

## 细胞自噬在牙髓损伤修复过程中的作用

陈杰<sup>1,2</sup> 徐华兴<sup>1,2</sup> 程抒华<sup>1,2</sup> 张旗<sup>1,2\*</sup>

(1. 同济大学口腔医学院·同济大学附属口腔医院牙体牙髓科 上海 200072;

2. 上海牙组织修复与再生工程技术研究中心 上海 200072)

**[摘要]** 目的:研究大鼠牙髓损伤修复过程中细胞自噬表达的变化,探讨其在这一过程中可能发挥的作用。方法:60 只 8 周龄 SD 大鼠上颌第一磨牙开髓后直接盖髓,术后第 1、3、7、14 天取材,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、Masson 染色观察牙髓损伤修复情况,免疫组织荧光染色检测炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、CD68 以及自噬蛋白 LC3B 和 Beclin1 的表达。分别提取损伤牙髓组织及体外培养牙髓细胞加脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative Real-time PCR)检测损伤后不同时间点炎症、矿化和自噬相关基因的表达变化。结果:术后第 1 天大量中性粒细胞浸润,第 3 天炎症浸润逐渐减轻,第 14 天炎症明显好转,有新胶原纤维形成( $P < 0.05$ )。这一过程可见自噬蛋白 LC3B、Beclin1 主要表达在牙髓细胞、成牙本质细胞及血管内皮细胞胞质及胞膜上。mRNA 水平表明炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、CD68、TNF- $\alpha$  在损伤后 3 天表达达高峰,随后降低;矿化指标 I 型胶原(collagen type I, COL1)、牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)及牙本质基质蛋白 1(dentin matrix protein1, DMP1)在损伤修复过程中表达逐渐升高。自噬基因 LC3B 与 Atg5 在损伤后 12 h 表达量至高峰,24 h 表达量最低,随后逐渐升高;Atg12 与 Beclin1 在损伤后出现先降低后升高趋势。体外细胞与体内组织 mRNA 趋势一致,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:牙髓损伤修复过程中,自噬参与牙髓炎症的发生发展,并促进牙髓组织修复。

**[关键词]** 细胞自噬 牙髓炎症 牙髓损伤修复

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2019)06—0531—06

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.06.006

**Effects of Autophagy in Dental Pulp Repair.** CHEN Jie<sup>1,2</sup>, XU Hua-xing<sup>1,2</sup>, CHENG Shu-hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Qi<sup>1,2\*</sup>. 1. Department of Endodontics, School and Hospital of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Shanghai 200072, China.

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the roles of autophagy in dental pulp injury and repair process by observing the changes of its expression after injury. **Methods:** Sixty 8-week-old male SD rats were exposed and directly capped on the first maxillary molars. Rats were sacrificed on days 1, 3, 7, and 14, dental pulp repair was detected with HE and Masson's trichrome staining. Inflammation markers TNF- $\alpha$ , CD68, and autophagy proteins LC3B and Beclin1 were detected by immunofluorescence staining. Damaged pulp tissue and dental pulp cells (DPCs) treated with LPS *in vitro* were extracted to detect the expression of inflammation, mineralization, and autophagy genes by real-time quantitate PCR. **Results:** Inflammation was increased gradually from 1st to 3rd day after operation, but no obvious inflammation was observed at 14th day. New collagen fibers were formed ( $P < 0.05$ ). Autophagy related proteins were mainly expressed on the cytoplasm and membrane of DPCs, odontoblasts, and vascular endothelial cells. The mRNA level of tissue showed that inflammatory markers IL-1 $\beta$ , CD68, and TNF- $\alpha$  were peaked at 3th day and then gradually decreased; the mineralization markers COL1, DSPP, and DMP1 were increased gradually after injury. LC3B and Atg5 reached the peak after 12 hours, decreased to the bottom after 24 hours, and then gradually increased; Atg12 and Beclin1 showed a trend of decreasing first and then increasing. The trend of mRNA in DPCs

was consistent with pulp tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** During the process of dental pulp injury and repair, autophagy participates in the development of pulp inflammation and promotes the repair of pulp tissue.

**基金项目** 国家自然科学基金(编号:81870760,81570966)

**作者简介** 陈杰(1990~),女,江苏淮安人,硕士在读,研究方向为牙髓再生与牙齿硬组织再生。

\* **通讯作者** 张旗, E-mail: qizhang@tongji.edu.cn

[Key words] Autophagy Pulp inflammation Pulp repair

牙髓损伤后的活髓保存是近年来的研究热点和难点,其关键在于清除牙髓组织中的感染与炎症<sup>[1]</sup>。持续、过度的炎症反应可造成牙髓细胞坏死,无法形成良好的修复性牙本质<sup>[2,3]</sup>。然而对于炎症的控制,目前尚缺乏有效手段,因此需进一步对炎症的发生发展机制进行研究<sup>[4,5]</sup>。其中,作为细胞应对炎症刺激的重要调节手段,自噬一方面可通过激活炎性体产生大量炎症因子而加快炎症进程<sup>[6]</sup>,另一方面又可通过降解内源性刺激物来抑制炎性物质聚集和促炎因子的分泌而对抗炎症反应<sup>[7,8]</sup>。此外,自噬在机体损伤修复过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>,机体受损后产生双层膜结构的自噬小体,用以吞没已经受损的细胞器、细胞质、蛋白质聚集体,并在溶酶体内完成降解,为受损组织的修复过程提供所需的能量和底物,从而促进组织的损伤修复<sup>[10]</sup>。目前已有文献报道自噬参与急性牙髓炎的发生发展<sup>[11]</sup>,然而自噬是否参与牙髓损伤后的组织修复以及牙髓损伤修复过程中自噬的变化趋势尚未明确。因此,本文将通过建立大鼠牙髓损伤修复模型,观察术后牙髓炎症、组织修复及自噬相关基因表达情况,初步探讨该过程中自噬可能发挥的作用,为牙髓损伤修复机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物和材料 SD大鼠(虔碧生物科技有限公司,上海)180~200g;乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, 国药集团化学试剂有限公司,北京); $\alpha$ -改良伊格尔培养基( $\alpha$ -modified eagle medium,  $\alpha$ -MEM, Hyclone, 美国);胎牛血清(Excell Bio, 澳大利亚);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Sigma, 美国);细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8, 同仁, 日本);逆转录试剂盒(Roche, 瑞士);实时荧光定量聚合酶链反应、试剂盒(翊圣, 上海);RT-PCR仪(Roche, 瑞士);抗体肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、CD68(Abcam, 美国)、自噬微管相关蛋白轻链3B(light chain 3B, LC3B, Affinity Bioscience, 美国)、Beclin1(博士德, 武汉);Masson染色试剂盒(南京建成);苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液(上海威奥)。

### 1.2 实验设计和方法

1.2.1 建立大鼠牙髓损伤修复模型 SD大鼠共60只,戊巴比妥钠麻醉,双侧上颌第一磨牙为实验

对象,用装有1/4球钻的高速涡轮机于颌面备洞,至可观察到透红时,用干净的探针尖端暴露牙髓,无菌棉球压迫止血,将浸有磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)的明胶海绵置于磨牙露髓孔处安抚,树脂充填,术后相应时间收集样本。其中30只大鼠建模后用于组织学切片染色,采取大鼠心脏灌流后取出上颌骨,固定48h,修整颌骨,转入10%中性EDTA脱钙液内,隔天换液,2个月后完成脱钙,进行石蜡包埋切片。

1.2.2 HE与Masson染色 切片常规脱蜡脱水,按照染色试剂盒步骤染色,中性树脂封片后观察牙髓组织损伤与新胶原纤维形成情况。

1.2.3 组织免疫荧光染色 切片常规处理后,37℃抗原修复和血清封闭分别1h,滴加一抗CD68、TNF- $\alpha$ 、LC3B、Beclin1工作液,4℃过夜。次日复温后, PBS清洗3次,滴加异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光标记二抗,避光孵育60min。用PBS洗去二抗,滴加4,6-联脒-2-苯基吡啶[2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, DAPI]染色5min,用PBS洗去染液,每次5min,最后滴加防淬灭剂封片后显微镜观察。应用Image J对样本染色结果进行分析。

1.2.4 原代人牙髓细胞培养 收集同济大学附属口腔医院颌面外科门诊就诊的18~25岁患者新鲜拔除的健康、完整的第三磨牙或正畸牙,用含10%青/链霉素的PBS清洗,骨凿劈开牙冠;超净台中取出牙髓,用含双抗的培养基冲洗2次,将组织块剪碎后平铺于25cm<sup>2</sup>培养瓶,加入细胞培养液(含10%胎牛血清、1%青/链霉素混合液),置于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱内培养。传代至第3~5代细胞进行实验。

1.2.5 CCK-8检测 细胞接种在96孔板中,每孔3000个细胞。细胞贴壁后加入处理因素。分为空白对照组、LPS处理组(1mg/L LPS分别孵育1、3、5、7d)。检测时,每孔分别加入10 $\mu$ L CCK-8溶液,孵育2h,使用酶标仪在吸光度450nm处检测。每组设5个复孔,重复3次。

1.2.6 mRNA水平分析 另外30只大鼠建模后根据取材时间(6、12h和1、3、7、14d)提取组织RNA。将人牙髓细胞分为空白对照组和LPS处理组,时间点与体内实验一致。分别在相应时间点收集样本。紫外分光光度计测定组织与细胞总RNA的浓度与纯度,逆转录成cDNA。RT-PCR检测炎

症、矿化和自噬指标。所有实验均重复 3 次,每次设 3 个复孔。根据美国国立生物技术信息中心 (national center for biotechnology information,NCBI) 中基因序列设计引物(表 1),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,所有样品进行 45 个 PCR 循环,测定靶基因 mRNA 的表达水平。

表 1 引物序列表

Tab. 1 Primer sequences for RT-PCR

基因来源 与名称	引物序列(5'→3')
Rat GAPDH	F:CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA R:GGCATGGACTGTGGTCATGA
Rat IL-1 $\beta$	F:AAGACAAGCCTGTGTTGCTGAAGG R:TCCAGAAGAAAATGAGGTCGGTC
Rat TNF- $\alpha$	F:CTTCTCATTCCTGCTCGTGG R:GCTACGGGCTTGTCACCTCG
Rat CD68	F:TGCTGGTACTGCTGTAGCC R:GTGGCAGCCTTTTTGTGAGG
Rat DMP1	F:ACTTTGGAGACGAAGACAATGGC R:TGTCTTCACTGGACTGTGTGGTGT
Rat DSPP	F:GGGAAGCTCAGTGGAAAGTAAAG R:CTGCTGTGTCCCATGTTGTAT
Rat COL-1	F:GCCTCCAGAACATCACCTA R:GCAGGGACTTCTTGAGGTTG
Rat Atg5	F:GCACGCTTTTGCTCAGTGAA R:GTTTCCACTCTCCAGCCGAA
Rat Atg12	F:CTTACCTGGCGTTGAGGGAG R:GCACACATGGCTGAGGACTA
Rat LC3B	F:CAGGTTGCCTAGCAGAGGTC R:GGCATGGACCAGAGAAGTCC
Rat Beclin1	F:TATAGCAAAGAGCCCTGCCG R:AACTGTGTGCCACAAGCATC
Human GAPDH	F:GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT R:GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
Human IL-1 $\beta$	F:TGGCTTATTACAGTGGCAATGAG GATG R:TGTAGTGGTGGTCGGAGATTTCGTAG
Human IL-6	F:GGTGTTCCTGCTGCCTTCC R:GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC
Human TNF- $\alpha$	F:CGTGGAGCTGGCCGAGGAG R:AGGAAGGAGAAGAGGCTGAGGAAC
Human CD68	F:CTACTGGCAGAGAGCACTGG R:CTAGTGGTGGCAGGACTGTG
Human COL-1	F:TGACGAGACCAAGAAGTCC R:GCACCATCATTTCACGAGC
Human DSPP	F:AAAGTGGTGTCTGGTGCAT R:CCTGGATGCCATTTGCTGTG
Human DMP1	F:TTCCTCTTTGAGAACATCAACCTG R:ACTCACTGCTCTCCAAGGGT
Human BSP	F:CACTGGAGCCAATGCAGAAGA R:TGGTGGGGTTGTAGGTTCAA
Human Atg5	F:CGTCCAAACCACACATCTCG R:GGTGAAGGTGGTTCTCTCCG
Human Atg12	F:GTACCTAATATGTTAGGC R:CATGGATTATACACAATCCG
Human LC3B	F:CAGCGTCTCCACCAATCT R:GCGGGTTTTGTGAACCTGAA
Human Beclin1	F:ACACATTTGTTTGTGCGGA R:TGTGTAAACAAACGACGCCT

1.2.7 细胞免疫荧光染色 将牙髓细胞分为空白

和 LPS 处理组(12、24 h)。吸去培养基,PBS 清洗;4%多聚甲醛室温固定 20 min,PBS 清洗;0.5% Triton  $\times$ 100-PBS 室温处理 8 min,PBS 清洗;血清封闭 60 min,加入一抗 LC3B、Beclin1 工作液,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;隔日 PBS 清洗,加入 FITC 荧光标记二抗,室温避光孵育 60 min;PBS 清洗后加入鬼笔环肽(1:50)避光 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBS 清洗后加入 DAPI(1:2000),室温避光染色 5 min;PBS 清洗后滴加防淬灭剂封片,荧光显微镜观察。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,K-S 法证实所有数据均符合正态分布,组间差异比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。采用 Prism7.0 软件作图。

2 结果

2.1 牙髓损伤修复模型组织学分析 HE 和 Masson 染色结果见图 1、表 2。术后 1d,穿髓孔下方有大量中性粒细胞,病变周围成牙本质细胞层紊乱,血管充血,炎症浸润局限在冠部髓腔。术后 3 d,穿髓孔下方仍有较多中性粒细胞浸润,周围成牙本质细胞层紊乱,病变局限在冠髓近开髓孔处。术后 7 d,穿髓孔下方炎症细胞浸润明显减少,有新的胶原纤维形成。术后 14 d,成牙本质细胞样细胞活跃,大量胶原纤维形成。

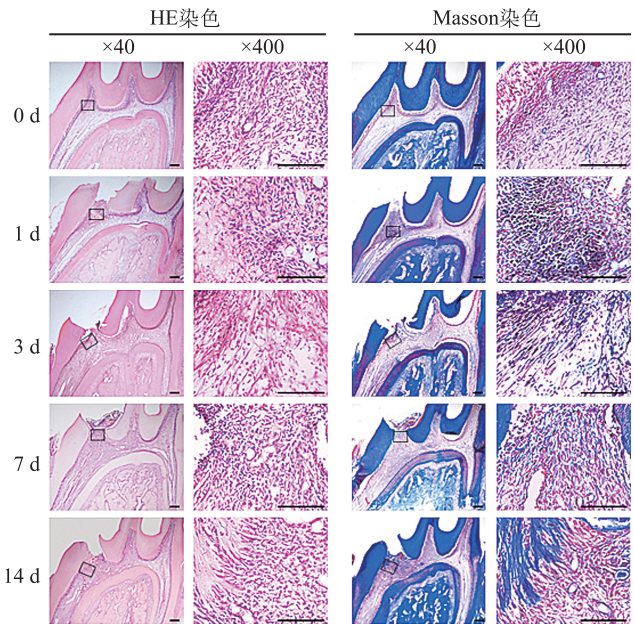


图 1 大鼠牙髓组织损伤修复过程

Fig. 1 Process of rat dental pulp injury and repair.

2.2 组织免疫荧光染色结果分析 术后 1、3 d, TNF- $\alpha$  和 CD68 的表达量逐渐达到高峰,随后下降,术后 7 d 仍有较多炎症因子的表达,术后 14 d 炎症



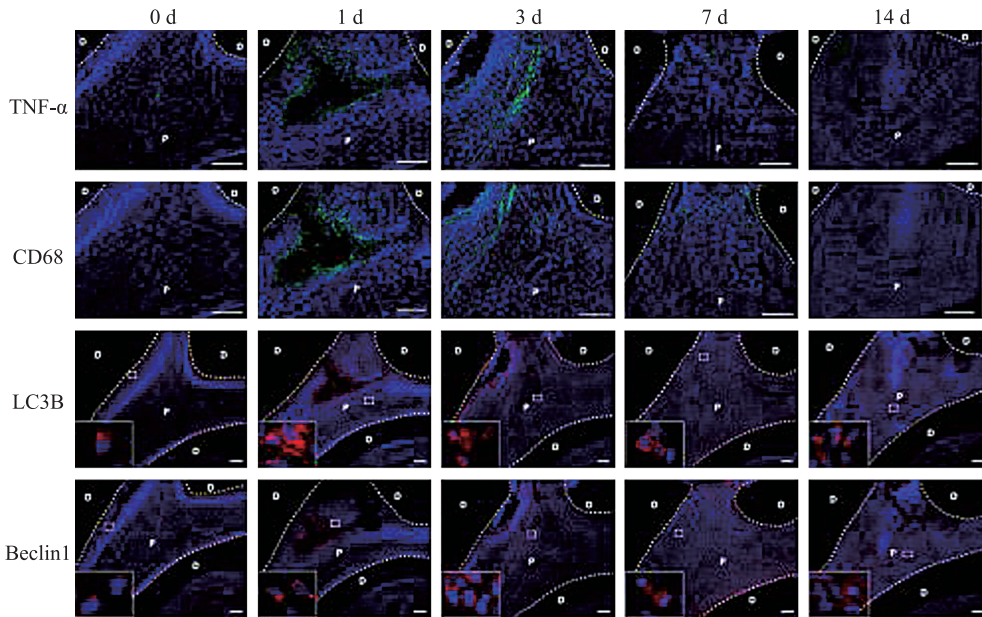


图2 炎症与自噬蛋白在大鼠牙髓组织损伤修复过程中的表达情况

Fig. 2 Expression of inflammation and autophagy proteins in rat dental pulp injury and repair.

表2 牙髓炎症浸润和胶原形成染色结果分析

Tab. 2 The analysis of dental pulp inflammatory infiltration and collagen formation

检测指标	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d
牙髓炎症浸润面积	0	24.03±2.11 <sup>*2</sup>	23.30±1.97 <sup>*2</sup>	5.87±0.64 <sup>*1</sup>	2.33±0.50 <sup>*1</sup>
胶原新形成面积	4.20±1.30	4.40±1.14	6.20±1.30 <sup>*1</sup>	16.60±2.51 <sup>*1</sup>	33.60±2.30 <sup>*2</sup>

注:与0 d比较,\*1  $P < 0.05$ , \*2  $P < 0.001$

表3 牙髓炎症和自噬蛋白表达染色结果分析

Tab. 3 The analysis of dental pulp inflammation and autophagy proteins

检测指标	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d
TNF-α	6.50±1.29	67.50±7.59 <sup>*3</sup>	78.75±3.78 <sup>*3</sup>	37.25±4.11 <sup>*2</sup>	11.50±2.52 <sup>*1</sup>
CD68	7.00±1.58	55.00±5.48 <sup>*2</sup>	73.50±7.55 <sup>*2</sup>	45.75±6.65 <sup>*2</sup>	6.00±1.63
LC3B	2.41±0.37	9.70±0.13 <sup>*3</sup>	7.50±0.50 <sup>*2</sup>	7.45±0.60 <sup>*2</sup>	9.13±0.93 <sup>*3</sup>
Beclin1	1.82±0.33	7.09±0.17 <sup>*3</sup>	6.66±0.45 <sup>*3</sup>	6.95±0.07 <sup>*3</sup>	6.90±0.23 <sup>*3</sup>

注:与0 d比较,\*1  $P < 0.05$ , \*2  $P < 0.01$ , \*3  $P < 0.001$

因子表达恢复正常(图2,表3)。正常组多在成牙本质细胞层中表达 LC3B 和 Beclin1,而实验组中则在成牙本质细胞、牙髓细胞及炎症浸润区域均有表达,主要表达在细胞质和细胞膜中,且牙髓损伤修复过程可见自噬蛋白表达较正常组升高。

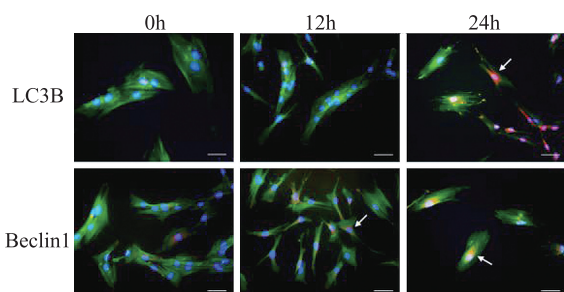


图3 LPS诱导牙髓细胞自噬产生(×200)

Fig. 3 Autophagy in LPS-induced dental pulp cells (×200).

2.3 大鼠牙髓组织相关基因 mRNA 水平分析  
结果见表4。炎症指标 IL-1β、CD68、TNF-α 在损伤后3 d 表达达到高峰,随后逐渐降低;矿化指标 COL1、DSPP 在损伤后相较于正常组织表达先下降后上升,DMP1 在损伤后逐渐升高。细胞自噬在损伤后迅速被激活;LC3B 与 Atg5 在损伤后12 h 表达达到高峰,随后降低,24 h 表达至低谷后逐渐升高;Atg12 与 Beclin1 在损伤后表达呈先降低后升高趋势。结果表明早期炎症的发展随着自噬的激活而增加,后期炎症减轻,自噬水平增加,且自噬与矿化修复的发展趋势一致。由此可见自噬贯穿牙髓损伤与修复全过程。

2.4 CCK-8 检测结果分析 LPS 处理后第1、3、7 天细胞活性未见明显变化,第5 天时可见 LPS 组的

细胞活性高于对照组(表 5)。

表 5 LPS 对牙髓细胞活性的影响

Tab. 5 Viability of LPS-stimulated dental pulp cells  $\bar{x} \pm s$

组别	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	0.24±0.05	0.41±0.01	0.65±0.03	2.02±0.05
LPS 组	0.23±0.04	0.43±0.02	1.01±0.03*	2.14±0.05

注: LPS 组与同一时间点对照组相比, \*  $P < 0.01$

2.5 细胞免疫荧光染色结果分析 牙髓细胞受到炎症刺激后激活了细胞自噬: LC3B 在 24 h 表达明显, Beclin1 在 12 h、24 h 均表达, 24 h 表达较 12 h 明显(图 3)。

2.6 牙髓细胞相关基因 mRNA 水平分析 结果见表 6。炎症指标 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 CD68 在 LPS 刺激后表达开始上升, TNF- $\alpha$ 、CD68 的表达在

1d 时达到高峰, IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达在 6 h 时达到高峰, 随后逐渐下降。矿化指标 COL1、DSPP、DMP1 及 BSP 在 LPS 刺激后相较于正常组织表达先下降后逐渐上升。自噬相关基因 Atg5 在正常未处理组中即有表达, LPS 处理后表达下降, 而 Atg12 与 Atg5 的表达趋势相反, Atg12 和 LC3B 在 LPS 处理后表达呈升高趋势。Beclin1 的表达在 12 h 时达到高峰, 随后逐渐下降, 但在 3 d 时又呈升高趋势。

### 3 讨论

本实验建立牙髓损伤修复模型, 对大鼠磨牙行直接盖髓术, 观察牙髓损伤修复整个过程中自噬的表达。研究结果表明在这一过程中, 自噬参与牙髓炎症的发生发展, 并促进牙髓组织修复。以往也有实验研究自噬与牙髓炎症的关系<sup>[11]</sup>, 但并未揭示牙

表 4 大鼠牙髓组织损伤修复过程中炎症、矿化及自噬基因的表达变化

Tab. 4 Expression of inflammation, mineralization, and autophagy genes in rat dental pulp injury and repair  $\bar{x} \pm s$

检测指标	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d
IL-1 $\beta$	0.04±0.01	0.12±0.04* <sup>1</sup>	3.75±0.54* <sup>2</sup>	0.29±0.12* <sup>1</sup>	0.06±0.01
TNF-a	0.0013±0.0004	0.0017±0.0003	0.0040±0.0003* <sup>2</sup>	0.0030±0.0005* <sup>2</sup>	0.0014±0.0002
CD68	0.03±0.01	0.03±0.01	0.26±0.07* <sup>2</sup>	0.22±0.05* <sup>2</sup>	0.02±0.01
COL1	236.90±4.20	67.92±11.30* <sup>2</sup>	265.90±5.66	597.60±13.12* <sup>3</sup>	524.60±10.60* <sup>3</sup>
DSPP	0.09±0.01	0.03±0.02* <sup>2</sup>	0.07±0.01* <sup>1</sup>	0.06±0.01* <sup>1</sup>	0.14±0.02* <sup>2</sup>
DMP1	0.02±0.004	0.04±0.02* <sup>1</sup>	0.07±0.03* <sup>1</sup>	0.20±0.07* <sup>2</sup>	0.53±0.07* <sup>3</sup>

检测指标	0 d	1/4 d	1/2 d	1 d	3 d	7 d	14 d
LC3B	0.51±0.16	0.98±0.05* <sup>2</sup>	1.15±0.14* <sup>2</sup>	0.22±0.048* <sup>1</sup>	0.31±0.05* <sup>1</sup>	0.62±0.03	0.74±0.13
ATG5	0.09±0.01	0.14±0.02* <sup>1</sup>	0.25±0.04* <sup>2</sup>	0.02±0.01* <sup>2</sup>	0.07±0.02	0.06±0.01* <sup>1</sup>	0.06±0.01* <sup>1</sup>
ATG12	0.10±0.01	0.04±0.01* <sup>2</sup>	0.13±0.03	0.10±0.02	0.20±0.03* <sup>1</sup>	0.27±0.02* <sup>2</sup>	0.24±0.02* <sup>2</sup>
Beclin1	0.49±0.09	0.28±0.08* <sup>1</sup>	0.39±0.03	0.45±0.08	0.94±0.07* <sup>2</sup>	0.87±0.13* <sup>2</sup>	0.88±0.09* <sup>2</sup>

注: 与 0 d 相比, \*<sup>1</sup>  $P < 0.05$ , \*<sup>2</sup>  $P < 0.01$

表 6 LPS 诱导牙髓细胞炎症、矿化和自噬基因的表达变化

Tab. 6 Expression of inflammation, mineralization, and autophagy genes in LPS-stimulated dental pulp cells  $\bar{x} \pm s$

检测指标	0 d	1/4 d	1/2 d	1 d	3 d	7 d	14 d
IL-1 $\beta$	0.001±0.001	0.040±0.003* <sup>3</sup>	0.004±0.001* <sup>1</sup>	0.001±0.001	0.001±0.002	0.001±0.001	0.000±0.000
TNF-a	0.360±0.070	0.340±0.060	0.420±0.060	0.800±0.100* <sup>2</sup>	0.640±0.020* <sup>2</sup>	0.280±0.060	0.190±0.040* <sup>1</sup>
CD68	0.130±0.030	0.150±0.030	0.290±0.030* <sup>2</sup>	0.350±0.050* <sup>2</sup>	0.230±0.030* <sup>1</sup>	0.200±0.030* <sup>1</sup>	0.110±0.030
IL-6	0.100±0.010	0.910±0.170* <sup>2</sup>	0.630±0.090* <sup>2</sup>	0.130±0.020	0.140±0.004	0.080±0.020	0.040±0.010* <sup>1</sup>

检测指标	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d
COL1	0.0140±0.0010	0.0090±0.0010* <sup>2</sup>	0.0100±0.0010	0.0300±0.0020* <sup>1</sup>	0.0200±0.0020
DSPP	0.0030±0.0004	0.0020±0.0005	0.0030±0.0002	0.0070±0.0010* <sup>2</sup>	0.0090±0.0010* <sup>3</sup>
DMP1	0.0005±0.0001	0.0002±0.0000* <sup>1</sup>	0.0004±0.0001	0.0010±0.0001* <sup>2</sup>	0.0011±0.0001* <sup>2</sup>
BSP	0.0015±0.0002	0.0011±0.0001	0.0013±0.0002	0.0030±0.0001* <sup>2</sup>	0.0020±0.0001

检测指标	0 d	1/4 d	1/2 d	1 d	3 d	7 d	14 d
LC3B	0.560±0.080	0.410±0.080	0.810±0.030* <sup>2</sup>	0.620±0.060	0.420±0.050	0.520±0.080	1.100±0.100* <sup>2</sup>
ATG5	0.003±0.001	0.001±0.000* <sup>2</sup>	0.000±0.000* <sup>2</sup>	0.001±0.000* <sup>2</sup>	0.000±0.001* <sup>2</sup>	0.000±0.000* <sup>3</sup>	0.001±0.000* <sup>2</sup>
ATG12	0.004±0.001	0.004±0.002	0.010±0.002* <sup>1</sup>	0.004±0.001	0.003±0.002	0.006±0.001* <sup>1</sup>	0.020±0.001* <sup>3</sup>
Beclin1	0.028±0.050	0.034±0.006	0.076±0.030* <sup>2</sup>	0.040±0.001	0.023±0.005	0.030±0.005	0.039±0.007

注: 与 0 d 相比, \*<sup>1</sup>  $P < 0.05$ , \*<sup>2</sup>  $P < 0.01$ , \*<sup>3</sup>  $P < 0.001$

髓损伤后自噬与组织修复之间的关系。本实验基于牙髓损伤修复模型,从基因与蛋白层面更系统地探讨了这一过程中自噬对组织修复的作用。

首先,本研究结果表明自噬参与牙髓损伤后炎症的发生发展。本实验通过多种实验方法研究发现自噬在牙髓组织中的表达随着炎症的发展而增加,而炎症减轻后自噬相关基因表达也降低。有研究证实自噬相关基因在炎症牙髓组织中表达升高,但该研究仅运用免疫组织化学染色方法揭示开髓暴露48 h内自噬与炎症变化关系<sup>[11]</sup>。另有学者建立大鼠不可复性牙髓炎模型,牙髓开髓暴露至7 d,证实自噬相关指标自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)、LC3 和 Beclin1 呈时间依赖性增加<sup>[12]</sup>。这些研究结果均揭示牙髓炎模型中自噬的表达变化,本实验结果与其一致,但其并未研究自噬在牙髓损伤修复过程中的作用。我们猜测在组织损伤修复过程中,自噬通过对细胞旁分泌的改变来影响所处炎症环境中炎症因子组成,减少炎症环境对细胞的刺激<sup>[13,14]</sup>。

同时,本研究结果表明自噬促进牙髓组织修复。本实验从基因与蛋白层面研究发现损伤修复全程可见自噬的表达,其主要分布在牙髓细胞、成牙本质细胞及血管内皮细胞胞质及胞膜上,且自噬在牙髓中的表达随着矿化修复的发展而增加。有研究发现自噬在牙胚和成牙本质细胞层中有表达,而成牙本质细胞可形成牙本质,猜测自噬可能参与了牙齿的发育与修复<sup>[15,16]</sup>。另有研究仅进行体外细胞实验,证明自噬能够促进成牙本质细胞的矿化<sup>[17]</sup>。本实验结果与以上研究结果一致,猜测自噬可能是通过对受损细胞器及蛋白质的吞噬产生细胞分化所需的能量,促进牙髓细胞的迁移与分化,从而促进组织修复<sup>[16,18]</sup>。但本研究需进一步采取自噬抑制剂抑制牙髓自噬,揭示其在牙髓损伤修复过程中的具体作用机制。

综上所述,自噬参与牙髓炎症的发生发展,并促进牙髓组织修复。未来我们将采取添加药物促进牙髓炎症消退策略,以激活自噬加快牙髓修复,并继续探讨自噬在牙髓炎症消退以及牙髓修复与再生中的具体作用机制。

## 参考文献

- [1] 周学东,黄定明,刘建国,等. 牙髓损伤的活髓保存治疗[J]. 华西口腔医学杂志,2017,35(4):339-347.
- [2] Mescher AL, Neff AW, King MW. Inflammation and immunity in organ regeneration [J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 66: 98-110.
- [3] Eba H, Murasawa Y, Iohara K, et al. The anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase-3 on irreversible pulpitis of mature erupted teeth [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52523.
- [4] Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword [J]. *J Endod*, 2014, 40(4 Suppl): S46-S51.
- [5] 梅雪,谢俐萍,金幼虹,等. iRoot BP Plus 直接盖髓后比格犬牙髓的反应性变化[J]. 口腔医学研究,2016,32(12):1234-1239.
- [6] Deretic V, Levine B. Autophagy balances inflammation in innate immunity [J]. *Autophagy*, 2018,14(2):243-251.
- [7] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation [J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.
- [8] Rodgers MA, Bowman JW, Liang Q, et al. Regulation where autophagy intersects the inflammasome [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 495-506.
- [9] 王一博,孙宾,王丹丹,等. 纳米材料诱导的自噬与凋亡在抑制肿瘤生长和治疗中的作用及研究进展[J]. 口腔医学研究,2017,33(11):1230-1233.
- [10] Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(6): 495-501.
- [11] 丁印浩,王倩,牛卫东,等. 自噬相关蛋白 LC3Av1 和 LC3B 在大鼠牙髓炎中的表达研究[J]. 中国微生态学杂志,2017,29(2):130-132.
- [12] Qi S, Qian J, Chen F, et al. Expression of autophagy-associated proteins in rat dental irreversible pulpitis [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4):2749-2757.
- [13] Wang Z, Wang Y, Wang Z, et al. Engineered mesenchymal stem cells with enhanced tropism and paracrine secretion of cytokines and growth factors to treat traumatic brain injury [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(2): 456-467.
- [14] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 713-720.
- [15] Yang JW, Zhu LX, Yuan GH, et al. Autophagy appears during the development of the mouse lower first molar [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(1): 109-118.
- [16] Yang JW, Zhang YF, Wan CY, et al. Autophagy in SDF-1alpha-mediated DPSC migration and pulp regeneration [J]. *Biomaterials*, 2015, 44: 11-23.
- [17] Pei F, Wang HS, Chen Z, et al. Autophagy regulates odontoblast differentiation by suppressing NF-kappaB activation in an inflammatory environment [J]. *Cell Death Dis*, 2016,7: e2122.
- [18] Vessoni AT, Muotri AR, Okamoto OK. Autophagy in stem cell maintenance and differentiation [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(4): 513-520.