

网络出版时间: 2023-01-20 16:05:44 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230119.1742.016.html>

cAMP/Epac/Rap1 信号通路调控 NG2 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF 及酸枣仁皂苷 A 的作用研究

杨婷婷, 王慧, 石鹏, 滕柳, 李悦, 杜敏, 涂小华, 杨光勇, 邓颖

摘要 目的 研究环磷酸腺苷(cAMP)/环磷酸腺苷结合蛋白(Epac)/Ras 相关蛋白 1(Rap1) 信号通路是否参与调控 NG2 细胞分泌白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、脑源性神经营养因子(BDNF) 及酸枣仁皂苷 A(JuA) 的作用。方法 体外培养 NG2 细胞,分为对照组、百日咳毒素(PTX)组、非环状核苷酸 Epac 拮抗剂(ESI-09)组、酸枣仁皂苷 A(JuA)组、艾司唑仑(阳性药)组。采用 CCK-8 法检测不同浓度 JuA 对 NG2 细胞存活率的影响,RT-PCR 法和 Western blot 法检测各组细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 mRNA 及蛋白的表达情况。结果 与对照组比较,PTX 组降低 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 和蛋白的表达($P < 0.01$),增加 BDNF 和 cAMP mRNA 和蛋白的表达($P < 0.01$);ESI-09 组增加 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$),降低 BDNF、Epac 和 Rap1 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.01$);JuA 组、阳性药组均增加 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$)。结论 cAMP/Epac/Rap1 信号通路可介导 NG2 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF, JuA 可能作用于 cAMP/Epac/Rap1 信号通路影响 NG2 细胞分泌 BDNF。

关键词 NG2 细胞; 酸枣仁皂苷 A; cAMP; Epac; Rap1

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0265-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.016

NG2 神经胶质细胞是中枢神经系统实质中表达神经胶质细胞抗原 2(neuron glial antigen 2, NG2) 的非神经元、非血管性神经胶质细胞。它能够分泌白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)^[1] 这些物质能够影响中枢神经系统中神经元和胶质细胞的活性。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 作为胞内第二信使,可通

过 PKA-cAMP 反应原件结合蛋白(cAMP response element binding, CREB)、cAMP 直接激活的环磷酸腺苷结合蛋白(exchange proteins directly activated by cAMP, Epac) 等信号通路,参与睡眠和昼夜节律、调控学习记忆等多种功能^[2]。NG2 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF 是否与 cAMP/Epac/Rap1 信号通路有关,目前尚未见报道。

酸枣仁皂苷 A(Jujuboside A, JuA) 具有镇静催眠的作用。JuA 是否通过作用于 NG2 细胞发挥作用,其机制尚不明确。该研究采用细胞培养的方法,观察 cAMP/Epac/Rap1 信号通路参与调控 NG2 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF 的过程,探讨 JuA 对 NG2 细胞发挥的作用,揭示 JuA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株 NG2 细胞株购于青旗(上海)生物技术有限公司,编号 BFN60803943。

1.2 仪器与试剂 MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司); ABI7500 型自动实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司); ChemicDocTM XRS⁺ 成像(美国 Bio-Rad 公司)。JuA(纯度 > 98%, CAS 号 55466-04-1) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清(批号 04-001-1acs)、青霉素-链霉素溶液(批号 03-031-1B) 均购自以色列 BI 公司; DMEM 培养基(批号 C11330500BT) 购自美国 Gbico 公司; CCK-8 试剂盒(批号 02-024-1ACS) 购自日本同仁化学研究所; 提取细胞总 RNA 试剂盒(批号 R6834-01) 购自广州飞扬生物工程有限公司; cDNA 第一链合成预混试剂(批号 A224-10, 北京康润诚业生物科技公司); 2 \times SuPer SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒(批号 QP002) 购自上海奕杉生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010) 购自上海碧云天公司; 兔多抗 BDNF(批号 bs-0248R) 购自美国 Bioass 公司; 兔单抗 IL-1 β (批号 #31202)、兔多抗 TNF- α (批号 8184s) 均购自美国 CST 公司; 兔单抗 cAMP(批号 Ab76238)、兔单抗 Epac(批号 Ab109415)、兔多抗 Rap1(批号 Ab113480) 均购自美

2022-12-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81760816)

作者单位: 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025

作者简介: 杨婷婷, 女, 硕士研究生;

王慧, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 517634846@qq.com

国 Abcam 公司; 兔多抗 GAPDH(批号 AB-P-R 001) 购自杭州贤至生物有限公司。

1.3 NG2 细胞鉴定 课题组前期实验经过免疫荧光检测, 鉴定该细胞株为 NG2 细胞^[3]。

1.4 NG2 细胞的培养与分组处理 NG2 细胞复苏后, 用含 DMEM 的完全培养基(10% FBS + 1% 青霉素 - 链霉素溶液) 常规培养, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中, 每 2 d 换液 1 次, 待细胞融合度至 80% 时传代。将细胞分为对照组(完全培养基)、百日咳毒素(pertussis toxin, PTX) 组(特异性增加细胞内 cAMP 含量 5 μmol/L + 完全培养基)、ESI-09 组(Epac 特异性拮抗剂 1.5 μmol/L + 完全培养基)、JuA 组(最佳浓度的 JuA + 完全培养基)、阳性药组(75 μmol/L 艾司唑仑 + 完全培养基)。

1.5 CCK-8 法检测 JuA 对 NG2 细胞存活率的影响 取对数生长期的 NG2 细胞, 96 孔板按每孔 8 × 10³ 个/100 μl 接种, 设置 6 个复孔, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中 24 h。吸弃孔内的完全培养基, 向培养板中加入 100 μl 含不同浓度(5、10、20、40 μmol/L JuA) 的完全培养基。孵育 24 h 后, 向每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 避光继续孵育 1 h。酶标仪检测各组 450 nm 处的吸光度(absorbance, A), 计算细胞存活率。

1.6 RT-PCR 法检测 IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 mRNA 相对表达量 取 6 孔板, 按 2 × 10⁵ 个/孔接种细胞。按上述分组干预细胞。应用 NCBI 中 Primer-BLASTPCR 设计引物, 见表 1。采用试剂盒提取总 RNA, 逆转录 cDNA。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 为内参基因。反应体系为: 2 × SYBR Green qPCR Mix 10 μl、ROX 0.4 μl、上游

引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl、cDNA 1 μl、ddH₂O 7.8 μl; 反应条件为: 95 °C 5 min、95 °C 10 s、60 °C 1 min、95 °C 30 s, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt} 法对结果进行分析, 计算相对表达量。

1.7 Western blot 法检测 IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 蛋白相对表达量 取对数生长期的 NG2 细胞, 按 2 × 10⁵ 个/孔接种至 6 孔板中。按 1.4 项分组干预细胞。按蛋白提取试剂盒提取各组 NG2 细胞蛋白, 应用 BCA 蛋白检测试剂盒定量, 电泳分离后, 转移至 PVDF 膜; 经封闭、一抗孵育(稀释度均为 1 : 1 000)、TBST 洗膜, HRP 标记二抗(1 : 10 000) 孵育, TBST 洗膜后, 应用 ChemicDocTM XRS⁺ 成像显影, 计算 IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 相对蛋白表达量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组之间比较使用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义, 所有实验至少独立进行 3 次。

2 结果

2.1 JuA 对 NG2 细胞存活率的影响 为了检测 JuA 对 NG2 细胞存活率的影响, 本实验选取浓度为 0 ~ 40 μmol/L JuA 干预细胞。与 0 μmol/L 组比较, 20、40 μmol/L JuA 组细胞存活率降低, 差异有统计学意义(*P* < 0.05, *P* < 0.01), JuA 的浓度低于 10 μmol/L 时对 NG2 细胞存活率无明显影响。见图 1。根据 CCK-8 法检测结果, 已知 0 ~ 10 μmol/L JuA 为安全浓度, 因此, 选取 10 μmol/L JuA 用于后续实验。

表 1 基因引物序列

名称	引物序列	产物大小 (bp)
IL-1β	上游 5'-TGACAGGCAACCCTTACC-3'	123
	下游 5'-CCCATACACACGGACAAC-3'	
TNF-α	上游 5'-GAAACAGTCTGCGAGGTGTG-3'	158
	下游 5'-TTCTTCTTGGAGCCACACAC-3'	
BDNF	上游 5'-TCTACGAGACCAAGTGTAAATCCCAT-3'	166
	下游 5'-GAAGTGCTAT CCTTATGAACCGC-3'	
cAMP	上游 5'-CTGAGGGCTCACGCAAGAA-3'	97
	下游 5'-GCAGCACGGTATAGGTGAA-3'	
Epac	上游 5'-GCACGCTGCTCAATATGGTG-3'	98
	下游 5'-CGGTGCTCGAACACTAGCTG-3'	
Rap1	上游 5'-ATGCCTGAGTACAAGCTAGTACT-3'	142
	下游 5'-AATCTACTCGACTTGTCTTCTG-3'	
GAPDH	上游 5'-ACAGCAACAGGTTGGTGGAC-3'	98
	下游 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTTT-3'	

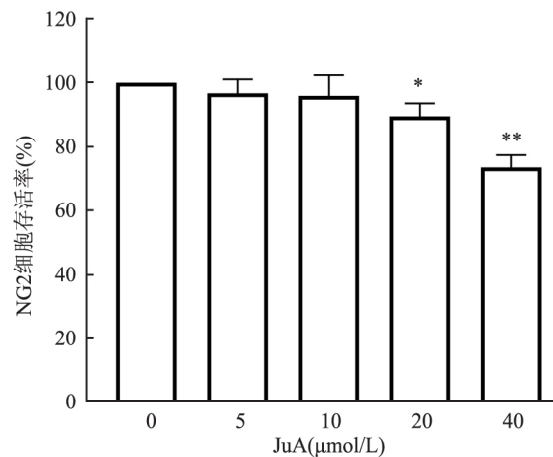


图 1 JuA 对 NG2 细胞 24 h 存活率的影响(*n* = 6)

与 0 μmol/L 组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.2 PTX 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP mRNA 表达的影响 与对照组比较,PTX 降低 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达 ($P < 0.01$),增加 BDNF、cAMP mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。见图 2。

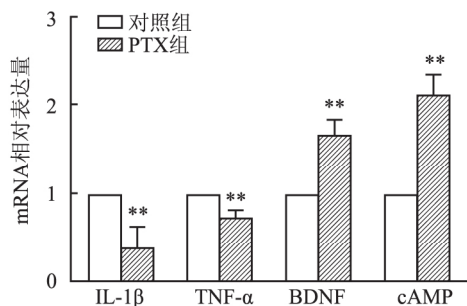


图2 PTX 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP mRNA 表达的影响 ($n = 6$) 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 PTX 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF 蛋白表达的影响 与对照组比较,PTX 降低 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的表达 ($P < 0.01$),增加 BDNF 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 3。

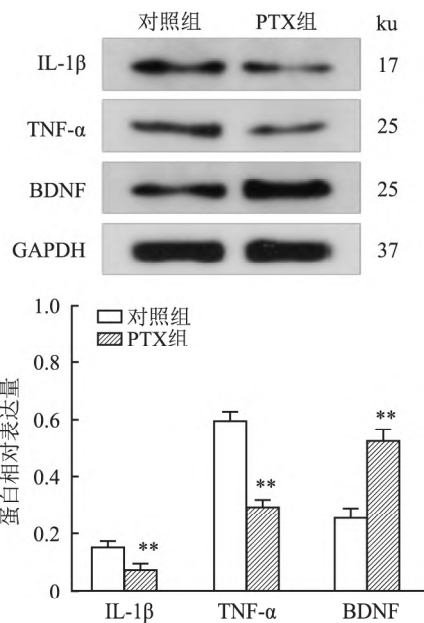


图3 PTX 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF 蛋白表达的影响 ($n = 3$) 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 ESI-09 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、Epac、Rap1 mRNA 表达的影响 与对照组比较,ESI-09 增加 IL-1 β 、TNF- α mRNA 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 降低 BDNF、Epac、Rap1 mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。见图 4。

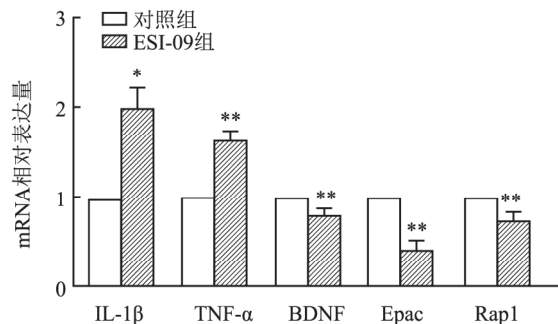


图4 ESI-09 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、Epac、Rap1 mRNA 表达的影响 ($n = 6$) 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 ESI-09 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、Epac、Rap1 蛋白表达的影响 与对照组比较,ESI-09 增加 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达 ($P < 0.01$),降低 BDNF、Epac 和 Rap1 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 5。

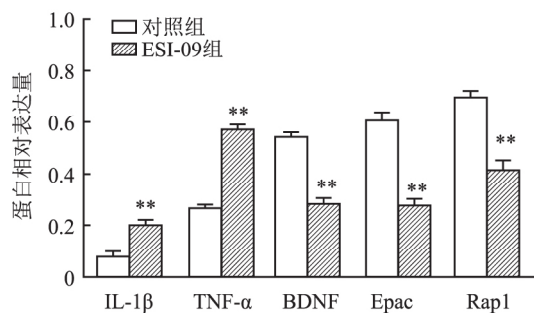
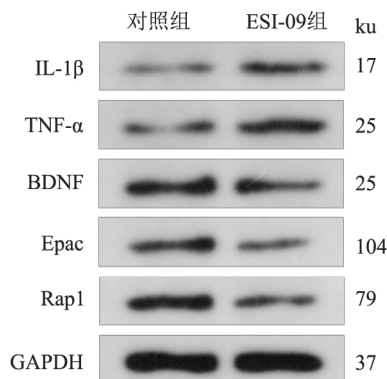


图5 ESI-09 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、Epac、Rap1 蛋白表达的影响 ($n = 3$) 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.6 JuA 对 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 mRNA 表达的影响 与对照组比较, JuA 增加 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP、Epac 和 Rap1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 阳性药增加 BDNF、IL-1 β 、TNF- α 、cAMP、Epac 和 Rap1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 6。

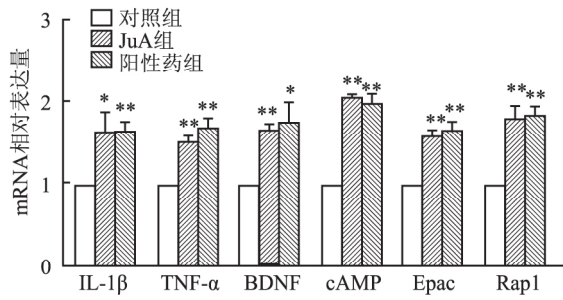


图6 JuA对NG2细胞IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 mRNA表达的影响 (n=6) 与对照组比较: * P<0.05, ** P<0.01

2.7 JuA对NG2细胞IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac、Rap1蛋白表达的影响 与对照组比较, JuA增加IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac和Rap1蛋白表达 (P<0.01); 阳性药增加IL-1β、TNF-α、BDNF、cAMP、Epac和Rap1蛋白表达 (P<0.01)。见图7。

3 讨论

NG2细胞作为中枢神经系统中一类新型神经胶质细胞, 不仅能够表达γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)等神经递质受体, 还表达Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Cl⁻等电压门控性离子通道。Glu和GABA是脑内兴奋性和抑制性的神经递质。

课题组前期研究^[4]显示, NG2细胞的兴奋性受到抑制后可影响大鼠中缝核内Glu和GABA的含量。NG2细胞与Glu能和GABA能神经元产生功能性突触连接, 并接受神经元突触信号输入, 对兴奋性和抑制性信号作出反应, 在中枢神经系统信息传递和神经元活动的调节中发挥重要作用。NG2细胞能够产生α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酮酸(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)受体介导的突触后兴奋性电流, 并以剂量依赖性方式抑制其增殖, 这些效应的发生是由神经元引发的Glu信号转导所调节的^[5]。表明NG2细胞可能与中枢神经系统的兴奋性有关。

在中枢神经系统中, cAMP/Epac信号通路在细胞中普遍表达, 不仅参与细胞正常的生理活动, 还参与中枢神经轴突再生、炎症反应、细胞黏附、睡眠调节等功能^[6]。研究表明增加细胞内cAMP可抑制TNF-α和IL-1β的释放^[7], 细胞以cAMP/Epac依赖性方式产生BDNF^[8]。表明cAMP/Epac信号通路能够介导细胞分泌IL-1β、TNF-α和BDNF。Rap1激活是由各种细胞外刺激诱导的, 并且通过cAMP与Epac信号传导密切相关。Rap1的激活也能抑制IL-1β、TNF-α细胞因子的产生^[9]。cAMP/Epac/Rap1是否参与调控NG2细胞分泌IL-1β、TNF-α、BDNF值得进一步研究。本研究使用特异性增加细胞内cAMP含量的PTX, 发现PTX可减少NG2细胞IL-1β、

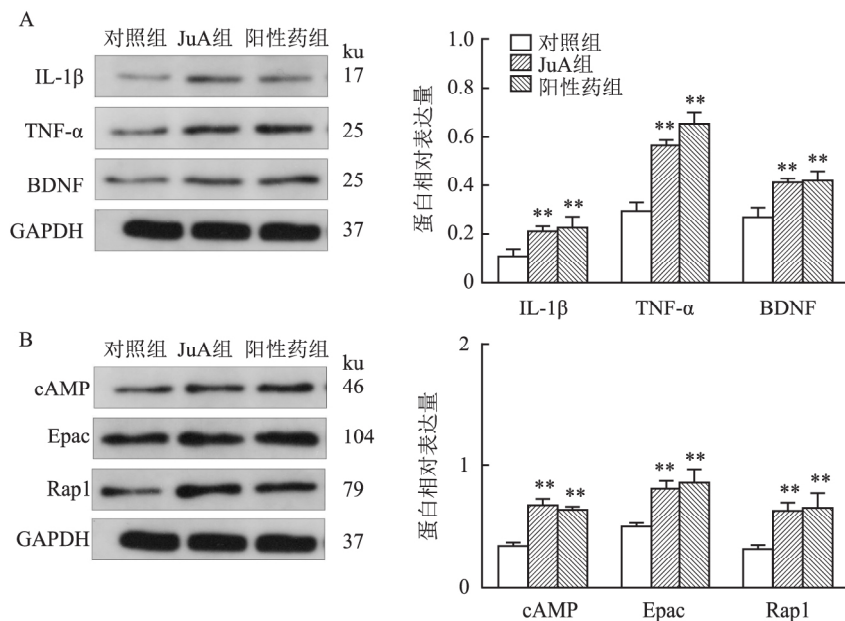


图7 JuA对NG2细胞的影响 (n=3)

A: JuA对NG2细胞IL-1β、TNF-α、BDNF蛋白表达的影响; B: JuA对NG2细胞cAMP、Epac、Rap1蛋白表达的影响; 与对照组比较:

** P<0.01

TNF- α mRNA 和蛋白的表达,增加 BDNF 和 cAMP mRNA 和蛋白的表达。然而使用 ESI-09 后,IL-1 β 、TNF- α 和 BDNF mRNA 和蛋白表达与 PTX 趋势相反,Epac 和 Rap1 mRNA 和蛋白表达降低。表明 cAMP/Epac/Rap1 信号通路参与 NG2 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 和 BDNF。

JuA 是酸枣仁中的一种关键皂苷,具有抗焦虑和镇静催眠作用,可降低睡眠潜伏期和延长睡眠时间。现代研究^[10]表明 JuA 不仅通过抑制 Glu 神经元介导的兴奋信号通路,提高 GABA 神经受体的基因转录水平,调节肠道黏膜系统上 IL-1 β 、TNF- α 等细胞因子的分泌,影响大脑神经细胞之间的细胞因子网络,还通过调节 cAMP-PKA 信号通路,发挥镇静和催眠作用。JuA 如何对 NG2 细胞发挥作用目前尚未明确。本研究显示 JuA 可增加 NG2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF、cAMP、Epac、Rap1 mRNA 和蛋白的表达,而 PTX 增加 cAMP 和 BDNF mRNA 和蛋白的表达,降低 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 和蛋白的表达。这可能是由于 JuA 还通过其他信号通路影响 NG2 细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α 。研究^[11]显示 IL-1 β 、TNF- α 可通过上调兴奋性 Glu 能传递和下调抑制性 GABA 能传递来增加大脑兴奋性。BDNF 通过酪氨酸激酶受体 B、N-甲基-D-天冬氨酸受体,改变细胞膜对 Ca²⁺、Na⁺ 通透性起到调节神经兴奋性的作用^[12]。提示 IL-1 β 、TNF- α 和 BDNF 能够影响皮层兴奋性。本研究进一步发现 JuA 可能作用于 cAMP/Epac/Rap1 信号通路调控 NG2 细胞分泌 BDNF,进而影响皮层兴奋性来发挥作用。

综上所述,NG2 细胞能通过 cAMP/Epac/Rap1 信号通路分泌 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF, JuA 可能通过影响 NG2 细胞的分泌功能及 cAMP/Epac/Rap1 信号通路来发挥作用。未来本课题组将继续探讨 JuA 影响 NG2 细胞分泌 IL-1 β 和 TNF- α 有关的信号通路。

参考文献

- [1] Parolisi R, Boda E. NG2 Glia: novel roles beyond remyelination [J]. Neuroglia, 2018, 1(1): 151–75.
- [2] 张 灏. cAMP 信号通路介导全麻药遗忘和睡眠损害效应 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [3] 杨婷婷, 王 慧, 石 鹏, 等. 酸枣仁汤含药血清对 NG2 细胞分泌 IL-1 β 、TNF- α 、BDNF 及 cAMP/Epac 信号通路的影响 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 16–20.
- [4] 杨 欣, 全 睿, 王 慧, 等. 微透析法研究 NG2 细胞功能变化对大鼠中缝核兴奋性和抑制性递质含量的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(6): 894–8.
- [5] Bellesi M, Pfister-Genskow M, Maret S, et al. Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors [J]. J Neurosci, 2013, 33(36): 14288–300.
- [6] 张 灏. cAMP 信号通路介导全麻药遗忘和睡眠损害效应 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.
- [7] Wang J, Wu M, Lin X, et al. Low-concentration oxygen/ozone treatment attenuated radiculitis and mechanical allodynia via PDE2A-cAMP/cGMP-NF- κ B/P65 signaling in chronic radiculitis rats [J]. Pain Res Manag, 2018, 12(13): 5192814.
- [8] Allen J K, Armaiz-Pena G N, Nagaraja A S, et al. Sustained adrenergic signaling promotes intratumoral innervation through BDNF induction [J]. Cancer Res, 2018, 78(12): 3233–42.
- [9] Tavares L P, Negreiros-Lima G L, Lima K M, et al. Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation [J]. Pharmacol Res, 2020, 159: 1–43.
- [10] Wang X X, Ma G I, Xie J B, et al. Influence of JuA in evoking communication changes between the small intestines and brain tissues of rats and the GABAA and GABAB receptor transcription levels of hippocampal neurons [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 159: 215–23.
- [11] Reid A Y, Galic M A, Teskey G C, et al. Febrile seizures: Current views and investigations [J]. Can J Neurol Sci, 2009, 36(6): 679–86.
- [12] 籍新潮, 徐如祥. 脑源性神经营养因子在中枢神经系统损伤中的多种神经保护作用及其机制的研究进展 [J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2016, 2(3): 168–72.

The role of cAMP/Epac/Rap1 signaling pathway regulate the secretion of IL-1 β , TNF- α , BDNF from NG2 cell and the effect of Jujuboside A

Yang Tingting, Wang Hui, Shi Peng, Teng Liu, Li Yue, Du Min, Tu Xiaohua, Yang Guangyong, Deng Ying
(School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025)

Abstract Objective To investigate whether the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) /exchange proteins directly activated by cAMP (Epac) /ras-related protein 1 (Rap1) signalling pathway is involved in the intervening mechanisms of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Jujuboside A (JuA) secretion by NG2 cells. **Methods** NG2 cells were cultured *in vitro* and the experi-

Er,Cr:YSGG 激光加速牙本质矿化的研究

陈百顺, 夏荣, 余金兰

摘要 目的 研究 Er,Cr:YSGG 激光对牙本质胶原纤维矿化的影响, 加快矿化过程缩短矿化时间。方法 选取人类健康第三磨牙, 除去牙釉质留下殆面的牙本质, 将牙本质脱矿, 留下牙本质胶原纤维网, 将脱矿后的胶原纤维放置于配置的再矿化液中, 用 Er,Cr:YSGG 照射, 将试验前后的牙齿标本使用扫描电子显微镜 (SEM) 分析其表面形态, 能谱仪 (EDS) 分析钙磷元素的分布, 维氏硬度仪检测牙本质标本表面显微硬度。结果 经 Er,Cr:YSGG 激光照射后的牙本质标本牙本质小管中有新的矿物质生成, 覆盖于牙本质小管内壁上, 钙磷元素在牙本质小管内壁上富集, 牙本质硬度提高。结论 Er,Cr:YSGG 激光能辅助牙本质胶原纤维在矿化液中矿化, 形成新的矿物质, 并能缩短牙本质胶原纤维在矿化液中的矿化时间。

关键词 Er,Cr:YSGG; 牙本质; 胶原纤维; 矿化

中图分类号 R 781.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)02-0270-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.017

目前临床上治疗牙体缺损的最常用方法是树脂粘接术, 然而大量的实验室和临床证据表明, 树脂粘接术的长期疗效不佳, 出现充填体着色、微渗漏继发

龋和充填体脱落。牙本质主要由无机矿物质羟基磷灰石 (HA) 和有机质 I 型胶原纤维 (占有有机物的 90%) 组成^[1], 牙本质胶原纤维的再矿化为解决粘接界面的问题提供了一种新的途径。除了牙体缺损, 牙本质敏感症也是临床上常见的口腔疾病, 其主要是由于牙釉质缺损, 牙本质暴露, 当牙齿受到外界刺激时会产生短暂而尖锐的疼痛^[2], 封闭牙本质小管阻断此过程将会是治疗牙本质过敏症的有效方法, 牙本质胶原纤维的再矿化也为其提供了新的治疗方法^[3]。目前牙本质胶原纤维矿化过程需要几周至几个月, 这大大限制了这项技术应用于临床。该研究基于已有的胶原纤维矿化方法, 使用 Er,Cr:YSGG 激光辅助, 观察对矿化时间的影响, 为这项技术应用于临床提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人类健康第三恒磨牙由安徽医科大学第二附属医院口腔科提供 (经安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准)。

1.2 主要试剂 氯化钙 (CaCl₂)、磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)、氢氧化钠 (NaOH)、盐酸 (HCl)、聚天冬氨酸 (polyaspartic acid, PASP)、乙二胺四乙酸 (ED-TA)、叠氮钠 (NaN₃)、胃蛋白酶均购自上海索莱宝生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 Sartorius 电子天平 (BSA124S, 德国

2022-12-26 接收

基金项目: 国家重点研发计划 (编号: 2018YFB0407204)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院口腔科, 合肥 230601

作者简介: 陈百顺, 男, 硕士研究生;

夏荣, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xiarongqh@aliyun.com

ment was divided into control group, pertussis toxin (PTX) group, ESI-09 group, JuA group and positive drug group. The effect of different concentrations of JuA on the survival rate of NG2 cells was detected by CCK-8 method, and the expression of IL-1 β , TNF- α , BDNF, cAMP, Epac, Rap1 mRNA and protein in each group was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Compared with the control group, the PTX group decreased the expression of IL-1 β and TNF- α mRNA and protein ($P < 0.01$) and increased the expression of cAMP and BDNF mRNA and protein ($P < 0.01$); the ESI-09 group increased the expression of IL-1 β and TNF- α mRNA and protein ($P < 0.05$) and decreased the expression of BDNF, Epac and Rap1 mRNA and protein expression ($P < 0.01$); the JuA group and positive drug group increased IL-1 β , TNF- α , BDNF, cAMP, Epac, Rap1 mRNA and protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion** The cAMP/Epac/Rap1 signaling pathway is involved in the secretion of IL-1 β , TNF- α , and BDNF by NG2 cells. JuA may act on cAMP/Epac/Rap1 signaling pathway to affect the secretion of BDNF by NG2 cells.

Key words NG2 cell; Jujuboside A; cAMP; Epac; Rap1