

基因芯片技术在牙髓生物学研究中的应用进展

龚启梅综述 凌均荣审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院牙体牙髓病科;
广东省口腔医学重点实验室 广州 510055)

[摘要] 基因芯片作为一种高通量、快速和平行核酸序列测定及定量分析技术已经广泛地应用于分子生物学领域。牙髓基因组学的研究将有利于加强人们对牙髓生理和病理机制的认识,从而最终应用于临床预防、诊断和治疗等,因此,本文就基因芯片技术及其与牙髓干细胞相关的基因、牙髓老龄化改变相关的基因和龋病时牙髓相关的基因等研究进展作一综述。

[关键词] 牙髓; 牙髓细胞; 基因芯片; 基因表达谱

[中图分类号] Q 789 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.05.014

Research progress on gene chip technology and its applications in dental pulp biology Gong Qimei, Ling Junqi. (Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, Guanghua School of Stomatology, Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University; Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Gene chip was a high-throughput, rapid, parallel nucleic acid sequence detection and quantitative analysis technology. It has been widely used in molecular biology in recent years. Study on dental pulp genomics will help to understand the physiological and pathological mechanisms of pulp, thus contributing to the clinical application in prevention, diagnosis and treatment. In this review, we briefly described the gene chip technology and its applications in dental pulp stem cells, aged dental pulp and dental caries.

[Key words] dental pulp; dental pulp cell; gene chip; gene expression profiles

目前,基因芯片技术在功能基因组、疾病基因组和系统生物学等领域中均得到了广泛的应用,越来越多的未知基因和基因的新功能被发现,理解这些未知基因和基因的新功能有利于加强人们对牙髓生理和病理机制的认识,从而最终将其应用于临床预防、诊断和治疗等,因此本文就基因芯片技术在牙髓生物学研究中的应用进展作一综述。

1 基因芯片技术

基因芯片技术又称为 DNA 芯片、DNA 微阵列或寡核苷酸微阵列,是将大量寡核苷酸或基因片段高密度有序地排列在玻片、硅片和尼龙膜等固相载体上形成探针微阵列,以大规模检测分析特定基因表达的一项技术,具有高效、快速、自动微型化、高通量、高度并行性和高度敏感性。

其原理就是将经过标志的 DNA 或互补 DNA(complementary DNA, cDNA)等待测样品通过与芯片上特定位置的探针杂交,根据碱基互补配对确定靶 DNA 序列。经过分析处理芯片的杂交检测图像,可对组织和细胞样品中大量的基因信息进行分析。基因芯片技术可实现生物信息的大规模检测分析,是一种进行 DNA 序列和基因表达信息分析的强有力工具^[1-2]。基因芯片技术按探针的不同,可以分为寡核苷酸芯片、cDNA 芯片和 DNA 芯片;按功能的不同,可以分为表达谱芯片、诊断芯片和检测芯片等;按应用领域而制备的专用芯片,可以分为表达分析芯片、肿瘤研究芯片、药理毒理芯片和病毒检测芯片等。

2 牙髓干细胞相关的基因表达谱检测

2001 年,在 Shi 等^[3]应用基因芯片技术研究的牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)的基因表达情况中,DPSC 和 BMSC

[收稿日期] 2011-12-08; [修回日期] 2012-06-01

[作者简介] 龚启梅(1980—),女,安徽人,博士

[通讯作者] 凌均荣, Tel: 020-83862621

在人类 4 000 多个基因表达水平上是一致的,但胰岛素样生长因子 2、酪氨酸激酶 2、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、维生素 K₃ 氧化还原酶和细胞周期依赖性蛋白激酶 6 等少数基因在 DPSC 中的表达较高,而胰岛素样生长因子结合蛋白 7、 α_2 型胶原在 BMMSC 中表达较高。Yamada 等^[4]用包含人类 12 814 个基因的 cDNA 芯片分析发现,相对于 BMMSC,DPSC 上调基因 614 个,下调基因 296 个,其中一些基因编码细胞外基质、细胞黏附分子、生长因子和转录调节因子等。差异基因功能聚类分析显示,这些差异表达的基因与细胞信号、细胞交流和细胞代谢有关。了解 DPSC 和 BMMSC 的基因表达特点和相关的基因功能,可为基因工程和组织工程提供更多的种子细胞信息。

Menicanin 等^[5]在分离和培养 BMMSC、DPSC 和牙周膜干细胞,选取高生长分化潜能和低生长分化潜能的细胞克隆进行基因芯片和横向比较分析时发现,这三种干细胞群体有 24 个共同上调的差异表达基因。其中,对细胞生长和存活起着重要作用的转录因子 E2F2、垂体肿瘤转化基因 1 和 TWIST 同源物 1(Twist homolog 1, TWIST1)以及转录辅因子 LIM 结构域 2(LIM domain-binding 2, LDB2)均可在这三种细胞中检测到。该研究为鉴别不同组织来源的早期间充质干细胞提供了一种分子表达模式,提示这些基因在间充质干细胞生长和发育中的潜在调控作用。

2009 年, Nakamura 等^[6]通过对乳牙牙髓干细胞(stem cell from human exfoliated deciduous teeth, SHED)、DPSC 和 BMMSC 的研究发现,这三种来源的细胞均有间充质干细胞的特点,而 SHED 和 DPSC 的基因表达谱显示 4 386 个基因表达水平改变 2 倍或 2 倍以上,其中 2 159 个基因表达上调,2 227 个基因表达下调。SHED 高表达细胞增殖和细胞外基质相关通路的基因,例如成纤维细胞生长因子和转化生长因子(transforming growth factor, TGF) β 。SHED 具有较高的增殖能力和丰富的细胞来源以及取材相对微创等特点,有望成为口腔疾病或其他系统性疾病再生治疗的细胞来源。

有关 SHED 和 DPSC 在细胞增殖率、基因表达谱和谱系特异性等方面的研究^[7]显示:SHED 具有更高的增殖率和较高表达多能干细胞基因八聚体(octamer, OCT)4、SOX2、NANOG 和 REX1 的

能力;DPSC 表达较高水平的神经相关基因,例如配对盒基因(paired box gene, PAX)6、GBX2 和巢蛋白(nestin)等(差异大于 100 倍),与之一致的是 DPSC 在向神经元样细胞分化过程中具有更高的神经元形成能力和神经标志性基因(如神经丝蛋白和胶质纤维酸性蛋白)表达水平。研究表明,SHED 和 DPSC 具有不同的基因表达特点和明确的神经向谱系特征,即两者均有潜力应用于细胞疗法和再生医学领域,尤其是运用 DPSC 作为神经系统相关疾病治疗的种子细胞来源。

3 成牙本质/成骨向分化相关的基因检测

在 Pääkkönen 等^[8]利用基因芯片技术对人第三磨牙天然牙髓组织和成牙本质细胞进行的分析中,1 595 个探针牙髓阳性,904 个探针成牙本质细胞阳性。16 个表达序列标签(expressed sequence tag, EST)编码的潜在未知基因仅表达于成牙本质细胞,其中 2 个 EST 在所有成牙本质细胞样本中均有表达。基因芯片、RT-PCR 和蛋白质印迹技术研究证实, *MATN4* 是仅表达于成牙本质细胞而在牙髓细胞中无表达的细胞外基质,即 *MATN4* 和 2 个 EST 可作为研究成牙本质细胞分化的标志性分子。Pääkkönen 等^[8]又运用基因芯片技术比较天然成牙本质细胞和体外培养成牙本质样细胞的基因表达谱发现,两者有 84% 的相似性,差异基因仅在 3 类中检出,包括细胞周期、细胞生长和刺激物检测基因。他们还检测到一些神经相关性蛋白质,提示其在成牙本质细胞发挥感应细胞功能方面起着重要的作用^[9]。

Yang 等^[10]发现,转染腺病毒骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)2 可以促进表达基质细胞抗原(stromal cell antigen, STRO)1 的 DPSC 的成牙本质分化能力。以寡核苷酸芯片技术分析转染细胞和未转染细胞的基因表达特点,结果显示 36 个基因上调,15 个基因下调。相对于未转染组,转染组中分属转录调节因子、生长因子、细胞外基质和细胞增殖等相关的基因下调,与骨骼发育、骨矿化代谢、细胞生长分化、细胞外基质分子和细胞黏附分子等相关的基因上调。Liu 等^[11]用牙本质提取物和矿化液作用 DPSC 21 d 后,基因芯片技术分析其在成牙本质样分化和矿化过程中的基因表达情况:与对照组相比较,共有 425 个差异基因,其中有 21 个细胞外基质相关基因,8 个 *TGFB* 相关基因。后续的 RT-PCR 验

证了部分差异表达的基因。对这些基因的相关功能的研究将有助于更好地了解成牙本质细胞的分化、牙本质基质的分泌和矿化过程。

Carinci等^[12]利用流式细胞仪分选 c-kit⁺/CD34⁺/STRO1⁺/CD45 标志且具有成骨向分化的人 DPSC, 用基因芯片比较其和正常成骨细胞间的基因表达特征, 发现了一些差异表达基因, 主要涉及的生物学功能有: 细胞分化、发育成熟、细胞黏附和细胞骨架分子。Mori 等^[13]用成骨诱导液作用 DPSC 10 d 后, 蛋白质印迹技术、RT-PCR 和基因芯片技术分析诱导分化后的成骨样细胞与未分化细胞相关基因的表达发现, 除碱性磷酸酶、骨钙蛋白、骨桥蛋白和核心结合因子外, 与成骨细胞分化和骨形态发生相关的胰岛素样生长因子结合蛋白 5 和 *JunB* 基因表达分别上调 7.86 倍和 3 倍。了解 DPSC 成骨向分化过程中的基因表达特点, 有助于为骨组织修复再生的细胞来源提供实验基础。

Liu等^[14]诱导人牙髓细胞和牙周膜细胞向成牙本质/成骨向分化 14 d, 采用含有 84 个与人干细胞的鉴定、生长和分化有关基因的实时荧光定量 RT-PCR 芯片技术检测诱导前后的差异表达基因, 结果在矿化诱导后, 牙髓细胞和牙周膜细胞分别有差异表达基因 7 个和 16 个。其中牙髓细胞 5 个基因上调, 2 个基因下调; 牙周膜细胞 5 个基因上调, 11 个基因下调。免疫荧光检测证实了部分基因与芯片技术检测结果一致: 在牙髓细胞矿化过程中, Notch 家族成员 *DLL1* 和 Wnt 家族成员 APC 被激活; 在牙周膜细胞矿化过程中, Notch 家族成员 *DLL1* 和 TGF β /BMP 家族成员 *BMP2* 均被激活。进一步运用大鼠牙髓和牙周膜联合损伤模型发现, *BMP2* 在新生的牙髓和牙周膜组织中表达上调, 提示 Notch、Wnt 和 TGF β /BMP 等信号通路参与牙髓细胞和牙周膜细胞向成牙本质/成骨向分化的调控过程。

Kim等^[15]在研究了三氧化物聚合体(mineral trioxide aggregate, MTA)作用于人牙髓细胞 6、24、72 h 后的基因表达特点发现, 24 546 个基因中有 178 个差异表达基因, 其中 *THBS1*、*VCAN*、*COL-10A1*、*TUFT1* 和 *HMOX1* 等 106 个基因上调, *DCN*、*SOCS2* 和白细胞介素(interleukin, IL)-8 等 69 个基因下调。这些基因主要与以下功能相关: 信号转导、发育过程、蛋白质代谢、细胞结构、细胞黏附、免疫防御和细胞增殖分化。研究显示, *THBS1* 和 *VCAN* 在成牙本质细胞中表达, *SOCS2*

和 *IL-8* 在炎症反应中发挥作用。上述研究结果提示, MTA 作为一种生物性盖髓剂, 可通过多种方式影响牙髓细胞, 影响矿化和促进轻微的炎症反应以及发挥保护性的抗炎防御作用。上述研究, 将有助于从基因表达分子生物学的整体水平去认识牙髓细胞向成牙本质/成骨样细胞分化的分子标志物。

4 牙髓老龄化改变相关的基因检测

牙乳头可分化为成牙本质细胞和牙髓成纤维细胞, 在牙发育和牙体牙髓损伤修复过程中起重要的作用。Sasaki等^[16]选取胚胎 16 d(E16)和 18 d(E18)的小鼠下颌第一磨牙牙乳头和出生后 3 d(P3)的牙髓组织, 分别提取其 RNA 合成 cDNA, 用基因芯片技术比较牙发育过程中不同阶段的基因表达特点。结果显示, E16 和 E18 之间 2 439 个基因上调, 2 269 个基因下调; E18 和 P3 之间 1 129 个基因上调, 3 130 个基因下调。其中 E16 和 E18 间 *Adamts4*、*Aldha1a2* 和 *Lef1* 三个基因表达显著下调(大于 90%), 同时 RT-PCR 和原位杂交试验也证实了这一结果。这就提示, 上述三个下调基因可能参与调控牙发生时牙乳头的发育。Simon等^[17]研究了原发性牙本质形成和继发性牙本质形成两个时期的牛成牙本质细胞的基因表达谱, 发现在 24 000 个基因中有 547 个差异表达基因(差异大于 50%), 包括牙本质基质蛋白 1 和 p38 促丝裂原激活蛋白激酶通路相关基因等。分析提示, 牙本质发育的两个时期转录调节机制有所不同, 其中有些基因可能与成牙本质细胞的功能有关。进一步的 RT-PCR 和免疫组织化学检测证实, p38 促丝裂原激活蛋白激酶信号通路与继发性牙本质形成过程密切相关。

Tranasi等^[18]在用基因芯片技术分析青年人和老年人牙髓生理条件下的基因表达谱时发现, 差异表达基因归属为生长因子、转录调节因子、程序性细胞死亡调节因子和细胞外基质相关基因等。免疫、淋巴和血液系统的细胞和组织的分化、发育和增殖功能相关基因在青年人的牙髓组织中高表达, 程序性细胞死亡通路相关基因等则在老年人牙髓组织中高表达。该研究结果将有助于进一步理解牙发育和老化的分子机制。

5 龋病时牙髓相关的基因检测

Sulkala等^[19]用 cDNA 芯片技术比较健康和龋病

牙髓组织的基因表达特点时发现：基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)13 在健康牙髓组织中高表达，而在龋病牙髓组织中表达下调；RT-PCR 显示 MMP13 的表达在不同个体牙髓标本中差异较大，且其表达下调可能和龋病的进展有关。Pääkkönen 等^[20]用 cDNA 芯片技术检测到一些在健康和龋病时牙髓组织中高表达的差异表达基因，它们发挥多种功能，比如与血管神经结构、炎症和细胞分化有关。另外，他们还检测到部分未知的在牙髓组织中高表达的基因。这些改变的或高表达的基因分为以下几类：基因表达(DNA 修复和复制)、程序性细胞死亡、细胞分化、细胞生长、炎症细胞调节和神经或血管。与芯片技术检测结果不一致的是，蛋白质组学未发现健康和病变牙髓组织的蛋白表达差异。推测原因是取材时早期龋的牙髓组织无明显病变，此结果可能与龋病的发展进程有关。Mclachlan 等^[21]运用基因芯片技术检测到临床健康牙髓和深龋时牙髓组织中 445 个差异表达基因：85 个基因在健康牙髓中高表达，360 个基因在深龋牙髓中高表达。基因本体(gene ontology, GO)分析显示这些基因与免疫和炎症应答有关，表明深龋时牙髓有潜在的免疫防御能力。

除上述研究之外，尚有关于氟对牙髓基因差异表达方面的报道。Wurtz 等^[22]在用基因芯片技术研究氟对成牙本质细胞基因表达的影响时发现，1 mmol·L⁻¹ 的氟化钠作用于体外培养的成牙本质细胞系 MO6-G3 后，编码细胞外基质蛋白的基因牙周膜相关蛋白和纤调蛋白与细胞膜相关蛋白的基因成骨细胞特异性因子和 *IMT2A* 下调 90%，肿瘤坏死因子受体 9 下调 1/3，而趋化因子 *Scya5* 上调 2.5 倍。原位杂交和 RT-PCR 均证实了这些基因的表达特点。另外，一些编码应激反应的基因表达未发生改变，说明氟在调节细胞转录水平时未导致细胞应激和程序性死亡。体内研究提示，氟改变成牙本质细胞的基因表达，基因的异常表达影响细胞外基质形成和细胞交流，导致氟中毒时牙本质的病变。Wu 等^[23]发现，正常和氟中毒威斯塔大鼠切牙牙髓组织中有 247 个差异表达基因，其中 119 个是已知功能基因，主要涉及细胞增殖、磷蛋白磷酸酶活性、钙离子结合、骨骼发育和程序性细胞死亡等。他们用 RT-PCR 就三个下调基因牙本质基质蛋白 1、牙本质涎磷蛋白和钙黏附蛋白 11 进行的验证提示，氟可影响大鼠牙髓组织

的基因表达谱，为更深入了解氟牙症牙本质的矿化机制提供实验依据。

6 参考文献

- [1] Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. *Science*, 1995, 270(5235) :467-470.
- [2] Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(1 Suppl) :10-14.
- [3] Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis[J]. *Bone*, 2001, 29(6) :532-539.
- [4] Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, et al. Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSC) and human mesenchymal stem cells(hMSCs) for tissue engineering cell therapy[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(20) :3766-3781.
- [5] Micanin D, Bartold PM, Zannettino AC, et al. Identification of a common gene expression signature associated with immature clonal mesenchymal cell populations derived from bone marrow and dental tissues[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(10) :1501-1510.
- [6] Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp[J]. *J Endod*, 2009, 35(11) :1536-1542.
- [7] Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, et al. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth[J]. *J Endod*, 2010, 36(9) :1504-1515.
- [8] Pääkkönen V, Vuoristo JT, Salo T, et al. Comparative gene expression profile analysis between native human odontoblasts and pulp tissue[J]. *Int Endod J*, 2008, 41(2) :117-127.
- [9] Pääkkönen V, Bleicher F, Carrouel F, et al. General expression profiles of human native odontoblasts and pulp-derived cultured odontoblast-like cells are similar but reveal differential neuropeptide expression levels[J]. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(1) :55-62.
- [10] Yang X, van der Kraan PM, van den Dolder J, et al. STRO-1 selected rat dental pulp stem cells transfected with adenoviral-mediated human bone morphogenetic protein 2 gene show enhanced odontogenic differentiation[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(11) :2803-2812.
- [11] Liu J, Jin T, Chang S, et al. Matrix and TGF-beta-related gene expression during human dental pulp stem cell (DPSC) mineralization[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*

- identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 228(1) 99-104.
- [43] Okamoto M, Takano K, Maeda N. Distribution of the tetracycline resistance determinant *tetQ* gene in oral isolates of black-pigmented anaerobes in Japan[J]. Oral Microbiol Immunol, 2001, 16(4) 224-228.
- [44] Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase, and the 4-quinolones[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61(3) 377-392.
- [45] Onodera Y, Sato K. Molecular cloning of the *gyrA* and *gyrB* genes of *Bacteroides fragilis* encoding DNA gyrase[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(10) 2423-2429.
- [46] Oh H, El Amin N, Davies T, et al. *gyrA* mutations associated with quinolone resistance in *Bacteroides fragilis* group strains[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7) 1977-1981.
- [47] Carlier JP, Sellier N, Rager MN, et al. Metabolism of a 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(7) 1495-1499.
- [48] Katsandri A, Avlami A, Pantazatou A, et al. Dissemination of *nim*-class genes, encoding nitroimidazole resistance, among different species of Gram-negative anaerobic bacteria isolated in Athens, Greece[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(3) 705-706.
- [49] Haggoud A, Reysset G, Azeddoug H, et al. Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38(5) 1047-1051.
- [50] Steffens LS, Nicholson S, Paul LV, et al. *Bacteroides fragilis* RecA protein overexpression causes resistance to metronidazole[J]. Res Microbiol, 2010, 161(5) 346-354.
- [51] Patel EH, Paul LV, Casanueva AI, et al. Overexpression of the rhamnose catabolism regulatory protein, RhaR: A novel mechanism for metronidazole resistance in *Bacteroides thetaiotaomicron*[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(2) 267-273.
- [52] Casanueva AI, Paul L, Patrick S, et al. An AraC/XylS family transcriptional regulator homologue from *Bacteroides fragilis* is associated with cell survival following DNA damage[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 278(2) 249-256.

(本文编辑 刘世平)

(上接第 611 页)

- Anim, 2007, 43(3/4) 120-128.
- [12] Carinci F, Papaccio G, Laino G, et al. Comparison between genetic portraits of osteoblasts derived from primary cultures and osteoblasts obtained from human pulpar stem cells[J]. J Craniofac Surg, 2008, 19(3) 616-627.
- [13] Mori G, Centonze M, Brunetti G, et al. Osteogenic properties of human dental pulp stem cells[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(2) 167-175.
- [14] Liu L, Ling J, Wei X, et al. Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation[J]. J Endod, 2009, 35(10) 1368-1376.
- [15] Kim YB, Shon WJ, Lee W, et al. Gene expression profiling concerning mineralization in human dental pulp cells treated with mineral trioxide aggregate[J]. J Endod, 2010, 36(11) 1831-1838.
- [16] Sasaki H, Muramatsu T, Kwon HJ, et al. Down-regulated genes in mouse dental papillae and pulp[J]. J Dent Res, 2010, 89(7) 679-683.
- [17] Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts[J]. Bone, 2009, 45(4) 693-703.
- [18] Tranasi M, Sberna MT, Zizzari V, et al. Microarray evaluation of age-related changes in human dental pulp[J]. J Endod, 2009, 35(9) 1211-1217.
- [19] Sulkala M, Pääkkönen V, Larmas M, et al. Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13, collagenase-3) is highly expressed in human tooth pulp[J]. Connect Tissue Res, 2004, 45(4/5) 231-237.
- [20] Pääkkönen V, Ohlmeier S, Bergmann U, et al. Analysis of gene and protein expression in healthy and carious tooth pulp with cDNA microarray and two-dimensional gel electrophoresis[J]. Eur J Oral Sci, 2005, 113(5) 369-379.
- [21] McLachlan JL, Smith AJ, Bujalska IJ, et al. Gene expression profiling of pulpal tissue reveals the molecular complexity of dental caries[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1741(3) 271-281.
- [22] Wurtz T, Houari S, Mauro N, et al. Fluoride at non-toxic dose affects odontoblast gene expression *in vitro*[J]. Toxicology, 2008, 249(1) 26-34.
- [23] Wu Y, Hao YQ, Li JY, et al. Gene expression profiles of the incisor pulp tissue during fluorosis[J]. Int Endod J, 2010, 43(8) 629-636.

(本文编辑 刘世平)