或Flag蛋白处理后的OSCC患者T细胞中PD-1启动子区的甲基化状态，明确CNX调节T细胞抗肿瘤反应的机制。

结果： CNX 在OSCC细胞系和癌组织表达高于正常角化上皮细胞和癌旁组织，CNX在OSCC患者癌细胞膜表达的增加与T细胞浸润呈负相关，且与患者预后不良相关；CNX重组蛋白可在体外抑制健康供体和OSCC患者T细胞的增殖和IFN- γ , TNF- α 和IL-2的分泌；在HSC3皮下成瘤模型中，人源化小鼠组的CNX缺乏通过增加T细胞的浸润和效应功能，抑制NCG小鼠体内OSCC肿瘤的生长；在黑素瘤皮下成瘤模型中，沉默CNX可增强T细胞在肿瘤微环境中的浸润和效应功能，抑制肿瘤的生长，CNX重组蛋白治疗通过减少T细胞的浸润和效应功能从而促进肿瘤的生长；CNX通过抑制PD-1启动子区CpG岛的DNA甲基化水平，增强PD-1在T细胞中的表达。

结论： 肿瘤细胞膜CNX可通过诱导免疫阻断分子PD-1在T细胞上的表达，抑制T细胞抗肿瘤反应，提示CNX可能是肿瘤免疫治疗的新靶点。

双向诱导分化的ADSCs共培养体系联合水凝胶对大鼠骨缺损

修复影响的体内外实验研究

吴淑仪, 刘孝威, 杨会芳*, 李彦*

中山大学光华口腔医学院-附属口腔医院修复科, 广东省口腔医学重点实验室

目的： 将大鼠脂肪间充质干细胞(ADSCs)向成骨和成血管方向分化，体外探讨合适的共培养比例及两种细胞的相互作用机制，体内探究双向诱导分化的ADSCs共培养体系联合RADA16-I水凝胶对大鼠骨缺损修复的影响。

材料与方法： (1) 诱导f344大鼠的ADSCs向成骨和成血管方向分化，使用高通量测序(RNA-seq)对不同比例ADSCs(2:1、1:1、1:2)共培养前后的细胞进行差异基因检测，进一步探究非接触共培养的成骨、成血管诱导细胞相互作用机制。RT-qPCR检测关

键因子的表达,验证RNA-seq的结果。(2)将筛选出的合适比例的两种细胞与RADA16-I水凝胶整合,并应用于f344大鼠颅骨骨缺损极限模型中。将实验分为4组,共培养组为RADA16-I联合1:1成骨成血管诱导分化后的ADSCs,对照组分别为RADA16-I联合未诱导分化、成骨诱导分化和成血管诱导分化后的ADSCs。采用组织学形态以及micro-CT观察缺损部位新生骨形成情况。

结果: (1) RNA-seq结果显示以不同比例共培养后,1:1共培养组促进成骨成血管作用较强。差异基因聚类于血管相关、细胞介导、骨相关基因,以及TGF- β 、MAPK和Wnt通路。验证RT-qPCR与基因测序结果基本一致, RNA-seq测序结果较为可靠。(2) Van Geison染色结果:共培养组可见大面积新生骨形成,排列整齐,骨板连续,可见骨小梁及板层样结构;新生骨骨面积高于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。micro-CT结果显示,共培养组缺损区大部分被修复,新生骨成连续片状,对照组仅在边缘区有少量块状新生骨。共培养组新生骨骨体积 (BV)、骨容积 (BV/TV) 大于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

结论: (1) 1:1为成骨成血管诱导分化ADSCs较合适的共培养比例。共培养的机制可能与血管相关基因、细胞介导基因、骨相关基因和TGF- β 通路、MAPK通路和Wnt通路有关,VEGF/MAPK信号轴可能参与了两种细胞的相互作用。(2)

双向诱导分化ADSCs按1:1比例建立的共培养体系联合RADA16-I水凝胶可促进大鼠骨缺损修复。

上皮特异性敲除Cdc42导致成釉器发育缺陷和囊肿形成

郑金绚^[1,3], 曹阳^[1,3], 吴莉萍^{[1,3]*}, 聂旭光^{[2]*}

[1]中山大学附属口腔医院正畸科

[2]哥伦比亚大学牙学院颌颌面再生中心

[3]中山大学光华口腔医学院, 口腔医学研究所, 广东省口腔医学重点实验室

目的: 探讨Cdc42在成釉器发育过程中的调控作用及可能机制,为研究Cdc42在牙发育中的功能及Cdc42缺失可能引起的相关疾病模型提供理论依据。

材料与方法: 采用免疫荧光法检测Cdc42在牙发育过程中的表达模式,继而应用K14-cre与Cdc42^{loxp/loxp}转基因鼠构建牙源性上皮特异性敲除Cdc42的转基因小鼠K14-cre;

Cdc42^{loxp/loxp}。组织学检查和裸鼠肾背囊下移植分析*Cdc42*敲除鼠第一磨牙表型；透射电镜观察成釉器细胞超微结构变化；TUNEL试验、免疫荧光染色、qRT-PCR和原位杂交技术分别检测成釉器细胞凋亡、增值和牙发育过程中重要信号分子的变化。

结果:

1. *Cdc42*高表达于胚胎期牙源性上皮（成釉器），出生后表达降低，表明*Cdc42*参与成釉器发育。
2. 上皮特异性敲除*Cdc42*导致牙源性囊肿形成。*K14-cre; Cdc42^{loxp/loxp}*小鼠出生后24小时内死亡，出生时，第一磨牙形态异常伴有囊肿；胚胎期组织学检查发现，囊性变始于E15.5天左右，发展至E18.5时为具有上皮衬里和基底膜的真性囊肿。将*K14-cre; Cdc42^{loxp/loxp}*小鼠第一磨牙牙胚于裸鼠肾背囊下移植5周后发现，*Cdc42*缺失导致磨牙牙源性囊肿。
3. 敲除*Cdc42*后，成釉器细胞伪足减少、细胞连接数目减少伴有结构异常、细胞内自噬小体数目增加同时*Lc3b*基因表达增加。与对照鼠牙胚相比，上皮-间充质之间的基底膜不完整。
4. *Cdc42*的缺失，引起胚胎期成釉器细胞凋亡增加；次级釉结相关标记物shh表达降低，Sox2阳性细胞异位表达。此外，敲除*Cdc42*导致胚胎后期成釉器增生减少、体积减小。
5. 敲除*Cdc42*引起成釉器发育过程中Wnt/ β -catenin激活减少。

结论: *Cdc42*的缺失导致牙源性囊肿形成，*Cdc42*是成釉器发育的重要调节因子，其通过调节成釉器凋亡、增生、成牙相关信号通路Wnt/ β -catenin和shh参与成釉器发育，可能参与自噬。*K14-cre; Cdc42^{loxp/loxp}*小鼠可能为牙源性囊肿的动物模型提供理论依据。

老年人龋病的微生物群落结构及多样性研究

蒋倩

重庆医科大学附属口腔医院

目的: 研究老年人龋病患者和无龋者的唾液和牙菌斑的细菌群落构成，以了解老年人龋病微环境的微生物多样性及群落结构变化，为老年人龋病的病因探究及生态防治提供依据。

材料与方法: 在重庆市60-75岁的老年人群中选取24名高龋患者及22名无龋者，采集受试者的非刺激性唾液和龈上菌斑，分别标记为CS组（无龋唾液组）、CP组（无龋菌斑

组)、TS组(高龋唾液组)、TP组(高龋菌斑组)四组,运用Illumina Miseq高通量测序技术进行微生物群落结构及多样性分析。

结果:所有样本在97%相似度下共得到147531个OTU, 归属于16个门, 29个纲, 49个目, 79个科, 141个属, 312个菌种。各组间菌群微生物构成具有相似性, 优势菌门包括: 厚壁菌门(Firmicutes, 29%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 22%)、变形菌门(Proteobacteria, 20%)、梭杆菌门(Fusobacteria, 16%)、放线菌门(Actinobacteria, 7%)和TM7菌门(3%)。有246个菌种为四组共有, 占总菌种数的80.7%, 可视为口腔核心微生物。 α 多样性显示高龋组与无龋组的微生物多样性及丰度相似, 但在唾液和菌斑两个位点有明显差别, PCoA等 β 多样性分析结果也证实这一结论。LEfSe分析显示了各组中最具代表性的菌种, 这些微生物可能与龋病或健康状态密切相关。共现性网络分析图可直观表示丰度较高菌属间的相互作用关系。PICRUSt分析可对微生物进行一定程度的功能预测。

结论:老年人龋病患者与无龋者的口腔微生物群落结构多样性相似, 微生物种类相似但相对丰度不同。不同位点的微生物多样性、丰度、结构组成等有明显差别。一些菌种的丰度变化可能与老年人龋病的发生发展相关。

聚乙二醇-b-聚己内酯/聚己内酯单分散

电喷微球的制备与亲水性研究

杨雪

重庆医科大学附属口腔医院

[摘 要]

目的:用静电喷雾法制备单分散性良好、亲水性的聚乙二醇-b-聚己内酯/聚己内酯(PEG-b-PCL/PCL)电喷微球。

方法:将聚乙二醇-b-聚己内酯(PEG-b-PCL)、聚己内酯(PCL)与氯仿混合磁力搅拌3h后,采用静电喷雾的方法,以双亲(PEG-b-PCL)含量、流速、电压为变量,研究微球形态大小、粒径分布的变化,并研究微球亲水性随双亲含量的变化程度及微球在水中的分散性。

结果: 双亲含量10%~20%、流速1 ml/h、电压10 KV时能得到成球性佳、粒径5~6 um的单分散性良好的微球, 粒径的变异系数为15%-21%; 双亲含量增至30%, 微球之间由较多的纤维连接; 双亲含量由0%增至20%, 接触角由 $126.2\pm 4.8^\circ$ 降至 $29.9\pm 4.9^\circ$, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$), 通过改变双亲含量能有效改善微球的亲水性, 同时, 加入10%~20%双亲的微球在水中分散性佳, 能形成均匀的混悬液。

结论: PEG-b-PCL/ PCL能得到单分散、亲水性佳的微球, 为进一步制备载药微球提供基础。

甘氨酸粉末空气抛光与手用器械刮治和超声洁治相比在 牙周支持治疗阶段的疗效: 系统评价和meta分析

朱梦远 赵美林 胡波 王云霄 李瑶 宋锦璘

重庆医科大学口腔医学院 重庆医科大学附属口腔医院

目的:

评估甘氨酸粉末空气抛光 (GPAP) 与手用器械刮治和超声洁治相比对牙周支持治疗 (SPT) 患者的疗效。

材料与方法:

两名独立评审员对8个电子数据库进行了检索以获得符合纳入标准的研究。作者将牙周探测深度 (PPD)、牙龈退缩指数 (Rec)、探诊出血指数 (BOP)、菌斑指数 (PI)、视觉模拟评分量表 (VAS)、牙龈上皮评分和龈下细菌计数作为该研究的结局指标。用 RevMan Manager 5.3来计算统计学结果和异质性。

结果:

本文总共纳入了16项研究。甘氨酸粉末空气抛光组的平均探诊出血指数比手用器械刮治组低6.63% (95%CI = -9.41--3.86; $P < 0.01$; $I^2 = 29\%$)。视觉模拟评分量表的结果 (-1.48, 95%CI = -1.90-1.06; $P < 0.001$; $I^2 = 83\%$) 表明甘氨酸粉末空气抛光比超声洁治明显更舒适。牙周探诊深度、牙龈退缩指数和菌斑指数的结果无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论:

我们的研究表明, 甘氨酸粉末空气抛光可以更有效地缓解牙龈炎症, 并且使患者感到更舒适, 这使之成为口腔临床应用的可能替代选择。但牙周探诊深度、牙龈退缩指数和菌斑指数的结果数据无法证明甘氨酸粉末空气抛光与手用器械刮治和超声洁治相比的优势。我们仍需要更多高质量的临床试验来评估甘氨酸粉末空气抛光在组织学上

和微生物水平上的优势。

三叉神经痛大鼠三叉神经节中BDNF的表达变化

刘丽娟¹, 尹灿灿¹, 关书², 葛会香², 王聪睿³, 高云², 熊伟^{1,4*}

1.南昌大学附属口腔医院预防科; 2.南昌大学基础医学院生理教研室3.南昌大学第二临床医学; 4.江西省口腔生物学重点实验室

目的: 观察脑源性神经生长因子 (Brain-derived Neurotropic Factor , BDNF) 及其高亲和力受体TrkB在各组三叉神经节的表达变化。**方法:** 三叉神经痛大鼠模型由眶下神经慢性损伤压迫模型 (ION-CCI) 制备。假手术组 (Sham组) 和三叉神经痛模型组 (TN组) 由体重为180-220g SD雄性大鼠随机分配组成。利用电子测痛仪测定两组大鼠损伤侧机械阈值,应用实时荧光定量PCR(**Quantitative real-time PCR**, qPCR) 技术,免疫组织化学技术检测损伤侧TG中BDNF及TrkB表达变化,免疫荧光双标技术观察BDNF与NeuN共表达情况。与此同时,采用qPCR测定损伤侧TG中前炎症因子TNF- α and IL-1 β 的变化。**结果:** 建模两周后,和Sham组相比TN组的机械痛阈明显下调 ($p < 0.05$)。QPCR的结果表明TN组三叉神经节中BDNF及TrkB mRNA较假手术组明显升高,免疫组化结果和qPCR结果是一致 ($p < 0.05$)。免疫荧光双标技术观察到在TG中, BDNF与NeuN有共表达和Sham组相比荧光强度明显增强。此外,和Sham组大鼠相比TN组大鼠TG中前炎症因子TNF- α and IL-1 β 水平也出现了明显升高 ($p < 0.05$)。**结论:** 三叉神经痛状态下, ION-CCI 大鼠TG中BDNF及TrkB表达升高,可能参与三叉神经痛的发病机制,促进了三叉神经痛的痛觉传递,。

关键词:BDNF; TrkB; 三叉神经节; 三叉神经痛

The expression changes of BDNF in trigeminal ganglia of rats with trigeminal neuralgia

2018全国口腔生物医学学术年会

CHINESE NATIONAL ANNUAL CONFERENCE ON ORAL BIOMEDICINE

LIU LI-jUAN¹, YIN CAN-CAN¹, GUAN Shu², GE Hui-xiang², WANG Cong-rui³, GAO Yun⁴, XIONG Wei^{1,4}

1 Department of Preventive Medicine, Affiliated Stomatological Hospital of Nanchang University; 2 Basic medical college of Nanchang university; 3 Second clinical medicine of nanchang university; 4 The Key Laboratory of Oral Biomedicine, Jiangxi Province

Abstract: objective: To observe the expression changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and receptor TrkB in trigeminal ganglion (TG) of trigeminal neuralgia (TN) rats. **METHODS:** Animal model of trigeminal neuralgia was established by using the infraorbital nerve chronic injury compression model (ION-CCI). The sham operation group (Sham group) and the trigeminal neuralgia model group (TN group) were composed of randomly divided 180-220 g SD male rats. The mechanical threshold of the injury side of the two groups was determined by electronic pain meter. Quantitative real-time PCR(qPCR) technique and immunohistochemistry were used to detect the expression of BDNF and TrkB in the injured TG. Immunofluorescence double labeling technique was used to observe the co-expression of BDNF and NeuN. Meanwhile the changes in proinflammatory TNF- α and IL-1 β in the TG of the injured side were measured by qPCR. **RESULTS:** After two weeks of modeling, the mechanical pain threshold was significantly down-regulated in the TN group compared to the Sham group ($p < 0.05$). The results of qPCR showed that the BDNF and TrkB mRNA in the trigeminal ganglion of the TN group were significantly higher than those in the sham operation group. The immunohistochemistry results were consistent with the qPCR results ($p < 0.05$). The results of immunofluorescence double-labeling test showed that BDNF and NeuN were co-expressed in TG and the fluorescence intensity was significantly enhanced in TN group compared with Sham group. Besides, the levels of pro-inflammatory factors TNF- α and IL-1 β were also significantly increased in the TG of the TN group compared with the Sham group ($p < 0.05$). **Conclusion:** The expression of BDNF and TrkB in TG of ION-CCI rats is increased in trigeminal neuralgia group, which may be involved in the pathogenesis of trigeminal neuralgia and promote the pain transmission of trigeminal neuralgia.

Key words: BDNF; TrkB; trigeminal ganglion; trigeminal neuralgia

四 应用研究论文

牙发育异常一例浅析及文献学习

保珺 何莎莎 闫福华

南京大学医学院附属口腔医院/南京市口腔医院 牙周科

目的：通过探讨浅析一例牙发育异的临床及影像学特征，提高对该病的认识。

方法：回顾性分析一例牙发育异常的口腔颌面医学影像学特征及临床相关系统检查表现，尝试对该病提出诊断策略和思路。

结果：14岁男性患者，乳牙滞留7年，口内多数乳牙滞留，并伴有松动，曾于我院正畸科就诊，予以暂观。曾有两次出疹史及一次腰痛史，具体不详。曾有脊柱侧弯史，目前于鼓楼医院就诊。患者步入，神智清楚，听力正常，身高、全身毛发、四肢及皮肤弹性正常。否认其他系统性疾病史、治疗史及药物过敏史。母亲怀孕过程中无服药史及不良嗜好。否认家族史。口内检查：32-43牙冠呈琥珀色，II度松动。54、64、74、84MO，85O，51M、61MD龋坏，探(-)，乳牙I度松动且重度磨损，牙龈未见明显异常，上颌骨发育不良，上下颌牙槽嵴低平，下前牙拥挤，前牙反牙合。CBCT示：1、牙齿形态：

(1)冠部牙釉质及牙本质正常，多数牙根短小或缺如；(2)部分恒牙冠部髓腔闭塞，或呈新月形；(3)13、16、23、26牙根形成；(4)16、26髓室可见高密度影；(5)74、75、85根方低密度影。2、牙齿数量：(1)乳牙数量正常；(2)恒牙数量：28远中可见一多生牙。3、牙列：混合牙列。33-42已经萌出，其余恒牙胚均埋伏于骨内，萌出异常。4、颅骨形态及骨量：颅板、颅底、眶骨、蝶鞍骨质密度增生硬化、增厚。鞍背增高，蝶鞍变小，颞骨增厚，骨皮质变薄。5、颌骨形态及骨量：上下双侧颌骨对称，上颌骨发育不足，下颌骨略前突，下颌牙槽骨增厚，上下颌牙槽嵴低平，骨皮质变薄。6、颞下颌关节：双侧颞下颌关节间隙改变。

结论：本病例全口多数恒牙牙根短小或缺如罕见。根据其口腔颌面医学影像学特征及临床相关系统检查表现，是否可首先考虑I型牙本质发育不良？

RhoC基因对口腔鳞癌细胞增殖的影响

段萍 宿颖 张辛燕

首都医科大学附属北京口腔医院

口腔癌是较为常见的恶性肿瘤，占全身各类型恶性肿瘤的2.5%。在我国，90%以上的口腔癌为鳞状细胞癌，侵袭性强，预后较差，流行病学统计显示近年有逐渐上升的趋势。大量的研究表明口腔鳞癌的发生和发展是一个长期的、分阶段的、多种基因突变积累的复杂过程，是由多个激活的原癌基因、失活的抑癌基因，以及一系列信号转导通路改变参与完成的，其中任何一个因素的改变都可以引起细胞增殖和凋亡失去控制从而导致肿瘤的发生。癌细胞的无限增殖和转移是重要的肿瘤恶性生物学行为，大多数癌症患者死于肿瘤的复发和转移。因此基因治疗已经成为目前探索治疗恶性肿瘤的重要途径。Rho(Ras homologue)全称是Ras相似物，属于小分子G蛋白超家族成员，其亚家族Rho家族中的RhoA及RhoC成为目前的研究热点。有研究表明RhoC与肿瘤的侵袭相关性很高，能够促进肌动蛋白细胞骨架的重组，与细胞的运动密不可分，是一个转移相关基因。本研究重点研究RhoC基因对口腔鳞癌细胞增殖能力的影响。

目的：探讨RhoC基因对口腔鳞癌细胞增殖能力的影响。**材料和方法：**采用shRNA技术，将带有红色荧光标记的RhoC-shRNA的基因片段转染进入舌鳞癌细胞CAL-27作为实验组，其对应的慢病毒载体载体LV-RU6MP作为实验对照组，筛选培养稳定表达RhoC-shRNA和LV-RU6MP的细胞株，进行RT-PCR分析，检测转染后的CAL-27细胞中的RhoC基因表达。然后再通过MTT实验，验证经过转染RhoC-shRNA后对CAL-27的增殖能力的影响。**结果：**通过荧光显微镜下观察CAL-27的转染率达到85%左右；定量PCR实验证实转染RhoC-shRNA后CAL-27的RhoC基因表达与对照组相比明显降低 ($P < 0.01$)，差异具有统计学意义。MTT结果显示敲低RhoC基因表达后对口腔鳞癌细胞CAL-27细胞系的增殖能力影响无统计学意义。**结论：**通过转染RhoC-shRNA，降低CAL-27细胞系中RhoC基因的表达后，对CAL-27细胞系的增殖能力没有影响。

紫红素18-脂质体纳米粒子可视化和光热治疗头颈部肿瘤中的应用

高晔 李治治 刘富伟 张晏源 黄鑫 唐明玥 侯燕 靳丹 吕前欣 孔亮
空军军医大学第三附属医院

关键字：紫红素18-脂质体，头颈部肿瘤，可视化，光热消融

目的：

头颈部肿瘤包括颈部肿瘤、耳鼻喉科肿瘤以及口腔颌面部肿瘤三大部分，头颈癌是世界上第五种最常见的癌症。由于靠近头颈部关键解剖结构，从而增加了手术风险和放疗产生毒复作用的概率，所以仍然缺少有效治疗的疗手段，因此寻找一种安全、可控和精准最大化治疗目标肿瘤的手段是非常重要的。

材料与方法：

我们使用紫红素18与溶血磷脂通过有酰化机反应，生成共价连接物紫红素18-磷脂，使用高下液相、高分辨质谱对产物进行鉴定，柱色谱纯化得到较纯的紫红素18-磷脂，可作为脂质体膜材，使用薄膜水化，挤压法成功制备了新型光敏性紫红素18-脂质体，对紫红素18-脂质粒径、稳定性进行表征，使用红外热成像技术计策其体外的光热性能，利用小动物活体成像技术检测荧光，评估其在头颈部肿瘤中的富集情况，以及各脏器中的分布情况，体外细胞实验评估了其体外对肿瘤细胞光热消融杀伤的有效性。

结果：

通过前期的研究表明，有机反应成功制备了紫红素18-磷脂，纯化产物成分单一，可用于制备的紫红素18-脂质体，制备的纳米颗粒径大小100 nm左右，分散性良好，两个月内保持稳定，粒径分散系数均无显著变化，体外光热转化效率显著，温度可达到50°C，可用于体内光热肿瘤消融的治疗，体内近红外荧光成像信号清晰，脏器分布，在肿瘤部位富集较多，正常脏器中较少，体外光热消融，肿瘤细胞杀伤效果显著。

结论：

由于紫红素18-脂质体在体内肿瘤部位富集较多，荧光可用于体内治疗的指导，对正常组织的损伤较小，在成像指导下进行治疗可以实时观察肿瘤治疗进程，判断肿瘤治疗的效果，实现精准化治疗，体内可视化头颈部肿瘤指导下的光热消融治疗效果有待进一步研究，该研究为推头颈部肿瘤进可视化、精准治疗的应用进行了有益探索，可为头颈部肿瘤治疗提供了一种精准、安全和有效的治疗手段。

钛基钽涂层人工种植牙研制

贺慧霞 刘洪臣 路荣建 王飞翔 蔡洪桢 张桂兰 张绍清
解放军总医院口腔医学研究所 (100853)

目的 探讨采用等离子喷涂技术, 在钛基材料表面制备钽涂层进而研制钛基钽涂层人工种植体的可行性和可靠性, 为自主研发新一代性能优良的人工种植体奠定基础。**方法** 首先其次采用等离子喷涂技术在钛片表面制备钽涂层, 扫描电镜 (SEM)、采用x-线衍射、接触角测量仪检测其理化性能, 筛选最佳喷涂参数、涂层厚度和结合强度; 将细胞接种在钛基钽涂层材料表面, 通过扫描电镜及图像分析、CCK-8细胞活性及RT-PCR成骨分化相关基因ALP、BMP-2、OPN、Runx2检测细胞与材料的生物相容性; 最后制备钛基钽涂层人工种植体, 将其植入犬下颌牙缺失区, 体内植入3个月, 通过组织形态学、Micro-CT影像学及种植体骨结合率 (BIC%), 对比评估钛基钽涂层人工种植体组织相容性和成骨活性。**结果** 采用等离子喷涂技术在喷涂距离90-110mm、电压30mv参数条件可制备厚度120um的钛基钽涂层材料, 涂层结合强度可达65MPa, SEM显示: 该参数下, 钽涂层表面呈致密熔融状, 纹理更为细密、均匀, 涂层表面钽含量最高, 达98.86%, 与对照钛基钽涂层和喷沙钛组比较, 钽涂层组接触角最小 ($p < 0.05$), 亲水性最强。牙周膜干细胞接种于材料表面, SEM细胞在材料表面黏附、增殖、分泌基质颗粒, Image J软件分析表明: 钽涂层表面细胞最于两个对照组, 而且细胞接种后3d、7d, CCK-8检测钽涂层组细胞增殖最快 ($p < 0.05$), 成骨诱导7d、14d, 钽涂层表面细胞较对照组高表达成骨相关基因ALP、BMP-2、OPN、Runx2。将该参数条件下制备的钛基钽涂层人工种植体植入犬下颌骨缺牙区牙槽骨内, 3月组织学显示钛钽种植体周围有大量新骨形成, 沉积于种植体表面, 植体与骨之间较少看到纤维组织间隙, 而对照组钛基钽涂层、喷砂钛组植体与骨组织间可见长短不一、宽窄不等的纤维组织间隙, 钽涂层组种植体BIC%为 $84.25 \pm 5.6\%$, 对照组Strauman和钛涂层组分别是 $74.89 \pm 3.7\%$ 和 $73.18 \pm 2.5\%$, Micro-CT示钽涂层种植体螺纹间骨呈齿状与植体紧密结合, 无低密度间隙, 与Strauman对照组之间无显著差别, 而钛涂层对照组植体和较高密度的骨之间可见少量间断的低密度线影。**结论** 采用等离子喷涂技术自主研发的钛基钽涂层人工种植体具有良好的理化、机械和生物性能, 植入体内显示优异的成骨诱导活性, 是一种安全可靠、极具应用前景的新型人工种植体。

关键词: 等离子喷涂 钽涂层 人工种植体

不同参数的飞秒激光对口腔软组织的消融效率评价

李文君, 吕培军*

北京大学口腔医学院·口腔医院 口腔医学数字化研究中心, 北京大学口腔医学院·口腔医院 口腔修复教研室, 口腔数字化医疗技术和材料国家工程实验室, 卫生部口腔医学计算机应用工程技术研究中心, 口腔数字医学北京市重点实验室。

目的:飞秒激光在许多外科手术中是一种有效且安全的手术工具, 但其对口腔软组织消融效果的研究较少。本研究的目的是用1030nm的飞秒激光对口腔软组织消融的效率进行评价。

方法:获取8只SD大鼠舌体样本。1030nm飞秒激光由计算机系统控制, 保持激光出光口距离舌体表面4.7mm(焦距), 垂直于舌体长轴切长度为3mm的线型切口, 切口间隔大于1mm, 每个舌体六个切口, 分别使用不同的功率和扫描速度, 连续扫描2000次, 具体参数如下: (I): 3W, 2000mm/s; (2): 3w, 4000 mm/s; (3): 5 w, 2000mm/s; (IV): 5w, 4000mm/s; (V): 8w, 2000mm/s (VI): 8w, 4000 mm/s。每组参数重复五次。用三维形貌测量激光显微镜对深度进行测量, 对消融后的组织进行固定、脱水、染色, 观察其组织有无碳化、坏死。

结果:激光功率, 扫描速度对消融效率进行了定量分析。消融深度与功率成正比, 与扫描速度成反比 ($p < 0.05$), 使用参数3 W, 4000 mm/s的消融深度最低($72.63 \pm 6.47 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$)。最大的消融深度参数为8 W, 2000 mm/s ($696.19 \pm 35.37 \mu\text{m}$) 或8w, 4000 mm/s ($681.16 \pm 55.65 \mu\text{m}$) ($p < 0.05$)。组织病理学观察显示切缘整齐, 未见明显的碳化和坏死。观察5W, 2000mm/s组1, 3, 5天生长状况, 两端组织生长状况良好, 五天内伤口愈合, 未见明显瘢痕。

结论:本实验证明了1030-nm飞秒激光应用于口腔软组织消融具有临床可接受的消融效率, 且未引起明显组织碳化坏死, 有望应用于飞秒激光口腔软组织手术机器人。

关键词: 飞秒激光, 口腔软组织, 消融深度, 组织病理, 生长状况

无缝界面仿生双相CAN-PAC水凝胶在软骨缺损中的应用

廖金凤

四川大学华西口腔医学院¹, 香港理工大学²

目的:

构建和制备一种新型的无缝连接仿生双相水凝胶用于软骨全缺损修复

材料与方法:

通过热反应快速交联方法, 利用两层之间的密度差制备了用于软骨缺损再生的双相CAN-PAC水凝胶。上层水凝胶通过CSMA与NIPAm交联, 下层水凝胶由PECDA, AAm和PEGDA组成。首先, 通过葡萄糖酸钙和藻酸盐的物理交联, 实现了两层界面的结合, 然后通过其他组分之间的碳-碳双键的化学交联。通过SEM、micro-CT、力学测试仪等对水凝胶的形貌、孔径、力学性能等进行表征。并通过细胞及动物实验, 研究水凝胶的细胞和组织相容性、降解性能、软骨缺损修复等。

结果:

仿生双相CAN-PAC水凝胶的上层和下层的平均孔径分别为187.4 μm 和112.6 μm , 模量为0.065 MPa和0.261MPa。该双相水凝胶具有模拟成分、模拟结构和模拟刚度特性, 为维持软骨和骨细胞的附着和生存提供了微环境。与此同时, 体内研究表明CAN-PAC水凝胶具有良好的生物降解性和相容性。此外, 将双相水凝胶植入建立的兔软骨缺损模型, 在水凝胶组的再生组织中发现新的透明软骨和修复后的软骨下骨。

结论:

无缝连接仿生双相CAN-PAC水凝胶可以促进软骨全缺损的修复, 为软骨缺损修复支架的设计和制备提供重要的参考。

用国产羟基磷灰石人工骨粉进行位点保存的临床对比研究

马晓杰

南京医科大学附属口腔医院

[摘要]目的 种植区域充足的骨量是保证种植成功率以及美学效果的重要前提。但拔牙后，由于拔牙时的创伤，术后牙槽骨的吸收重建以及功能刺激的丧失，常使得牙槽嵴骨大量吸收，而出现不利于种植的牙槽嵴形态。为了防止或减缓拔牙后牙槽嵴骨的吸收，促进新骨形成，保存良好的软硬组织形态，为种植体植入提供有利的环境，专家学者提出了拔牙位点保存的概念。拔牙位点保存术是在拔牙后即刻在拔牙窝内植入骨替代品等生物材料，减少骨吸收，以最大程度保存骨组织，引导和促进拔牙区域的骨再生，从而避免或减少日后种植时复杂的骨增量和软组织增量手术，减小创伤，缩短疗程。已有许多动物及临床研究证明位点保存的可行性和较好的效果。目前，我国种植牙开展日益广泛，但国产的骨替代材料不多，远不能满足临床骨增量手术的需要。本研究拟通过在新鲜的拔牙窝内植入国产羟基磷灰石人工骨粉，并以Bio-Oss作参照，对比观察临床上国产天博骨粉在拔牙后位点保存方面的效果，为位点保存提供临床依据。**材料与方法** 将30名患者分为试验组（15人）与对照组（15人），试验组拔牙后即刻填充国产人工骨粉（天博齿固，北京意华健科贸公司，北京），对照组拔牙后即刻充填Bio-Oss（盖氏，瑞士），并拍摄锥形束CT（Cone-beam computed tomography, CBCT）；6个月时复查并拍摄CBCT，观察牙槽嵴骨高度及宽度的变化。牙槽嵴骨高度通过牙槽嵴长轴测得，牙槽嵴骨宽度于舌侧牙槽嵴顶下方1mm(W_1)，4mm(W_2)，7mm(W_3)处测得。**结果** 术后一周拆线时，创口愈合良好，未见感染及缝线脱落等现象，所有患者术后无肿痛等不适反应。六个月时患者牙槽嵴形态保存尚可，未见凹坑等不良形态。通过CBCT测量及计算得出，试验组牙槽骨高度平均下降 $5.32\% \pm 13.09\%$ ，宽度平均减少 $W_1=16.07\% \pm 17.42\%$ ， $W_2=10.39\% \pm 9.88\%$ ， $W_3=5.13\% \pm 2.28\%$ ；对照组牙槽嵴骨高度平均下降 $9.90\% \pm 8.48\%$ ，宽度平均减少分别为 $W_1=17.42\% \pm 21.83\%$ ， $W_2=9.88\% \pm 12.93\%$ ， $W_3=2.28\% \pm 9.84\%$ 。试验组和对照组在牙槽嵴骨保存方面无明显差异（ $P>0.05$ ）。**结论** 应用国产羟基磷灰石人工骨粉和Bio-Oss骨粉进行位点保存均可以减少拔牙位点牙槽嵴骨的吸收，有利于牙槽嵴骨的保存。

含铜钛合金的生物相容性及其抗菌性研究

孙莹莹^{1,2} 陈超¹ 林敏魁^{1,2*}

福建医科大学附属口腔医学院; 福建省口腔生物材料工程技术研究中心

目的:

本研究采用选择性激光熔化技术 (selective laser melting, SLM) 制备的含铜钛合金, 并将其与人牙龈成纤维细胞 (human gingival fibroblast, HGF) 及变形链球菌 (Streptococcus mutans, SM) 共同培养, 探究含铜钛合金的细胞生物相容性及对口腔细菌的抗菌能力, 以期运用于牙体修复学领域。

材料与方法:

- 1、采用酶消化法分离培养HGF, 倒置显微镜下观察细胞形态;
- 2、将Ti6Al4V-Cu、Ti6Al4V按3cm²浸泡于DMEM培养液, 在37°C和5%CO₂的培养箱环境中培养72h, 获取浸渍液待用。
- 3、将HGF接种于96孔板进行培养, 待24h贴壁后, 加入浸渍液, 加入后分别在24h和72h分别加入CCK-8试剂, 通过CCK-8检测法检测细胞增殖能力。
- 4、将HGF接种于Ti6Al4V-Cu、Ti6Al4V, 分别在培养2h、4h、6h, 经过固定, 使用DAPI染料进行染色, 于荧光倒置显微镜下观察, 定量计算细胞的贴附量。
- 5、将Ti6Al4V-Cu、Ti6Al4V与SM共同培养, 24h后, 通过Vortex振荡器将表面附着细菌洗脱, 取50uL洗脱液涂布于BHI琼脂平板上, 72h后进行计数, 检测两者抗菌性。
- 6、将Ti6Al4V-Cu、Ti6Al4V与SM共同培养, 24h后, 使用Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit进行染色, 利用激光共聚焦显微镜进行观察, 后期利用软件计算活细菌与死细菌的比值。

结果:

- 1、HGF原代培养呈克隆集落样生长, 形态呈长梭形。
- 2、CCK-8检测法检测细胞增殖情况, 结果表明细胞的增殖未受影响, 在24h和72h, 三组细胞均增殖良好, Ti6Al4V-Cu与Ti6Al4V及空白对照组无统计学差异。
- 3、DAPI染色结果表明, Ti6Al4V-Cu、Ti6Al4V与细胞共同培养2h、4h、6h, 均可见细胞贴附良好, 细胞的贴附量与时间成近似正比例关系, 两组细胞结果无统计学差异。
- 4、平板计数结果表明, SM与Ti6Al4V-Cu、Ti6Al4V共同培养24h, Ti6Al4V-Cu组显示具有显著的抗细菌粘附能力, 抗菌能力达99%以上。
- 5、激光共聚焦显微镜观察, 定量分析细菌死亡情况, 结果也表明Ti6Al4V-Cu表面死细菌量/活细菌远远大于Ti6Al4V, 表明其具有较强的抗菌能力。

结论:

- 1、Ti6Al4V-Cu不影响细胞的增殖及贴附能力, 表明其具有良好的生物相容性。
- 2、Ti6Al4V-Cu对变形链球菌具有较强的抗粘附及杀菌作用。

3、Ti6Al4V-Cu有望成为牙体修复的材料选择，但仍需要更深入地研究来验证。

低能激光通过促进血管形成和干细胞分化

提高骨再生能力

白杰 张耀扬 柏滢文 李丽君 王福*

大连医科大学口腔医学院

目的: 最近研究表明血管与成骨密切藕联。低能激光治疗(Low-level laser therapy, LLLT) 已被证实能够影响多种体外培养细胞的生长状况及细胞因子的分泌, 动物实验显示LLLT能够促进血管形成、骨折愈合和干细胞成骨分化。但LLLT能否藕联血管形成和成骨修复尚不清楚。本研究通过体内体外实验, 研究LLLT能否通过促血管形成和成骨分化提高骨修复再生能力。

材料与方法: 将骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 共同培养, 使用完全成骨诱导培养基对细胞成骨诱导, 实验组采用功率40mW, 波长808nm的GaAlAs激光器照射6min/d, 于7d和21d分别用碱性磷酸酶 (ALP) 和茜素红 (ARS) 染色以及RT-qPCR检测成骨效果。建立三维共培养体系, 将BMSCs和HUVECs接种于Matrigel基质胶中培养, 处理组采用功率40mW, 波长808nm的GaAlAs激光器照射6min, 分别于0, 3, 6h显微镜下观察拍照, 观察血管形成效果。将BMSCs复合支架材料植入裸鼠皮下, LLLT局部照射, 3个月后检测成骨和血管形成效果。

结果: BMSCs和HUVECs共同培养成骨诱导, ALP和ARS染色显示实验组成骨能力高于对照组, RT-qPCR检测实验组ALP和RUNX2表达高于对照组, 机制上, RT-qPCR检测显示实验组TGF- β , VEGF, HIF-1 α 等因子的表达高于对照组, 降低TGF- β 和HIF-1 α 减弱LLLT促进成骨的能力。三维共培养体系3h时LLLT照射组细胞增殖聚集明显, 开始形成结节状结构, 并与相邻的结节形成结合, 变化明显。6h时LLLT照射组HUVECs结节相互连接形成类似管状结构, 形成的管径直径较大; 对照组细胞聚集成较大细胞团, 但是管状结构较少。动物实验显示, LLLT照射组移植物新骨形成和微血管数量都高于对照组。

结论: LLLT能够促进干细胞骨向分化及促进血管形成, 这种作用分别与LLLT提高TGF- β 和HIF-1 α 表达密切相关。进一步明确低能激光藕联血管形成和促进骨再生机制将有助于推动临床转化。

关键词: 低能激光治疗 骨再生 血管形成

Prx1细胞在小鼠出生后牙体组织中的谱系示踪

王华, 孙雯

南京医科大学口腔医学院口腔基础学系

江苏省口腔疾病研究重点实验室

摘要

目的: 转录因子Prx1 (Paired-related homeobox gene 1) 作为间充质细胞 (Mesenchymal stem cells, MSC)的标示物, 已被广泛应用在间充质细胞系特异性敲除或过表达靶标基因。但是, 目前尚无明确的证据证明Prx1在小鼠出生后的牙体组织中是否有表达。本研究旨在揭示Prx1细胞在小鼠出生后牙体组织中的谱系示踪。

材料与方法: 为了研究Prx1细胞在小鼠出生后牙体组织中的谱系示踪, 我们构建了Prx1-Cre/ROSA^{nTnG}小鼠模型, 并利用组织学、冰冻切片和荧光显微镜观察的方法研究Prx1细胞在小鼠出生后牙体组织中的谱系示踪。

结果: 在Prx1-Cre/ROSA^{nTnG}小鼠的牙体组织中, 所有的Prx1-Cre细胞及它们的子代细胞均表达GFP绿色荧光 (图i & iii), 而所有的Prx1-Cre阴性细胞及它们的子代细胞均表达tdTomato红色荧光 (图ii & iii), 图iv为图iii相邻切片的HE染色。通过对出生后3天和4周的小鼠牙体组织观察, 我们发现许多Prx1-Cre 细胞位于小鼠下颌第一磨牙的髓角处 (图A&C); 在出生后3天, 髓角处约10%的牙髓细胞显示GFP绿色荧光 (图A); 而在出生后4周, 髓角处约20%的牙髓细胞显示GFP绿色荧光 (图C)。此外, 在出生后3天和4周小鼠牙体组织的其他区域, 特别是根尖牙乳头, 并无Prx1-Cre 细胞的表达 (图B&D)。

结论: Prx1细胞在小鼠出生后3天和4周的牙体组织中有表达, 主要位于髓角处的牙髓细胞, 而根尖牙乳头处无Prx1细胞存在。

抗坏血酸碳点促进口腔鳞癌上皮间充质转化的研究

王梓霖¹ 布文免¹ 刘莉莉¹ 陈希¹ 孙茂蕾¹ 孙宏晨^{1,2*}

¹吉林大学口腔医学院 ²中国医科大学口腔医学院

目的: 通过将抗坏血酸碳点作用于口腔鳞癌细胞, 检测抗坏血酸碳点处理后的口腔鳞癌细胞形态的变化、上皮和间充质标记物变化, 迁移能力的变化, 从而确定抗坏血酸碳点对口腔鳞癌上皮间充质转化的影响。

材料与方法: 以择抗坏血酸为原料, 微波法制备碳点; MTT法筛选适合实验的浓度; 在适合的浓度下, 用不同浓度和时间处理口腔鳞癌细胞系。显微镜下观察处理后的口腔鳞癌形态变化; 通过RT-PCR检测上皮间充质转化相关基因, Western Blot检测上皮间充质转化相关蛋白的表达; 利用划痕实验和Transwell迁移实验检测处理后的细胞迁移能力。

结果: MTT法检测发现碳点处理口腔鳞癌后不会促进增值; 碳点诱导72小时后可见鳞状细胞明显向梭形变化; RT-PCR检测发现E钙黏蛋白和CK19表达降低而Vimentin和Fibronectin表达升高, Western Blot检测发现E钙黏蛋白表达降低而Snail、Vimentin和Fibronectin表达升高; 划痕实验和Transwell迁移实验发现碳点处理后的口腔鳞癌细胞迁移能力增强, 且具有浓度依赖性和时间依赖性。

结论: 抗坏血酸碳点能够促进促进口腔鳞癌细胞发生上皮间充质转化。

斑马鱼口腔癌转移模型的建立

文金林¹ 尹盼盼¹ 李林蔚² 王强² 张辛燕¹

首都医科大学附属北京口腔医院¹

中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室²

研究背景: 口腔癌是一种头颈部常见的恶性肿瘤, 发病率约占全身恶性肿瘤发病率的

5%，容易发生淋巴结转移，预后较差。近年来随着口腔癌的发病率不断上升，深入研究口腔癌的转移机制变得尤为重要。斑马鱼是一种小型淡水鱼，由George Streisinger在稻田和恒河支流中偶然发现，因其成鱼体积小，仅3-4cm，繁殖周期短，3个月左右，养殖成本低，所以易获取大量的胚胎用于实验研究。斑马鱼基因与人类基因的相似度达到了87%，并且具有繁殖快、花费较少、实验周期短等优势，最近几十年在生物科学领域得到了广泛的应用。相比于传统的小鼠模型，斑马鱼口腔癌转移模型有两个主要优势，首先，斑马鱼不受动物数量的限制，每个实验可以使用成百个胚胎；其次，斑马鱼胚胎发育前三天完全透明，可以使用高分辨率共聚焦显微镜对单细胞进行成像。**研究目的：**建立斑马鱼口腔癌转移模型。**材料与amp;方法：**培养人口腔鳞癌细胞CAL27，构建LVRU6MP慢病毒表达载体，包装病毒颗粒，感染CAL-27，筛选得到带有LVRU6MP慢病毒载体的CAL-27细胞系。消化离心CAL-27/LVRU6MP细胞，用不含FBS的DMEM:High Glucose培养基重悬，镜下调整细胞密度达到 $3 \times 10^{10}/L$ 。选用48hpf（受精后小时）的野生型斑马鱼胚胎，脱膜，并加入适量三卡因麻醉，摆放于琼脂糖显微注射模具上。注射前拉针，上样，在油盘中调整液滴大小，定量10nl，约300个细胞。将CAL-27/LVRU6MP细胞悬液依次注入斑马鱼的卵黄中后部，1h后筛选肿瘤细胞仅局限于卵黄部位的斑马鱼，放入28°C培养箱，每隔一日使用荧光体视镜观察肿瘤细胞的生长和转移。**研究结果：**0 dpi(注射后天数)观察发现，肿瘤细胞表达红色荧光，并成团块聚集于卵黄中部。1 dpi观察发现，肿瘤细胞未转移，仍大量聚集在卵黄。3 dpi观察发现，尾部出现了带有红色荧光的CAL-27/LVRU6MP细胞，同时肝脏部位也出现了转移的CAL-27/LVRU6MP细胞。**研究结论：**通过显微注射方法我们初步建立了人口腔鳞癌细胞CAL-27斑马鱼口腔癌转移模型。

儿童复发性腮腺炎与免疫紊乱的关联

吴书凤 石欢 叶蕾 俞创奇 郑凌艳

上海交通大学附属第九人民医院口腔外科

关键字：儿童复发性腮腺炎；免疫抑制；免疫功能

背景：儿童复发性腮腺炎是一种常见的儿童腮腺疾病，临床表现为反复的腮腺区肿胀、

疼痛。本病临床治疗方法单一、疗效较差，主要是急性期予以抗炎治疗，使得疾病有所缓解，一段时间后再次急性发作，频繁的发作严重干扰了儿童的正常生活。影响本病治疗效果的主要原因在于本病的病因和发病机制尚不明确，推测发病可能与机体的免疫功能有关。

研究目的：从来我院就诊的儿童复发性腮腺炎患者的实验室检查中探讨儿童复发性腮腺炎与患者自身免疫功能异常的关联，探讨免疫功能异常对儿童复发性腮腺炎的发病的影响。

研究方法：2017-2018年来上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔外科就诊的共100位儿童复发性腮腺炎患儿进行免疫功能检测，并按照不同年龄组与正常儿童的免疫功能相比较，正常值对照取自于自愿体检的儿童，同100位。

研究结果：儿童复发性腮腺炎患儿6岁及6岁以上年龄组CD4 明显低于6岁以下年龄组，IgG显著高于6岁以下年龄组。与正常儿童相比，6岁以下儿童复发性腮腺炎患儿CD8、IgG、IgE、IgA及C3明显升高，而CD4明显降低；6岁及6岁以上组儿童复发性腮腺炎患儿CD8、IgE及C3明显高于正常对照组。

研究结论：儿童复发性腮腺炎患儿的免疫功能可能异常，表现为细胞免疫处于抑制状态，体液免疫功能表达不充分。超敏反应及免疫功能紊乱均可能参与了儿童复发性腮腺炎的疾病过程。

神经肽P物质对生物陶瓷材料iRoot BP Plus成骨性能的影响

谢俐萍，曹显，魏智宸，杨敏，胡亚男，陈卓暄，汪瑶，金幼虹
南昌大学附属口腔医院牙周科

目的：

有研究证明哺乳动物的骨与骨膜中存在大量的的感觉神经和交感神经纤维，这些纤维所释放的神经肽、神经递质和神经激素可以维持骨形成与骨吸收之间的平衡。神经肽

P物质 (以下简称SP) 是由11种氨基酸构成的多功能神经肽, 它即是营养因子、神经调节因子, 又是神经递质, 在骨代谢的正常生理和发病机理中扮演着关键的角色。iRoot BP Plus是一种较新的、需要预混合的生物活性陶瓷类修复材料, 具有很好的封闭性、生物活性和生物相容性, 对成骨亦有促进作用。本实验通过建立大鼠空白对照亚组、iRoot BP Plus亚组、iRoot BP Plus+ SP亚组骨缺损模型, 探讨iRoot BP Plus的生物活性和SP对成骨的影响, 为改良iRoot BP Plus成骨性能提供相应的实验依据, 为慢性根尖周炎和慢性牙周炎引起的骨丧失提供更多治疗方法。

方法:

按照手术后2、4、8、12周4个时间点将32只SD雌性大鼠随机分为4组, 每组8只。在每只大白鼠的颅顶中线磨出3个深1.5mm, 直径为2mm的圆孔形骨缺损, 每个缺损相距2mm, 每个骨缺损内由前向后分别、依序放置血块、iRoot BP Plus、iRoot BP Plus+ SP, 从而建立空白对照亚组、iRoot BP Plus亚组、iRoot BP Plus+ SP亚组骨缺损模型。手术后分别在2、4、8、12周用过量麻药处死每个时间点的8只大鼠, 取颅盖骨切片, 进行HE染色和Masson染色, 观察炎症细胞的情况, 并进行组织形态定量分析, 评估新骨形成的质和量。

结果:

4个时间点中的骨缺损均存在炎症反应, 其中4周组炎症反应最重, 12周组炎症反应最轻, 骨缺损中的材料均有溶解反应。在2周组和4周组, iRoot BP Plus亚组、iRoot BP Plus+SP亚组与空白对照亚组相比, 炎症反应程度更轻 ($P<0.05$)。在4周组和8周组, 与空白对照亚组相比, iRoot BP Plus亚组、iRoot BP Plus+SP亚组新骨生成更多 ($P<0.05$)。在4周组, 与iRoot BP Plus亚组相比, iRoot BP Plus+SP亚组新骨生成更多 ($P<0.05$)。

结论:

- (1) 从新骨生成的结果可以得出结论: SP在一定时间段可以促进新骨生成。
- (2) 从骨缺损炎症的分级情况可以得出: iRoot BP Plus, iRoot BP Plus+SP均具有良好的炎症调节作用和成骨性能。

乳牙列学龄前儿童中与年龄增长及龋病发生相关的唾液

微生物群落的动态变化—两年随访研究

徐磊, 陈晖, 李晓东
浙江大学医学院附属口腔医院

目的: 通过一项两年的随访研究, 揭示乳牙列学龄前儿童中与年龄增长以及龋病发生相关的唾液微生物群落的动态变化。 **方法:** 从杭州地区的幼儿园中招募自愿参加的拥有完整乳牙列的无龋儿童, 每隔6个月收集一次唾液样本, 总计5次 (T0, T1, T2, T3和T4)。根据最后一个时间点上的口腔检查情况, 受试者最终被分为了健康组 (H-H) 和龋病转化组 (H-C)。利用Illumina MiSeq平台系统对获取的100个唾液样本进行基于16S rDNA V3-V4可变区的高通量测序, 从而获得唾液微生物组的信息进行比较分析。 **结果:** 实验获得了4328852条高质量序列用于生物学信息分析, 分别代表了14个门、27个纲、42个目、67个科以及127个属水平的微生物。 α 多样性分析显示各组之间无显著差异, β 多样性分析显示唾液微生物群落结构随着龋病的发生而导致显著改变。线性判别分析(LFfSe)揭示奇异菌属、巨球菌属以及韦荣氏球菌属是龋病发生的可靠的生物标记物, 此外, shuttleworthia和罗氏菌属与牙齿健康相关。在乳牙列前期的唾液微生物群落组成中, 巨球菌属和韦荣氏球菌属起重要作用, 而在乳牙列后期的唾液微生物群落组成中, 消化球菌属、罗氏菌属以及密螺旋体属起重要作用。 **结论:** 乳牙列学龄前儿童的唾液微生物群落随着龋病的发生以及年龄的增长发生一定的改变, 这些结果为我们提供了在乳牙列时期有关龋病发生和年龄增长的唾液微生物群落变化的新的认识。

关键词: 唾液微生物群落; 乳牙列; 追踪研究; 龋病; 年龄增长; Illumina MiSeq

硝酸盐防治骨质疏松大鼠牙周炎的作用

徐亿普, 李向春, 胡亮, 常世民, 王松灵

首都医科大学附属北京口腔医院 牙再生与口腔组织功能重建北京市重点实验室

摘要

背景与目的: 牙周炎是一种以牙周结缔组织丧失与牙槽骨吸收为特征的炎症性疾病。越来越多的研究表明, 牙周炎与包括骨质疏松症在内的许多慢性疾病密切相关。牙周炎和

骨质疏松症都是以骨质破坏为特征的疾病，在成年人中发病率很高。而骨质疏松症会增加体内的炎症因子，而这些炎症因子也会参与牙周炎的发展，促进牙槽骨吸收，因此对于伴有骨质疏松的牙周炎治疗在临床上存在一定的难度。近年来研究显示口服硝酸盐对维持机体内的硝酸盐-亚硝酸盐-一氧化氮（NO）平衡十分重要，可有效降低血压、维持血管稳态、增强脑血流灌注等。本研究利用去卵巢和丝线结扎的方式对大鼠进行骨质疏松症和牙周炎造模，通过口服无机硝酸盐，观察对伴有骨质疏松的牙周炎防治作用。

材料和方法：将30只实验用SD大鼠（11-12周龄，体重260-290 g，雌性），进行去卵巢手术，并分成5组，每组6只：正常对照组，牙周炎组，牙周炎+0.2 mM/kg/d硝酸盐组，OVX+牙周炎组，OVX+牙周炎+0.2 mM/kg/d硝酸盐组。连续给药8周后处死大鼠。通过大鼠的牙槽骨的组织学染色，micro-CT检测，骨密度检测，牙槽骨丧失测量来评估硝酸盐对于伴有骨质疏松的牙周炎防治作用。

结果：牙周炎组和OVX+牙周炎组与正常对照组相比牙槽骨丧失显著上升，而服用硝酸盐后，牙槽骨丧失程度与牙周炎组和OVX+牙周炎组相比，均得到有效恢复。

结论：硝酸盐能够有效防治大鼠的牙周炎和伴有骨质疏松大鼠的牙周炎。

一种骨组织特异性靶向系统依赖的Sema3a基因

疗法减缓骨质疏松小鼠骨丢失

杨凯 边专 张玉峰

武汉大学口腔医学院

目的：探究骨组织特异性靶向系统(AspSerSer)₆-(STR-R8)依赖的Sema3a基因疗法是否可以减缓骨质疏松小鼠骨丢失

材料与方法：构建Sema3a的真核过表达质粒pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP，转染293E细胞，western blot检测蛋白表达情况。(AspSerSer)₆-(STR-R8)是一种骨组织特异性靶向系统。8周龄雌性昆明小鼠，随机分为7组，每组6只：（1）假手术小鼠，给予PBS（2）OVX小鼠，给予PBS（3）OVX小鼠，给予(AspSerSer)₆-(STR-R8)（4）

OVX小鼠，给予(AspSerSer)₆-(STR-R8)和pcDNA3.1(+)-GFP的混合物 (5) OVX小鼠，给予pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP (6) OVX小鼠，给予(AspSerSer)₆-(STR-R8)和pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP的混合物 (7) OVX小鼠，给予雌激素。给药频率为每周两次，四周后，小鼠处死。股骨冰冻切片检测GFP的表达和组织免疫荧光染色检测*Sema3a*的表达来评估(AspSerSer)₆-(STR-R8)的靶向效率；MicroCT三维重建，统计各组小鼠股骨Bone mineral density, Bone volume/Tissue volume, Trabecular Thickness, Trabecular Separation等指标；HE染色及safraninO染色观察骨量情况并定量分析，TRAP染色检测破骨细胞数目，免疫组化检测成骨标志物COL 1的表达情况。

结果：Western blot结果证实，与对照组相比，转染pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP组，*Sema3a*蛋白高表达（ $P<0.001$ ）。股骨冰冻切片显示(AspSerSer)₆-(STR-R8)+pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP组中GFP高表达，对照组中未检测到绿色荧光；组织免疫荧光显示(AspSerSer)₆-(STR-R8)+pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP组中*Sema3a*的表达量显著高于(AspSerSer)₆-(STR-R8)+pcDNA3.1(+)-GFP组；MicroCT结果显示，与对照组相比，给予(AspSerSer)₆-(STR-R8)和pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP的混合药物组小鼠股骨Bone mineral density, Bone volume/Tissue volume, Trabecular Thickness值更高，Trabecular Separation值更低；HE染色及safranin O染色证实(AspSerSer)₆-(STR-R8)+pcDNA3.1(+)-*Sema3a*-GFP组中股骨骨量高于对照组（ $P<0.001$ ； $P<0.01$ ）；TRAP染色和免疫组化染色结果证实与对照组相比，靶向药物组中破骨细胞的数目更少，成骨细胞的数目更多，且差异具有统计学意义（ $P<0.01$ ； $P<0.001$ ）。

结论：1，骨靶向系统(AspSerSer)₆-(STR-R8)可以特异性地靶向*Sema3a*过表达真核质粒到骨组织，且*Sema3a*能够在体内正常表达。2，骨组织特异性靶向系统依赖的*Sema3a*基因疗法可以减缓骨质疏松小鼠骨丢失，且主要是通过促进成骨细胞的形成和抑制破骨细胞的分化发挥作用。

基于全基因组扫描的面部侧貌特征的研究

关键词: 颅颌面, 全基因组关联研究, 机器学习, 单核苷酸多态性

背景: 人类面部多样性是一个重要的, 复杂的, 很大程度上在科学上未被解释的, 却明显处于基因调控之下的表型。研究人类基因组在面部外貌中的重要性正受到越来越多的关注, 并已经检测出几种重要的单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)。

方法: 在这项研究中, 我们对超过1400名正常的中国汉族人侧貌特征进行了全基因组关联研究 (Genome-Wide Association Study, GWAS)。按照美国正畸协会标准对头颅侧位片进行了描记, 用组间相关系数 (Intraclass correlation coefficients ICC) >0.90的14个标记点描述个体的侧貌特征。对于侧貌特征使用一般普氏分析 (General Procrustes analysis, GPA) 和主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 得到连续表型。在全基因组关联研究之后, 对达到显著性位点上下游100kb区域进行贝叶斯精细作图 (Bayesian fine-mapping) 来定位可能的致病性位点, 并分析了相关基因在小鼠胚胎的颅颌面发育过程中的表达模式。另外, 用Roadmap Epigenetic Project 数据库中127种表观基因组数据来评估潜在显著性的SNP位点 (P 值 $<1E-05$) 的染色质状态, 然后通过使用包括来自GTEx数据库的表达数量性状基因座 (expression Quantitative Trait Loci, eQTL) 数据, FANTOM5数据库中启动子和增强子之间的相关性数据以及Hi-C的启动子捕获数据, 将每个SNP定位到目标基因, 进行通路富集分析。最后使用机器学习的方法来开发使用合并高连锁不平衡 (Linkage Disequilibrium, LD, $r^2>0.8$) 后的所有潜在显著性的SNP位点 (P 值 $<1E-05$) 对侧貌特征进行预测的支持向量机 (Support Vector Machine, SVM) 模型。

结果: 我们发现2个关联信号达到全基因组显著性 (P 值 $<5E-08$), 对鼻部侧貌的特征有显著影响。其中最显著的rs14234743 ($P=1.80E-13$) 位点位于基因 *SUPT3H/RUNX2* 高连锁区域中, 另一个最显著的位点rs76225308 ($P=5.23E-9$) 位于基因 *PDE11A* 内含子上。贝叶斯精细作图发现可能的致病位点分别是rs9369549 (Posterior probability=0.433) 和rs2573079 (Posterior probability=0.245), 并且均位于增强子区。在小鼠胚胎期E10.5-E14.5的基因表达中发现 *Pde11a* 和 *Runx2* 在上颌突近中均有表达并呈上升趋势。通路富集分析发现潜在显著性的SNP相关的目标基因主要在Wnt信号通路、染色质修饰和转录后调控通路中富集。在机器学习的预测模型中, 预测的各个侧貌特征点与实际点之间两个维度的总体绝对误差平均值 (Mean of Absolute Errors, MAE) 约为2毫米。

结论: 本研究为颅颌面发育的遗传病因学和侧貌预测提供了重要依据。

不同方式远移尖牙过程中龈沟液RANKL /OPG比值变化的研究

赵刚 金轶男

佳木斯大学口腔医学院

[摘要] **目的** 探讨不同加力方式远移尖牙的速度及过程中龈沟液内核因子 κ B受体活化因子配体/骨保护素比值 (RANKL /OPG) 表达的相关性。**方法** 选取20例上颌第一双尖牙减数治疗的患者, 随机分为橡皮链加力组和弹力线加力组, 实施远中移动尖牙, 分别于加力前, 加力 4周, 8周, 12周后测量尖牙移动量和收集龈沟液, 采用ELISA法进行龈沟液RANKL和OPG浓度检测, 计算出相应龈沟液中的RANKL/OPG比值。**结果** 随着远中移动尖牙的距离增加, 橡皮链加力组与弹力线加力组的龈沟液内RANKL/OPG比值均有所升高, 在第8周和第12周时, 橡皮链加力组龈沟液内RANKL/OPG比值升高较弹力线加力组龈沟液内RANKL/OPG比值的升高呈明显差异性 ($P < 0.05$)。尖牙移动到位后拍摄CBCT无明显牙根吸收现象。**结论** 橡皮链加力组的骨改建作用强于弹力线加力组, 龈沟液中 RANKL / OPG比值与骨改建过程具有相关性。

光控细胞薄层技术制备预血管化复合细胞片及生物学性能研究

周颖, 朱慧勇, 俞梦飞, 余丹, 王慧明

浙江大学医学院附属口腔医院

浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科

研究目的:

运用组织工程技术构建生物骨在临床治疗上具有重要意义, 而构建物早期的血管化

是其应用的关键因素。本课题组应用基于TiO₂ 纳米点的光控细胞薄层技术，优化制备了一种新的可转移的预血管化复合细胞片并进一步探索其生物学性能，为组织工程骨组织修复提供基础。

研究方法：

悬涂法制备TiO₂纳米点薄膜，将不同比例的间充质干细胞 (MSC) 和血管内皮细胞 (EC) 共培养于多种培养基中，接种于薄膜上。免疫荧光技术检测成血管效应，细胞增殖试验及碱性磷酸酶试验检测细胞的新陈代谢能力及成骨效应，筛选出最佳性能的MSC-EC复合细胞片。进而通过紫外照射使细胞片脱附，活死细胞染色及免疫荧光进一步检测细胞片的活性及预血管化能力。

研究结果：

免疫荧光结果显示混合低糖培养基加促成骨分化液能促进血管网络生成。MSC与EC以50/50比例共培养时，细胞增殖能力及成骨能力均明显上升。紫外照射脱附后能获得完整的细胞片且具备良好的细胞活性及血管化效应。

研究结论：

本研究运用光诱导的细胞片技术优化制备了一种可转移的预血管化MSC-EC复合细胞片，为实现体外构建培养血管化骨组织提供可能。

关键字： TiO₂，纳米点薄膜，预血管化，光控，细胞片

应用BIOMED-2 引物系统检测腮腺MALT淋巴瘤中的Ig基因重排的初步研究

朱慧勇，张亚敏，刘杭飞，孙霞飞

浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科

目的： 分析免疫球蛋白克隆重排检测对于腮腺MALT淋巴瘤的诊断价值。

材料与方法： 收集浙江大学医学院附属第一医院口腔颌面外科从2009年至2017年期间通过H.E染色和/或免疫组化 (Immunohistochemistry, IHC) 方法确诊为腮腺MALT淋巴瘤患者8例和腮腺淋巴上皮病变患者13例。应用BIOMED-2引物系统对21份标本的福尔马林固定石蜡包埋(Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE)组织切片

进行DNA提取及PCR扩充, 采用异源双链分析 (heteroduplex analysis, HA) 目标DNA片段的免疫球蛋白重链 (immunoglobulin heavy chain, IGH链) 的基因重排和轻链 (Kappa) 的限制性表达情况, 检测分析标本组织细胞的克隆性。

结果: (1) 经基因重排检测, 17名患者被确诊为腮腺MALT淋巴瘤, 其中47.06%患者有舍格伦综合征病史多年; (2)应用IGH VH-JH FR1, FR2, FR3, IGK V κ -J κ , 和 IGK (V κ -Kde and intron-Kde) 作为基因重排引物的检出率分别是76.47%, 82.35%, 88.24%, 29.41%和35.29%, 此外, 联合应用IGH VH-JH FR1, FR2, FR3作为基因重排引物检出率为100%; 联合应用IGK V κ -J κ , 和 IGK (V κ -Kde and intron-Kde) 作为基因重排引物检出率为58.82%。

结论: (1) 应用BIOMED-2引物系统对腮腺MALT淋巴瘤组织进行免疫球蛋白基因重排检测准确率较高, 是高度可靠的诊断方法; (2) 经常规组织学检测方法 (HE染色, 免疫组化) 诊断为淋巴上皮病变的病人, 若合并舍格伦综合征病史, 建议进一步行基因重排检测, 降低误诊率。

一种新型聚合物修饰钛种植体表面抗菌抗黏附的研究

曾蕾 朱艺文 俞丙然 毋育伟 徐福建 唐志辉
北京大学口腔医学院; 北京化工大学

目的:

钛种植体表面易黏附细菌导致种植体周围感染, 探索一种能够简便合成, 且同时实现抗菌、抗黏附功能的钛表面抗菌涂层处理方法。

材料与方

通过单点开环反应将传统抗生素庆大霉素分别和PEGDGE、EGDE合成为超支化聚合物GPEG和GEG, GPEG因含有庆大霉素和PEGDEGE具有抗菌抗黏附功能, GEG因含有庆大霉素具有抗菌功能。同时PEGDGE与乙二胺通过聚合反应成为EPEG, EPEG因含有PEGDGE具有抗黏附功能。表面包被聚多巴胺的钛片Ti-PDA作为预处理对照组, 浸泡在聚合物溶液中, 形成钛表面功能性涂层Ti-GPEG、Ti-GEG、Ti-EPEG。检测聚合物的核磁共振氢谱及聚合物修饰钛表面的X射线光电子能谱。检测获得钛片的生物相容性。

梯度稀释得到不同浓度的聚合物溶液,测得聚合物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度。将所得钛片浸泡在含有金葡菌或大肠杆菌的LB培养基中,4小时后,分别采用活死染色加激光共聚焦显微镜和扫描电镜观察抗菌效果;7天后,使用3D激光共聚焦显微镜观察抗生物膜效果。

结果:

核磁共振氢谱结果显示聚合物成功合成, X射线光电子能谱结果表明聚合物成功修饰钛片表面。细胞毒性实验及溶血实验表明聚合物修饰钛片具有良好的生物相容性。GPEG溶液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度为 $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ 和 $256 \mu\text{g mL}^{-1}$, GEG由于庆大霉素含量较高,最小抑菌浓度分别为 $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ 和 $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。EPEG不具备抗菌功能。菌液中孵育4小时后激光共聚焦显微镜下观察到Ti-PDA表面有大量活菌, Ti-EPEG表面有少量活菌, Ti-GEG少量死菌, Ti-GPEG死菌更少。扫描电镜下Ti-PDA和Ti-EPEG表面细菌外形光滑规整, Ti-GEG、Ti-GPEG表面细菌坍塌变形。7天后Ti-PDA表面形成了菌斑生物膜, Ti-EPEG表面有少量活菌, Ti-GEG表面有较多死菌, Ti-GPEG表面仅残余少量死菌。

结论:

通过开环反应成功合成具有抗菌抗黏附功能的聚合物,并成功修饰钛片表面,所得聚合物修饰钛片具有良好的抗菌抗黏附功能。

乳牙牙髓干细胞及其分泌物对视网膜色素变性的治疗作用

李晓霞¹, 杨丽萍³, 赵玉鸣¹, 王衣祥², 葛立宏¹

¹北京大学口腔医学院, 儿童口腔科²北京大学口腔医学院, 中心实验室

³北京大学第三医院, 眼科中心

背景:

视网膜色素变性以感光细胞丢失为主要特征, 干细胞治疗是十分有前景的治疗方式。间充质干细胞具有神经分化潜能, 并可通过旁分泌作用发挥免疫调节、神经营养、抗炎等功能。乳牙牙髓干细胞 (stem cells from exfoliated deciduous teeth, SHEDs) 具有间充质干细胞的典型特征, 包括多向分化潜能和旁分泌功能。课题组前期研究证实

SHEDs在体外可诱导分化为视网膜感光样神经细胞。目前尚无关于SHEDs对视网膜色素变性的治疗作用的报道。将SHEDs及其分泌物 (conditioned medium, CM) 注射到视网膜色素变性小鼠的视网膜下腔, 观察视网膜结构与功能的变化情况, 以研究SHEDs与SHEDs-CM对视网膜色素变性的治疗作用。

目的:

将SHEDs及其分泌物 (conditioned medium, CM) 注射到视网膜色素变性小鼠的视网膜下腔, 观察细胞存活与视网膜结构与功能的变化, 以研究SHEDs与SHEDs-CM对视网膜色素变性的治疗作用。

材料与方法:

通过48h血清饥饿、超滤离心提取SHEDs-CM。慢病毒转染将萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase, FLUC) 转入SHEDs基因得到稳转株, 在移植前8-12小时用红色细胞膜染料CM-Dil标记SHEDs, 以进行SHEDs的体内示踪和组织切片定位。研究用到的视网膜色素变性模型小鼠 (*RPGR*-knockout) 由杨丽萍老师赠予。将SHEDs, SHEDs-CM和对照 α -MEM培养基注射到小鼠视网膜下腔。移植后1w, 2w, 3w, 4w进行SHEDs治疗组和对照组小动物活体成像, 移植后1month通过组织切片定位SHEDs; 免疫荧光检测移植后1个月视网膜感光细胞标志rhodopsin和opsin的表达, 以观察视网膜结构变化; 移植后1个月进行视网膜电图检测, 以观察视网膜功能变化。

结果:

获得稳定表达FLUC的SHEDs, 并将SHEDs标记上CM-Dil, 且成功进行视网膜下腔移植。小动物成像结果显示SHEDs移植后1w眼睛局部发射强烈的生物发光信号, 2w时信号减弱; 1个月组织切片上CM-Dil 标记的SHEDs位于视网膜下腔, 呈红色、圆形。SHEDs与SHEDs-CM治疗组视网膜rhodopsin与opsin的表达整齐、密实, 对照组的表达则紊乱、稀疏。视网膜电图结果显示, 暗适应0.01 (scotopic 0.01) 条件和明适应3.0 (photopic 0.01)条件下, SHEDs与SHEDs-CM治疗组 b波波幅均高于对照组, 具有统计学差异。

结论:

SHEDs移植入视网膜色素变性小鼠视网膜下腔后, 可在体内维持良好活性至少1个月。SHEDs及SHEDs-CM可改善小鼠视网膜的结构与功能, 具有治疗视网膜色素变性的潜力。

可注射GC/Alg双网络水凝胶促VECs和BM-MSCs

成血管成骨分化作用的研究

杨聪翀¹, 屈小中^{2*}, 王晓燕^{1*}

¹北京大学口腔医学院²中国科学院大学

目的: 本研究通过动态共价键交联与离子相互作用制备可在生理条件下具有可注射性的GC/Alg双网络水凝胶, 探究其在三维细胞包载及促人血管内皮细胞(VECs)和骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)成血管成骨分化的作用。

材料与方法: 1. 分别以羟乙基壳聚糖(GC)与端苯甲醛基修饰PEO(OHC-PEO-CHO)、海藻酸盐(Alginate, Alg)与钙离子构筑第一、第二网络, 通过席夫反应和静电相互作用的两种动态交联实现在生理环境条件下(pH=7.4, 37°C)的双网络凝胶化。

2. 利用上述方法制备的可注射GC/Alg双网络水凝胶, 体外包载VECs和BM-MSCs, 实现三维细胞培养, 并通过CCK-8检测两种细胞在该水凝胶中的增殖能力。

3. 通过Real-Time RT-PCR、免疫荧光、HE染色检测两种细胞在该水凝胶中的成血管、成骨分化作用。

4. 建立裸鼠皮下注射动物模型, 通过HE染色检测GC/Alg双网络水凝胶体内诱导成血管、成骨分化的作用。

结果: 1. 通过倒置显微镜、扫描电镜下观察, VECs和BM-MSCs在GC/Alg双网络水凝胶中呈球形形态生长良好, 实现三维细胞包载培养; CCK-8结果显示两种细胞在该水凝胶中呈现持续增殖, 混合培养后增殖能力增强。

2. Real-Time RT-PCR、免疫荧光、HE染色结果显示, VECs和BM-MSCs在GC/Alg双网络水凝胶中呈现良好的成血管、成骨分化作用, 且混合培养后其成血管成骨分化作用增强。

3. 裸鼠皮下注射体内实验结果显示, GC/Alg双网络水凝胶具有良好的体内生物相容性; HE染色结果显示, GC/Alg双网络水凝胶促VECs和BM-MSCs体内形成血管样组织, 混合培养后成血管分化作用强, 可形成成熟的血管组织。

结论: 本研究证实利用两种动态交联方法制备的可注射GC/Alg双网络水凝胶具有良好的三维细胞载体性能, 并能够促VECs和BM-MSCs增殖能力及成血管、成骨分化作用。

microRNA-222应用于组织工程骨神经化构建的研究

雷蕾, 刘中宁, 姜婷*,
北京大学口腔医院修复科

目的: 骨组织工程中, 血管化神经化的构建能够形成骨再生的仿生微环境, 促进结构有序的仿生骨形成。然而, 以往组织工程骨研究中鲜有对于神经化构建的研究。本研究通过筛选出的miR-222和构建的温敏介孔二氧化硅微球凝胶载体, 开展促进骨再生中神经化构建的研究。本研究旨在探索组织工程骨神经化构建的有效方法, 并进一步探究神经化对于骨组织再生的作用和意义。

材料和方法: ①体外培养人骨髓间充质干细胞 (hBMSCs), 将miR-222阴性对照 (NC)、模拟物(mimics)以及抑制物(inhibitor)分别转染hBMSCs, 并向神经向诱导。Real-time PCR、Western Blot及免疫荧光方法检测神经相关标记物MAP2、Nestin、NG2、 β -III Tubulin、NGF以及GFAP的表达情况。②采用荧光素酶报告基因系统、Real-time PCR和Western Blot方法探究miR-222的作用靶基因。敲低和过表达靶基因, 进一步阐明miR-222促进hBMSCs神经向分化的分子机制。③合成温敏介孔二氧化硅微球凝胶(MSNs), 装载miR-222及促成骨药物阿司匹林 (Aspirin), 透射电镜观察材料形貌, 通过凝胶阻滞实验选择材料的最佳包载配比, 测定MSN凝胶材料的核酸及药物缓释效率。④建立大鼠下颌骨缺损模型, 通过MSN凝胶将miR-222及Aspirin缓释于骨缺损区域, 10周后应用micro CT测量新生骨体积, H&E、Masson以及神经相关标记物的免疫染色, 观察缺损区域成骨以及成神经的情况。

结果: ①神经相关蛋白MAP2、Nestin、NG2、NGF、 β -III Tubulin、NG2和GFAP在miR-222 mimics组的表达均显著高于NC和inhibitor组 ($P < 0.05$)。②miR-222通过靶向抑制nemo-like kinase (NLK)基因, 正向调节Wnt/ β -catenin通路, 进而促进神经向分化。③MSN凝胶在室温呈液态, 在33 $^{\circ}$ C交联形成凝胶, MSNs最佳包载microRNA的质量比为15:1。MSN凝胶能稳定缓释包载miRNA和aspirin的MSN粒子, 并能模拟在谷胱甘肽作用下大量释放miRNA。④动物实验表明, 包载miR-222/Aspirin的MSN可以促进骨缺损处的新生骨生成, 而同时新生骨中神经相关标记物及降钙素基因相关肽 (CGRP) 表达量显著增强。

结论: miR-222通过结合NLK基因, 正向调节wnt/ β -catenin通路, 从而促进BMSCs

的神经向分化。本研究开发的温敏介孔二氧化硅微球凝胶能有效在骨缺损处控释 miR-222/Aspirin，该凝胶体系能够显著促进组织工程骨的形成和神经化。miR-222及控释体系有望进一步应用于组织工程骨的神经化构建及神经再生。

氟芬那酸对于人间充质干细胞成骨向分化的影响 及其在骨质疏松预防中的应用

刘雪楠 张萍 刘云松* 周永胜
北京大学口腔医院修复科

目的：探究不同浓度氟芬那酸（FFA）对于人间充质干细胞（hMSCs）体内外成骨向分化的影响，对体外成脂向分化的影响，以及其对小鼠骨质疏松的预防作用。

材料与方法：在体外对hMSCs进行成骨诱导，通过碱性磷酸酶染色及定量、矿化结节茜素红染色及定量、实时荧光定量PCR检测不同浓度FFA对hMSCs体外成骨向分化的影响。同时在体外对hMSCs进行成脂诱导，通过油红O染色及实时荧光定量PCR检测不同浓度FFA对hMSCs体外成脂向分化的影响。根据体外成骨诱导实验筛选出FFA促成骨的最佳浓度后，将用最佳浓度FFA处理过的细胞与骨粉混合植入裸鼠背部皮下，通过组织切片染色检测其对间充质干细胞体内成骨的影响。并通过卵巢切除建立小鼠骨质疏松模型，通过腹腔注射，按照促成骨最佳药物浓度给药一月，后通过Micro-CT及组织切片染色检测其股骨骨质疏松情况。

结果：碱性磷酸酶染色及定量、矿化结节茜素红染色及定量、实时荧光定量PCR结果显示较低浓度的FFA对hMSCs体外成骨向分化有促进作用，随着药物浓度的增加这种促进作用增强，在50 μ M时达到最强。之后随着浓度增加促进成骨作用减弱。当浓度达到200 μ M时对人脂肪干细胞成骨向分化有抑制作用。油红O染色及实时荧光定量PCR结果显示较低浓度的FFA能够促进hMSCs体外成脂向分化，在25 μ M时，对人脂肪干细胞成脂向分化有显著的抑制作用，随着药物浓度的增加，这种抑制作用不断减弱。当浓度达到200 μ M时对人脂肪干细胞成脂向分化不再有显著抑制作用。50 μ M浓度的FFA处理过的hMSCs体内成骨效果增强，且该浓度的FFA能够减轻卵巢切除小鼠的骨质疏松。

结论：不同浓度FFA对hMSCs成骨及成脂向分化作用不同，50 μ MFFA能够在体内外显著促进成骨，且减轻卵巢切除小鼠的骨质疏松。此外，25 μ MFFA对hMSCs体外成脂向分化有显著抑制作用。

PTH 通过促进HDAC4核转移治疗早期颞下颌关节炎

张俊¹, 皮彩霞¹, 樊怡¹, 崔晨¹, 周洋¹, 孙建勋¹, 徐欣¹, 叶玲¹, 周学东¹, 郑黎薇^{1*}
¹口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院

目的: 颞下颌关节炎 (Temporomandibular Joint-Osteoarthritis, TMJ-OA) 是一种颞下颌关节功能紊乱性疾病, 其病理改变主要表现为软骨进行性变性, 软骨下骨重建失衡。目前颞下颌骨关节炎的治疗方法主要为缓解颞下颌关节炎症状, 缺乏明确的对因治疗, 关节结构的病理性改变疗效不理想。PTH作为调节钙磷代谢的激素, 可以调控软骨细胞的分化和骨代谢。近年来, 研究显示PTH通过促进HDAC4核转移调节骨代谢, 并且HDAC4在软骨细胞的低表达与骨关节炎发病有着密切的关系。因此, 本课题探讨HDAC4在颞下颌骨关节炎发病过程中的生物学作用, 探索PTH调控HDAC4在颞下颌关节软骨和软骨下骨的表达, 从而可调节的干预TMJ-OA的发病过程。

材料和方法: 通过正畸力作用改变大鼠磨牙位置造成实验性异常牙合力, 一个月后行micro-CT扫描大鼠离体颞下颌关节组织, 分析颞下颌关节软骨下骨组织相关参数(BV/TV, Tb/Sp, Tb/Th), 组织切片免疫组化染色后观察关节软骨形态学改变与骨重建相关标记物 (CollagenX, MMP13) 的表达情况。利用颞下颌关节炎模型, 间断注射PTH (1-34) 一个月后观察颞下颌关节软骨及软骨下骨组织结构的改变情况。收集大鼠的颞下颌关节组织, 通过micro-CT扫描分析骨相关参数并统计分析(BV/TV, Tb/Sp, Tb/Th); 组织学切片并染色后观察关节软骨形态学改变与骨重建相关标记物的表达情况 (如: CollagenX, MMP13, TRAP, osterix)。通过免疫染色观察和q-PCR分析颞下颌关节炎模型的软骨和软骨下骨HDAC4表达情况; 诱导下颌骨间充质干细胞骨分化过程中, 利用Western blot 分析PTH调节下颌骨间充质细胞的HDAC4核转移的信号通路。

结果: 异常咬合力诱导颞下颌关节软骨基质发生变性, 软骨细胞高表达MMP13和collagenX, 软骨下骨骨量降低, TRAP阳性细胞增加, osterix阳性细胞减少, HDAC4低表达在软骨细胞和软骨下骨。间断的给予PTH后, 使得颞下颌关节炎模型的软骨层CollagenX和MMP13表达下降, 软骨下骨的骨量增加, osterix的阳性细胞增加。PTH促进异常表达的HDAC4进入细胞核, 从而抑制软骨细胞的Runx2的表达, 促进下颌间

充质干细胞的骨分化。

结论: 在异常咬合力建立的早期颞下颌关节炎模型中, 间断的给予PTH, 促进软骨和软骨下骨异常低表达的HDAC4核转移, 从而缓解颞下颌关节炎发病早期的软骨和软骨下骨的结构变化。因此, PTH可能是治疗颞下颌关节炎的潜在药物。

双功能化氧化石墨烯应用于种植体表面基因修饰的研究

张力 张玉梅* 赵钦民*

空军军医大学口腔医院

研究目的:

探索双功能化氧化石墨烯材料应用于种植体表面siRNA修饰的可行性, 为种植体表面基因修饰提供新的思路。

材料方法:

1: 以石墨粉为原料, 制备纳米化氧化石墨烯(GO)。将聚乙二醇(PEG)和聚乙烯亚胺(PEI)通过化学方法结合在氧化石墨烯表面, 制备生成双功能化氧化石墨烯nGO-PEG-PEI。

2: 将nGO-PEG-PEI与促成骨Ckip-1siRNA相结合, 通过体外实验, 筛选出最适宜加载的氮/磷配比(N/P), 制备nGO-PEG-PEI/siCkip-1复合物。

3: 运用阴极电沉积的方法, 将nGO-PEG-PEI/siCkip-1(GPP/siCkip-1)复合物加载于纳米化种植体(NT)表面, 通过体外实验, 优化加载电压及加载时间。并对修饰后的种植体NT-GPP/siCkip-1进行表征。

4: 通过体外细胞实验, 研究该种植体GPP/siCkip-1复合物的入胞效率及体内成骨活性。

5: 将该种植体植入小鼠股骨内, 通过体内动物实验, 研究并评价该种植体的体内成骨效应。

结果:

1: 通过一系列化学反应, 成功制备双功能化氧化石墨烯基因载体nGO-PEG-PEI。

2: 该基因载体能够有效加载成骨Ckip-1siRNA, 同时我们筛选出了适宜的载体基因配比, 可用于后续体内外研究。

3: 通过阴极电沉积, 该载体基因复合物nGO-PEG-PEI/siRNA能够高效的加载于纳米化种植体表面, 同时我们也筛选出合适的加载时间和电压。

4: 该载体基因复合物修饰于种植体表面后, 能够高效转染入胞, 并在细胞内发挥作用, 促进了该种植体的体内外骨结合。

结论:

双功能化氧化石墨烯能够作为基因载体应用于种植体表面修饰, 其加载便捷高效, 入胞效率高。该研究为种植体表面基因修饰以促进成骨提供了新的思路。

近红外二窗多模态纳米粒子在口腔鳞癌精准治疗中的应用研究

王玉凤, 张皖苏, 孙鹏飞, 胡勤刚, 韩伟
南京大学医学院附属口腔医院

目的: 口腔鳞癌患者多采用综合治疗方案, 但过去数十年来生存率并无明显提升。手术切除是口腔鳞癌的主要治疗方法, 但肿瘤切除不完整、转移淋巴结清除不彻底易造成术后复发和远处转移, 因此迫切需要一种术中软组织导航的方法。近来近红外二窗 (NIR-II, 1000-1700nm) 成像备受瞩目, 这种成像清晰迅速, 而且较近红外一窗 (NIR-I, 650-950nm) 成像的穿透深度更深, 受生物组织自身信号干扰更小, 是软组织成像较为理想的方式。此外肿瘤患者对化疗药物顺铂 (CDDP) 的耐受也是导致治疗失败的一大原因, 因此化疗联合光热治疗的方式逐渐成为研究热点。本课题组合成了一种NIR-II探针TQTPA, 并制备以透明质酸 (HA) 为外壳、负载TQTPA和CDDP的纳米粒子, 并探索其肿瘤成像和治疗的多模态潜力、评估其术中导航指导肿瘤切除的能力。

材料与方法: 将TQ和TPA通过Suzuki偶联反应合成TQTPA, 经紫外吸收和发射确定其吸收和发射波长范围; 超声法制备纳米粒子HT@CDDP, 通过动态光散射和透射电镜检测其形态、大小和稳定性, 并检测其释放特征、光热性能、细胞毒性, 在原位舌癌裸鼠模型中检测成像性能、二窗引导下实施手术切除, 并评估其抗肿瘤能力。

结果: TQTPA最大吸收峰760nm, 最大激发波长1016nm, 处于NIR-II范围; HT@CDDP粒子呈球形, 直径约110nm, 体外释放受pH和HA酶调控; 光热性能稳定, $300\mu\text{g mL}^{-1}$ TQTPA经1.5W照射温度上升 40.5°C , 细胞杀伤效果显著; 在裸鼠原位舌癌模型中, HT@CDDP可明显富集在肿瘤部位, 成像清晰, 与周围组织界限清楚, 并可检测出直径1mm的转移淋巴结; 二窗引导下可完整切除肿瘤组织, 保留较多正常组织; 与单纯应用CDDP相比, HT@CDDP纳米粒子联合激光显著抑制肿瘤增长, 无明显系统毒性。

结论: 本研究制备了NIR-II探针TQTPA并合成纳米粒子HT@CDDP, 体外和体内实验皆证实其良好的成像能力、光热性能、抗癌能力和生物安全性, 实现了肿瘤和转移淋巴结成像同时联合化疗与光热治疗的多模态治疗策略。

抗血管生成与光治疗相结合，实现肿瘤 协同治疗的新型纳米颗粒

卫峥，蔡宇，韩伟

南京大学医学院附属口腔医学院；南京市口腔医院

目的：将癌症抗血管生成治疗与光动力治疗整合为一种治疗策略，以提高抗肿瘤的治疗效果。

材料与方法：本研究中，我们通过纳米再沉淀方法将抗血管生成剂——索拉非尼与光敏剂——Ce6组装成多功能纳米颗粒（SC-NP_s）。SC-NP_s可以通过破坏血管生成切断肿瘤细胞的外部营养和氧供给进行肿瘤饥饿治疗，并通过温和的光疗（光动力疗法和光热疗法）杀死内部肿瘤细胞，实现自外向内，里应外合的肿瘤治疗。

结果：Ce6不仅是光疗的主体，光动力治疗会消耗肿瘤内部氧分，氧气消耗协同抗血管治疗增强肿瘤饥饿治疗效果，此外，SC-NP_s对肿瘤具有优异的水分散性，并且纳米级别的SC还可以通过EPR效应实现肿瘤被动靶向，而Ce6又可以作为荧光剂实现活体内肿瘤荧光成像进行实时检测。

结论：本研究中我们充分挖掘药物的特性，实现Ce6一剂三用，同时将抗血管生成治疗和光疗的协同并整合，我们发现，具有良好生物相容性的SC-NP_s能在较低剂量（0.2 mg/kg）的同时有效地切断肿瘤血管并杀死肿瘤细胞。

转导Shh 基因治疗小型猪腮腺放射损伤

胡亮¹，朱钊¹，海波²，王松灵^{1,3}

¹首都医科大学附属北京口腔医院²美国农机大学³首都医科大学

目的:

本研究旨在验证经由腮腺导管逆行投递Ad-RatShh基因,是否可以在小型猪腮腺内成功表达,并建立大型动物小型猪基因转导模型。在此模型上进行Shh 基因转导治疗小型猪腮腺放射损伤有效性以及机制研究。

材料与方法:

雄性巴马小型猪,42头。首先验证Ad-RatShh基因转导表达情况,正常实验动物右侧腮腺转导 2×10^{10} vp Ad-RatShh/ GFP,分别于第3天、7天、14天处死实验动物,每组3只实验动物。其次研究Rat-Shh基因转导治疗小型猪腮腺放射损伤的有效性,实验动物右侧腮腺接受20 Gy 单次放疗,左侧为正常对照侧,分别于放疗早期第四周以及放疗晚期第16周给与基因转导治疗或者GFP作为对照,连续观测唾液流率并进行相关唾液分泌指标检测。最后探讨Ad-RatShh基因治疗小型猪腮腺放射损伤的相关机制,于放疗后第四周转导Ad-RatShh/ GFP,一周后处死实验动物,进行副交感神经、微血管、增殖衰老、自噬水平等相关机制检测。

结果:

经由腮腺导管逆行投递Ad-RatShh基因可以在小型猪腮腺内一过性表达,转导第3天表达较高,第7天下降,至第14天消失,而放疗不会诱导Shh基因的表达。放疗早期转导Ad-RatShh基因可以有效的防护小型猪腮腺放射损伤,部分恢复唾液流率,维持腺体基本形态,减轻腺体纤维化程度,增加局部微血管密度。检测基因转导1周样本,副交感神经相关指标(Ache, BDNF, NRTN)表达增加,血管内皮生长因子(VEGF)水平上升,增殖指标(C-kit)、自噬(LC3B)表达增强,凋亡指标(P21)水平下降。

结论:

经由腮腺导管逆行投递Ad-RatShh基因可以在小型猪腮腺内成功表达,并呈一过性表达。Ad-RatShh基因转导可以通过副交感神经、微血管保护作用,维持腺体细胞自噬及增殖活性、降低衰老等机制,有效的治疗小型猪腮腺放射损伤,部分恢复唾液流率。

硝酸盐防治骨质疏松大鼠牙周炎的作用

徐亿普, 李向春, 胡亮, 常世民, 王松灵

首都医科大学附属北京口腔医院 牙再生与口腔组织功能重建北京市重点实验室

背景与目的: 牙周炎是一种以牙周结缔组织丧失与牙槽骨吸收为特征的炎症性疾病。越来越多的研究表明, 牙周炎与包括骨质疏松症在内的许多慢性疾病密切相关。牙周炎和骨质疏松症都是以骨质破坏为特征的疾病, 在成年人中发病率很高。而骨质疏松症会增加体内的炎症因子, 而这些炎症因子也会参与牙周炎的发展, 促进牙槽骨吸收, 因此对于伴有骨质疏松的牙周炎治疗在临床上存在一定的难度。近年来研究显示口服硝酸盐对维持机体内的硝酸盐-亚硝酸盐-一氧化氮(NO)平衡十分重要, 可有效降低血压、维持血管稳态、增强脑血流灌注等。本研究利用去卵巢和丝线结扎的方式对大鼠进行骨质疏松症和牙周炎造模, 通过口服无机硝酸盐, 观察对伴有骨质疏松的牙周炎防治作用。

材料和方法: 将30只实验用SD大鼠(11-12周龄, 体重260-290 g, 雌性), 进行去卵巢手术, 并分成5组, 每组6只: 正常对照组, 牙周炎组, 牙周炎+0.2 mM/kg/d硝酸盐组, OVX+牙周炎组, OVX+牙周炎+0.2 mM/kg/d硝酸盐组。连续给药8周后处死大鼠。通过大鼠的牙槽骨的组织学染色, micro-CT检测, 骨密度检测, 牙槽骨丧失测量来评估硝酸盐对于伴有骨质疏松的牙周炎防治作用。

结果: 牙周炎组和OVX+牙周炎组与正常对照组相比牙槽骨丧失显著上升, 而服用硝酸盐后, 牙槽骨丧失程度与牙周炎组和OVX+牙周炎组相比, 均得到有效恢复。

结论: 硝酸盐能够有效防治大鼠的牙周炎和伴有骨质疏松大鼠的牙周炎。

胚胎二细胞显微注射技术制备可传代的

携带致死性基因的动物模型研究

张婧

首都医科大学附属北京口腔医院

目的:

通过胚胎二细胞显微注射技术制备可传代的携带致死性基因的动物模型的方法使小鼠体内产生致死性基因的敲除, 研究致死性基因在体内的功能。

材料与方法:

我们将Cas9 mRNA和sgRNAs联合注入到胚胎二细胞阶段的一个胚粒中, 并生成

具有致命突变的存活的嵌合体小鼠。利用这种方法，我们创建了携带突变的Slc17a5、Ctla4（出生后致死率）；Virma或Dpm1（胚胎致死率）的亲代小鼠，得以存活的小鼠能够通过杂交将突变传递给F1代。

通过对具有Slc17a5突变的存活的嵌合体小鼠进行检测，我们确定了在成年小鼠的唾液腺以及肝脏中，Slc17a5在唾液分泌功能以及肝组织中调节脂质代谢方面的新功能。

结果：

1. 通过胚胎二细胞显微注射技术，产生可遗传的、出生后致命突变的亲代小鼠
2. Slc17a5基因调控成年小鼠颌下腺腺细胞的存活和分泌，调节小鼠肝脏的脂质代谢
3. 通过胚胎二细胞显微注射技术，产生可遗传的、胚胎致命突变的亲代小鼠

结论：

这种通过胚胎二细胞显微注射技术制备可传代的携带致死性基因的动物模型的方法使小鼠体内产生致死性基因的敲除，并且可以研究致死性基因在体内的功能，显著地扩展了目前遗传工具的应用。

钛表面以相转移溶菌酶为模版诱导羟基磷灰石涂层的制备

杨洁

天津医科大学口腔医院/天津医科大学第二医院

目的：

纯钛由于其良好的生物相容性而成为了临床应用最广泛的种植体材料。然而纯钛作为一种惰性材料，生物活性较差。因此许多研究通过对种植体表面进行改性来改善纯钛种植体生物惰性的问题。其中，由于羟基磷灰石涂层可以显著提高钛种植体的生物活性而成为近年来应用最广泛的种植体表面改性技术。但是，目前所报道的制备羟基磷灰石涂层技术的方法相对复杂，制造条件较为苛刻，制造成本较高。因此，寻找一种简单、有效、快速制备羟基磷灰石涂层的方法已成为迫切之需。本论文以基于相转变溶菌酶为模版，利用其表面丰富的功能基团，在体外模拟生物矿化的过程，以仿生矿化的方式在

纯钛表面形成一层均匀致密的羟基磷灰石涂层。

材料与方法：

调节溶菌酶的浓度，还原剂三(2-羧乙基)磷酸盐TCEP的PH值，而后将各种直径的钛片经过打磨抛光后浸泡于上述两种溶液混合液中，取出后孵育2个小时制得经PTL改性的钛片。利用溶菌酶相转化产物（PTL）表面所含的丰富的功能基团将经过PTL改性的钛片浸泡于CaCl₂溶液中完成螯合钙离子的过程，进一步根据静电吸引的相互作用将其浸泡于模拟体液（SBF）中，在体外模拟生物矿化的过程，从而在钛片表面成功的制备出羟基磷灰石涂层。将各组钛片分别进行材料学的表征，对相转变溶菌酶为模板的羟基磷灰石生物涂层表面表面形貌、性质和元素组成进行观察和分析。将大鼠骨髓间充质干细胞（BMSC）进行体外培养，将其定值于经过羟基磷灰石生物涂层改性的钛片表面来评价它的生物相容性。

结果：

结果表明经过PTL改性的钛片确实形成了羟基磷灰石涂层，经一系列的材料学表征显示形成的涂层与天然骨和牙齿中的羟基磷灰石成分相似。一系列的细胞实验的结果证明经过羟基磷灰石改性的钛片具有良好的生物相容性和骨引导性。

结论：

利用相转变溶菌酶（PTL）改性后的钛片可以在体外模拟生物矿化的过程，该技术操作过程简单快速、环保温和、并且制备出的羟基磷灰石涂层形貌可控，机械性能稳定，有望实现临床转化成为种植体表面改性的一项新型技术。

破骨细胞靶向递送miR-141对老年恒河猴骨质疏松症的治疗作用

蔡明详，王晓刚*，孙瑶*

同济大学附属口腔医院，上海市组织修复与再生工程技术研究中心

目的：老年性骨质疏松症是一种严重的老年代谢性疾病，大约30%的绝经后妇女患有骨质疏松症，其中40%以上的妇女因骨质疏松症有骨折的风险。虽然多种药物已被广泛应用于治疗骨质疏松症，但由于药物治疗效用不足和不良反应，当前骨质疏松症治疗药物仍不理想。以小核酸miRNA为基础的基因治疗是一种快速发展的疾病治疗策略，具有生产规模大、安全性高、疗效快等优点。到目前为止，miRNA药物已被用于癌症治疗

的研究中。然而，在灵长类动物中，miRNA药物尚未被报道为治疗以破骨细胞为靶点的骨质疏松症的候选药物。此外，由于选择性给药效率低下、对细胞的靶向递送水平不足以及意外副作用等，其疗效受到了限制。本研究通过探讨miR-141对破骨细胞骨吸收功能的抑制作用，并靶向递送miR-141至破骨细胞，研究其在老年恒河猴骨质疏松症中的治疗作用，为靶向递送小核酸药物在骨质疏松症治疗的临床应用方面提供信息。

材料与方：采集老年恒河猴和骨质疏松患者样本，检测骨密度及miR-141的表达水平。利用破骨细胞靶向递送系统(Asp)8-PU递送miR-141至老年恒河猴。利用激光细胞切割验证破骨细胞递送效果；通过CT，切片H&E，Trap染色等评价骨量变化与破骨细胞的功能；通过血清学检测及主要器官切片评价药物安全性；利用qPCR，Western Blot等探讨miR-141的作用机制。

结果：本研究中，我们发现miR-141是破骨和骨吸收的关键抑制因子。在老年恒河猴和骨质疏松患者中，miR-141的表达水平与骨密度呈正相关，与骨骼老化呈负相关。选择性地通过核酸传递系统将miR-141导入老年恒河猴破骨细胞，使骨量逐渐增加，而对初级器官的健康行为和功能没有显著影响。此外，我们还发现miR-141的作用机制是抑制两种破骨细胞分化调控分子Calcr和EphA 2。

结论：我们的研究表明，miRNA(如miR-141)在抑制灵长类动物骨吸收方面起着重要作用，破骨细胞靶向递送小核酸miR-141在恒河猴骨质疏松症的治疗中有显著效果。为靶向递送miRNA在骨质疏松症治疗中的临床应用提供了可靠的实验依据。

髓源抑制性细胞 (MDSC) 膜包裹的磁性纳米

颗粒在肿瘤诊疗中的应用

于光涛¹，饶浪²，吴浩¹，杨雷雷¹，卜琳琳^{1,2}，邓伟伟¹，武磊^{1,3}，南小林³，张文峰¹，
赵兴中²，刘威^{2,*}，孙志军^{1,*}

¹武汉大学口腔医学院；²武汉大学物理科学与技术学院；³俄勒冈健康与科学大学奈特癌症研究所

目的：癌症作为最主要的公共健康问题之一，目前治疗手段主要由外科手术、放疗及化

疗构成。这些传统的治疗手段或者针对肿瘤细胞本身，或者针对患者的免疫系统。我们这个课题运用纳米技术达到一石二鸟的目的（杀伤肿瘤细胞本身的同时，提高机体的对肿瘤细胞的免疫杀伤能力）。

材料与方法：通过免疫磁珠从荷瘤小鼠体内分选出MDSC，后分离出细胞膜，将其包裹在磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒上，合成MNP@MDSC。电镜、SDS-PAGE、热成像、核磁共振成像仪分析MNP@MDSC的特性；体外细胞实验（与RAW264.7、B16/F10细胞培养或共培养）分析其抗吞噬、诱导巨噬细胞分化的能力；体内实验（BALB/c裸鼠、C57BL/6、ICR小鼠）分别检测MNP@MDSC长循环时间、生物毒性、生物分布、PTT、MRI成像以及抗肿瘤能力。

结果：MNP@MDSC集合了MDSC及磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒的能力。基于MDSC的细胞膜赋予了MNP@MDSC优异的抗吞噬能力、长循环时间以及主动靶向肿瘤微环境的能力。基于磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒赋予了MNP@MDSC优异的PTT能力、MRI成像能力以及显著地抗肿瘤能力。机制探索发现光热治疗引起肿瘤细胞免疫源性细胞死亡（HMGB1与Calreticulin的表达上调），与此同时MNP@MDSC纳米颗粒上调了抗肿瘤的M1型的巨噬细胞（抗原提呈细胞之一），协同促进了机体的抗肿瘤免疫反应。免疫荧光检测发现MNP@MDSC纳米颗粒治疗后抑制了肿瘤细胞的增值能力，同时促进了肿瘤细胞的凋亡。PET检测发现MNP@MDSC纳米颗粒治疗后肿瘤的代谢能力减低，从而抑制肿瘤生长。

结论：MNP@MDSC具有优异的生物安全性；MNP@MDSC具有优异免疫逃逸能力，增加体内循环时间；MNP@MDSC具有优异MRI成像能力，实现肿瘤诊疗一体化；MNP@MDSC具有诱导巨噬细胞向M1型分化的能力；MNP@MDSC具有优异光热治疗能力，诱导肿瘤细胞免疫源性的细胞死亡。总的来说，MNP@MDSC是一种多功能的、具有广阔发展前景的癌症诊疗一体化的纳米载体平台。

脱细胞牙周韧带基质膜片的制备及性质分析

柳佳美, 黄佳萍, 吴燕岷

浙江大学医学院附属第二医院

目的: 牙周韧带细胞作为理想的种子细胞, 在牙周组织再生领域一直受到广泛关注。目前, 牙周韧带细胞膜片已被证实具有诱导牙周组织再生的能力, 但其应用受到免疫排斥等限制。脱细胞组织可去除细胞和可溶性蛋白等引起免疫反应的物质, 且能保留完整外观形态和一定量的生长因子。本课题组制备脱细胞牙周韧带基质膜片, 检测其理化性质, 并观察其再细胞化能力, 以期构建牙周再生支架。

材料与amp;方法: 采用酶解组织块法培养人牙周膜细胞, 抗坏血酸诱导形成人牙周韧带细胞膜片, 静态化学试剂法进行脱细胞。采用DAPI、鬼笔环肽分别标记细胞核和细胞骨架, 免疫荧光检测I型胶原蛋白和纤连蛋白, 激光共聚焦显微镜观察牙周韧带细胞膜片在脱细胞前后的成分和结构; 采用picogreen试剂盒检测脱细胞前后DNA含量; ELISA检测bFGF、HGF、VEGF含量变化; 羟脯氨酸试剂盒检测胶原蛋白含量变化。将同种异体牙周韧带细胞接种于脱细胞牙周韧带基质膜片, 镜下观察再细胞化。

结果: 抗坏血酸诱导2周后细胞膜片成熟, 膜片中细胞呈紧密有序排列。激光共聚焦显微镜观察发现牙周韧带细胞膜片在脱细胞后细胞外基质如I型胶原蛋白、纤连蛋白等基本结构保留, 细胞骨架部分留存, 细胞核消失。定量检测显示, 牙周韧带细胞膜片经脱细胞后DNA含量显著减少, 胶原蛋白含量增加, 膜片匀浆中bFGF、HGF、VEGF含量较前减少, 部分留存。接种同种异体牙周韧带细胞后, 镜下见细胞呈现定向生长。

结论: 抗坏血酸可成功诱导牙周韧带细胞成膜, 静态化学试剂法用于脱细胞可保留细胞外基质维持结构, 同时保留部分生长因子, 提示脱细胞牙周韧带基质有一定再生潜力。脱细胞牙周韧带基质可能诱导细胞定向生长, 影响其成骨分化, 但需进一步研究验证。

全血预处理钙磷灰石材料通过调控骨免疫微环境

实现异位血管化骨再生

郭远龙^a, Fei Wei^b, 刘冠琪^a, Yin Xiao^{a, b}, 陈泽涛^a

^a中山大学附属口腔医院, ^b Queensland University of Technology

目的:

骨创伤愈合初期，凝血反应激活，形成稳定的纤维蛋白网络结构，募集和稳定多种免疫细胞，启动早期炎症反应和创伤修复进程。然而，较少研究关注血凝块的骨免疫调控作用对骨替代材料成骨效能的影响。本研究旨在探讨全血预处理能否营造良好的骨免疫微环境，提高钙磷灰石材料的血管化骨再生效果，为钙磷灰石材料的临床应用提供指导。

材料与方法：

将羟基磷灰石/磷酸三钙（HA/TCP）分为全血预处理组和对照组，植入8周龄雄性Wistar大鼠皮下，扫描电镜观察血凝块植入2天后其纤维蛋白网络结构；细胞因子抗体芯片检测全血预处理组和未处理组的细胞因子表达谱；组织化学染色、RT-qPCR、Western Blot观察特定时间点全血预处理组和对照组固有免疫及适应性免疫变化情况；组织化学染色、RT-qPCR、Western Blot评估不同时间点全血预处理组和对照组的成血管、成骨、纤维化及破骨情况。

结果：

1.在全血预处理组中，纤维蛋白直径、密度均较对照组明显降低，有利于免疫细胞及骨髓间充质干细胞的渗入并发生材料-免疫细胞-骨髓间充质干细胞交互作用。

2.全血预处理组中，2天及4天时炎症因子、趋化因子、成血管因子分泌明显上调，4天后逐渐降至正常水平。6周时免疫组化染色显示，M0、M1、M2巨噬细胞数量均增多，大部分分布于新生血管周围并表达VEGF。而T细胞和B细胞数量显著减少。提示全血预处理启动了适度的早期炎症反应，促进炎症因子和成血管因子释放，开启了血管化骨再生进程，维持适度的固有免疫反应强度，持续促进血管新生。同时降低了钙磷灰石材料“抗原性”，减轻免疫排斥反应。

3.全血预处理组中，总血管数、成熟血管数、血管直径均较对照组增多，血管生成和成熟相关基因和蛋白表达上调。提示全血预处理促进了血管的生成和成熟。

4.全血预处理组HA/TCP成骨效能明显提高，而纤维化强度和破骨活性更为缓和。

结论：

全血预处理能赋予钙磷灰石材料理想的纤维蛋白网络结构，营造良好的骨免疫微环境，实现异位血管化骨再生，是提高骨替代材料成骨效能的有效策略。

搭载SDF-1 α 的三维羟基磷灰石/聚丙烯腈纤维支架的制备

及其成骨效果的实验研究

王阶达 李家妍 李彦 吴淑仪

中山大学光华口腔医学院-附属口腔医院修复科, 广东省口腔医学重点实验室

目的: 制备新型的三维羟基磷灰石/聚丙烯腈 (Hydroxyapatite/polyacrylonitrile, HA/PAN) 复合纤维支架, 并搭载基质细胞衍生因子-1 α (Stromal-Derived Factor-1 α , SDF-1 α), 体外探究其对大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 成骨分化的影响, 体内探究该支架的异位成骨效果, 为骨缺损再生修复提供新的思路和方法。

材料与方法: (1) 结合静电纺丝和仿生矿化技术, 制备新型的三维HA/PAN复合纤维支架, 应用扫描电子显微镜 (SEM)、X射线衍射 (XRD) 分析支架的形貌、结构与成分; (2) 构建搭载不同浓度SDF-1 α (0、50ng、100ng、200ng和400ng/ml) 的三维HA/PAN纤维支架, 绘制缓释曲线及应用transwell小室模型探讨其对BMSCs的趋化作用; (3) 应用PCR、Western-Blot、免疫荧光及茜素红染色法体外探讨BMSCs在最适浓度的三维SDF-1 α -HA/PAN纤维支架中的成骨分化能力; (4) 建立裸鼠皮下异位成骨模型, 体内探讨三维SDF-1 α -HA/PAN纤维支架的异位成骨效果。

结果: (1) HA/PAN复合纤维支架的扫描电镜结果显示: 随着生物矿化时间的增加, 支架表面的羟基磷灰石沉积也逐渐增多; XRD显示在HA的标志峰211,112和300处有显示; (2) SDF-1 α 在三维HA/PAN纤维支架的释放曲线整体呈现早期突释、后期缓释的状态; Transwell小室实验显示: BMSCs的迁移数目随着SDF-1 α 的浓度升高而增多, 200ng/ml趋化效果最佳; (3) PCR、Western-Blot、免疫荧光染色结果显示: 实验组 (搭载200ng/ml SDF-1 α 的三维HA/PAN纤维支架) 中BMSCs的ALP、Runx2和OCN在基因水平和蛋白水平的表达均显著高于对照组 (三维HA/PAN纤维支架); 茜素红染色同样反映实验组的胞外矿化能力优于对照组; (4) Micro-CT和组织学切片染色结果显示, SDF-1 α -HA/PAN纤维支架在裸鼠皮下的异位成骨效果最佳。

结论: (1) 通过结合静电纺丝和仿生矿化技术, 成功制备新型的三维羟基磷灰石/聚丙烯腈 (HA/PAN) 复合纤维支架; (2) 搭载200ng/ml SDF-1 α 的三维HA/PAN复合纤维支架对BMSCs呈现最佳趋化作用, 且可以提高BMSCs的成骨分化能力; (3) SDF-1 α -HA/PAN支架可以有效促进裸鼠皮下异位成骨。

二甲双胍逆转氧化应激损伤导致的牙周膜细胞衰老

旷运春

重庆医科大学附属口腔医院

【摘要】

目的：研究二甲双胍能否逆转氧化应激损伤导致的牙周膜细胞衰老，从而保护牙周膜细胞成骨分化能力。初步探索其作用的相关机制。

材料与方法：牙周膜细胞原代培养，传到第三代（P3）用于后续实验。不同浓度的H₂O₂（0-500uM）处理牙周膜细胞建立氧化应激损伤模型，CCK-8检测细胞增殖，流式检测细胞凋亡，衰老相关的β半乳糖苷酶（SA-β-gal）染色检测细胞衰老，筛选合适的H₂O₂浓度。实验分组：对照组、H₂O₂组、H₂O₂+二甲双胍组（Met）。用Met预处理后，再用H₂O₂处理，进行反应性活性氧（ROS）染色，丙二醛（MDA）检测反应氧化应激损伤，CCK-8检测细胞增殖，RT-PCR检测细胞衰老相关基因（p21、p38、p53）mRNA水平，SA-β-gal染色检测衰老细胞。H₂O₂处理后进行成骨诱导，14天后进行碱性磷酸酶（ALP）染色和定量反应骨向分化能力，21天后进行茜素红染色和定量检测钙结节。用自噬抑制剂3-MA处理牙周膜细胞，再用二甲双胍和H₂O₂处理，WB检测自噬相关蛋白：p62、Beclin1、LC3以及衰老相关蛋白：p16、p21。

结果：H₂O₂浓度为100uM时，能显著降低细胞增殖能力但不会引起显著的细胞凋亡；在此浓度下，SA-β-gal染色阳性的牙周膜细胞显著增多。Met预处理能够减少H₂O₂引起的MDA的量，增强细胞增殖能力，减少p21、p38、p53的mRNA水平和SA-β-gal染色阳性的牙周膜细胞；Met+H₂O₂组的ALP活性和茜素红定量都显著高于H₂O₂组。Met能够增加beclin1蛋白、减少p62蛋白的表达，并且增加LC3-II/LC3-I比值，即增强牙周膜细胞自噬；用3-MA处理可抑制Met增强的自噬；H₂O₂+Met组p16、p21表达显著低于H₂O₂组，H₂O₂+Met+3-MA组p16、p21表达显著高于H₂O₂+Met组。

结论：二甲双胍能够逆转H₂O₂诱导的牙周膜细胞衰老，保护牙周膜细胞成骨分化能力。这种保护作用可能与二甲双胍增强牙周膜细胞自噬相关。

**明胶纳米球/重组丝素蛋白定点耦合释药气凝胶
在骨质疏松状态下的成骨效能评价**

李帝泽, 陈陶, 季平

重庆医科大学附属口腔医院; 重庆口腔疾病重点实验室

目的: 本研究将雷奈酸锶加载于明胶纳米球/重组丝素蛋白气凝胶中, 并通过酪氨酸酶 (MT) /乙醇进行次序交联以形成具有微-纳米分级的仿生三维网络结构, 并通过体内和体外实验评价其骨质疏松状态下的成骨效能。

材料与方法: GNP_s和SF混合后通过MT进行酶促交联, 在冷冻干燥法制备气凝胶后通过乙醇进行物理折叠。实验材料分组为GNP_s/SF组 (S组), GNP_s/SF/SR组 (SS组), GNP_s/SF/MT组 (SM组) 和GNP_s/SF/SR/MT组 (SSM组)。SEM观测材料表面及截面微结构; 茚三酮及同步荧光光谱进行定点交联效率的检测, 同时检测材料压缩强度、溶胀率、观测时间点内的降解及药物释放行为, 并进行元素分析以及仿生矿化行为的观测。此外, 将小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1与材料复合培养, SEM进行细胞形态观察, CCK-8检测细胞增殖, qRT-PCR检测成骨相关mRNA的表达。最后, 将材料植入骨质疏松的SD大鼠颅顶骨缺损, 通过 μ CT, 组织学和免疫组织化学等手段对术后2, 4, 8周原位成骨效能进行分析及评价。

结果: 茚三酮及同步荧光光谱实验证实MT定点耦合的高效性和稳定性; SEM观测到交联后材料表面孔隙变少, 小梁结构增加; 力学实验显示交联后材料压缩强度提升1倍。复合控释气凝胶在21天内持续降解, 交联后缓释效果显著增强, 模拟体液浸泡后能观察到明显的纳米花样羟基磷灰石晶体结构形成。体外实验显示材料对细胞粘附具有促进作用, 细胞相容性良好, 且实验组成骨相关标志物表达相较对照组均明显上升。影像学和组织学结果显示实验组优异的骨生成能力, 8W即可达到骨缺损面积95%的新骨覆盖率, Runx2免疫荧光提示实验组中SR对成骨细胞的促进作用, TRAP组阳性信号的反向趋势则提示材料中SR抑制破骨的作用。

结论: 负载SR的GNP_s/SF气凝胶材料能够优化其释药行为, 且基于MT定点耦合和醇类折叠的次序交联能够使GNP_s/SF气凝胶力学性能大幅提升, 并进一步提升药物缓释作用。该复合体系在体外和体内实验中均体现出良好的生物相容性及骨生成作用, 是一种针对骨质疏松患者群体骨缺损修复的理想替代材料。

斑马鱼咽齿损伤再生模型的建立

徐智云 郑雪丹

指导老师：杨德琴教授 罗凌飞教授

重庆医科大学附属口腔医院牙体牙髓科

目的：通过转基因技术建立转基因鱼系，使斑马鱼咽齿由*dendra2-NTR*标记，随后利用MTZ/NTR系统特异性损伤斑马鱼咽齿，从而构建斑马鱼咽齿损伤再生模型，观察研究损伤后的修复再生过程，为牙再生提供体内再生研究模型。

材料与方法：构建重组质粒*pBluescript-dlx2b-Dendra2-NTR*，利用显微注射技术，向单细胞期的斑马鱼胚胎注射该重组质粒，得到嵌合体的一代转基因系，之后通过绿色荧光蛋白*dendra2*的荧光筛选其后代，获得稳定遗传的*Tg(dlx2b:Dendra2-NTR)*斑马鱼转基因鱼系。在胚胎第三天时，将转基因鱼置于12mM浓度的MTZ处理液中处理48小时，可以通过荧光显微镜和共聚焦显微镜下观察荧光及牙齿杀伤情况。随后撤去处理液，利用茜素红染色、原位杂交等方式观察牙齿形态及功能恢复情况。在撤去处理液后，将胚胎置于50uM的Hedgehog信号通路抑制剂CyA溶液中进行恢复，观察斑马鱼咽齿再生情况。

结果：

1、重组质粒*pBluescript-dlx2b-Dendra2-NTR*构建成功，将其注射入单细胞期的斑马鱼胚胎后，获得*Tg(dlx2b:Dendra2-NTR)*转基因系。体视荧光显微镜下及共聚焦显微镜下，3dpf时均可见斑马鱼咽齿被绿色荧光标记，筛选出荧光较强的胚胎进行传代，经三代后，荧光表达稳定。

2、对3dpf的转基因鱼胚胎用12mM MTZ处理液处理48小时后，体视荧光显微镜可观察到咽齿绿色荧光消失，共聚焦显微镜下见咽齿3V¹和5V¹消失，完成咽齿体内损伤。

3、撤去处理液，正常培养液中恢复24小时，体视荧光显微镜下可见咽齿绿色荧光开始恢复；恢复96小时，咽齿绿色荧光强度已和对照组相似。共聚焦显微镜下亦可见咽齿3V¹和5V¹形成，基因scpp5原位杂交信号也重新表达，代表着内釉上皮和成牙本质细胞已恢复并可正常发挥其基质分泌功能。且茜素红染色显示再生的咽齿可正常矿化。

4、撤去处理液，50uM的CyA中培养恢复，36及48小时后均未见咽齿再生，意味着在抑制Hedgehog信号后，斑马鱼咽齿再生受抑制。同发育过程相似，Hedgehog信号在咽齿再生过程亦有着重要作用。此咽齿再生模型可作为体内研究牙再生相关分子信号机制的有用工具

结论：斑马鱼咽齿特异性损伤再生模型成功构建，可作为研究体内牙再生相关机制的工具。