

•基础研究•

•论著•

红光LED照射对自然老化SKH-1小鼠皮肤的影响

康紫薇, 陈琦, 申抒展, 王秀丽, 王佩茹

(同济大学附属皮肤病医院, 同济大学医学院光医学研究所 上海 200443)

[摘要]目的: 探讨红光LED照射对自然老化SKH-1小鼠皮肤的影响。方法: 选取20只12月龄SKH-1小鼠, 随机分为四组, 使用红光LED仪对各组小鼠以0 J/cm²、14.4 J/cm²、32.4 J/cm²和50.4 J/cm²的能量密度连续照射60 d。在第0天、第10天、第30天和第60天, 通过拍摄大体照片和皮肤镜照片记录皮肤外观变化, 从皮肤粗糙、皮肤皱纹和皮肤紧致三个方面进行皮肤老化等级评分, 检测角质层含水量(Water content of the stratum corneum, WCSC)、经皮失水率(Transepidermal water loss, TEWL)评估皮肤屏障功能, 行光学相干断层扫描成像技术(Optical coherence tomography, OCT)检测真皮层信号强度, 通过HE染色与Masson染色比较四组小鼠的皮肤组织结构变化。结果: 与0 J/cm²组相比, 肉眼和皮肤镜下均观察到红光照射组小鼠的皮肤更光滑紧致, 且皮肤老化等级评分表明在红光照射后小鼠皮肤粗糙、皮肤皱纹和皮肤紧致程度明显改善。红光照射不仅改善皮肤外观, 而且能显著改善WCSC和TEWL。OCT结果表明红光照射增加了真皮层厚度和真皮信号强度。皮肤组织HE染色结果表明红光照射增加表皮厚度, 维持表皮层细胞形态正常且排列紧密。Masson染色结果显示红光照射的小鼠真皮胶原含量显著增多, 胶原纤维排列整齐紧密。红光LED照射组的以上指标的改善作用随能量密度的增大而增强, 尤其是50.4 J/cm²组的作用最为显著, 且改善作用持续至照光第60天。结论: 红光LED可显著改善自然老化SKH-1小鼠皮肤外观和皮肤屏障功能, 增加表皮的厚度和真皮胶原含量, 维持胶原纤维的紧密排列, 为LED光源在皮肤老化的临床应用提供了实验依据。

[关键词]LED; 自然老化; SKH-1小鼠; 嫩肤; 皮肤屏障; 胶原

[中图分类号]R751.05 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2024)10-0001-06

Effect of Red Light-emitting LED on Skin of Intrinsically Aged SKH-1 Mice

KANG Ziwei, CHEN Qi, SHEN Shuzhan, WANG Xiuli, WANG Peiru

(Institute of Photomedicine, Shanghai Skin Disease Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200443, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of red light-emitting LED on the skin of intrinsically aged SKH-1 mice. **Methods** Twenty 12-month-old SKH-1 mice were selected and randomly divided into four groups, and each group was irradiated with light doses of 0 J/cm², 14.4 J/cm², 32.4 J/cm² and 50.4 J/cm² for 60 consecutive days using a red light LED instrument. On days 0, 10, 30 and 60, changes in skin appearance were recorded by taking gross photographs and dermoscopic photographs, and a skin aging rating scale was scored in terms of skin roughness, skin lines and skin firmness. Skin barrier function was measured by the water content of the stratum corneum (WCSC) and the transepidermal water loss (TEWL). Optical coherence tomography (OCT) was performed to detect the signal intensity in the dermis, and the structural changes in the skin of the four groups of mice were compared by HE staining and Masson staining. **Results** Compared to the 0 J/cm² group, smoother and firmer skin was observed both visually and dermoscopically in the red light-treated mice, and skin aging rating scale showed a significant improvement in skin roughness, skin wrinkles and skin firmness after red light irradiation. Red light irradiation not only improved skin appearance, but also significantly improved WCSC and TEWL. OCT results showed that red light irradiation increased the dermal thickness and dermal signal intensity. HE staining of skin tissues showed that red light irradiation increased epidermal thickness and maintained normal and tightly arranged cells in the epidermal layer. The Masson staining results showed that the dermal collagen content was significantly increased and collagen fibers were neatly arranged in the dermis of mice treated with red light. The improvement of the above indicators in the red LED irradiation group was enhanced with the increase of energy density, especially the effect of 50.4 J/cm² group was the most significant, and the

基金项目: 上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”自然科学基金(名称: 皮肤淋巴管重塑在光动力抗衰老中的作用及机制研究; 编号: 22ZR1455400)

通信作者: 王佩茹, 副主任医师、副教授、博士生导师, 北京大学博士、美国密歇根大学访问学者; 研究方向为皮肤肿瘤、皮肤美容。E-mail: wangpeiru@tongji.edu.cn

第一作者: 康紫薇, 在读博士研究生; 研究方向为皮肤肿瘤及皮肤美容治疗。E-mail: kangzw0607@163.com

improvement lasted until the 60th day of illumination. **Conclusion** Red LED can significantly improve the skin appearance and skin barrier function of naturally aged SKH-1 mice, increase epidermal thickness and dermal collagen content, and maintain the tight arrangement of collagen fibers, providing a new experimental basis for the clinical application of LED light source in skin aging.

Key words: LED; intrinsic aging; SKH-1 mice; skin rejuvenation; skin barrier; collagen

自然老化又称为皮肤内源性老化,是由年龄增加引起的皮肤衰老现象,主要表现为皮肤弹性降低、皱纹出现、皮肤松弛、干燥粗糙、色素沉着^[1-2]。自然老化引起的皮肤组织结构改变表现为表皮细胞形态改变,真皮胶原纤维排列紊乱卷曲,细胞外基质降解继而真皮层萎缩^[3-4]。皮肤老化不仅影响组织结构,还会引起皮肤屏障功能受损,包括渗透性内稳态受损、角质层水合作用减少等功能失衡^[5-6]。

自然老化的发生非常普遍,它不仅影响皮肤外观,还会促成多种老年性皮肤病。故干预、延缓皮肤老化对预防皮肤疾病、促进患者身心健康、提升生活质量有重要意义。目前皮肤老化的治疗方法繁多,但遮光剂仅起预防作用^[7],而药物治疗周期长^[8]。脂肪干细胞^[9-10]、富血小板血浆^[11]等新兴生物治疗技术也为抗皮肤老化带来了新的发展机遇,但其安全性还需高质量的临床研究进行检验。激光、强脉冲光不仅光源结构复杂、价格昂贵,且存在色素沉着、感染等风险,因此常应用于医疗机构,而在非专业环境下无法大规模推广使用^[12-13]。

发光二极管(Light-emitting diode, LED)是以非相干的方式发射窄光谱的一种光源,具有造价低、体积小和安全性高的特点^[14]。红色LED光源通过滤光片处理得到波长为600~700 nm的红色可见光波段,可以对细胞产生温和的光生物调节作用^[15]。LED光源通常能量输出较低,不易对皮肤组织造成损伤,具有较高的安全性,故LED是一种可以应用于家庭的光疗设备^[16-17]。研究表明红色LED光照射可促进成纤维细胞增殖和迁移^[18],促进真皮中破碎的弹性纤维和变形的胶原蛋白降解,从而促进新胶原蛋白的合成^[19],使得真皮胶原纤维排列整齐紧密、密度显著增加^[20],可改善皮肤皱纹、紧致度等皮肤外观^[21],呈现出延缓皮肤衰老的保护作用。本研究通过使用红光LED仪连续照射自然老化SKH-1无毛小鼠60 d,从小鼠皮肤的外观改善程度、皮肤老化等级评分、皮肤屏障功能、皮肤组织结构、真皮胶原纤维的含量与排列情况等方面,探究了红光对自然老化SKH-1小鼠皮肤的影响,为红光LED仪在皮肤老化的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器: HE染色试剂盒(上海威奥生物科技有限公司)、马松染色试剂(LEAGENE, DC0033)、中性树脂胶(上海威奥生物科技有限公司)、无水乙醇(上海凌峰化学试剂有限公司)、二甲苯[生工生物工程(上海)股份有限公司]、奥普家用红光仪(奥普家居股份有限公司)、异氟醚气体麻醉装置(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,

R540)、佳能照相机(日本Canon公司, G16)、角质层含水量检测仪(芬兰Delfin Technologies Ltd)、经皮水丢失检测仪(芬兰Delfin Technologies Ltd)、皮肤镜(国药医工0000000123736)、光学相干层析成像系统(美国新泽西州纽顿市Thorlabs公司, Ganymede-II-HR)、石蜡切片机(LEICA RM2235)、光学显微镜(OLMPUS CX21型)、显微镜照相系统(Nikon E200, 日本)。

1.1.2 实验动物: 选用皮肤自然老化的SKH-1同龄雌性无毛小鼠20只, 体重20~25 g, 12月龄, 购自上海市公共卫生中心, 小鼠饲养于清洁动物饲养中心, 标准灭菌饲料和饮用水喂养。

1.2 LED光疗及分组: 本研究中所使用的LED光源主要由630 nm红光灯管构成, 含590 nm黄光灯管调和, 光源距离SKH-1小鼠背部皮肤30~35 cm。该LED光源分为3档调节, 低、中、高三档的功率密度分别是8 mW/cm², 18 mW/cm², 28 mW/cm²。LED红光的照射时间多为15~60 min, 治疗周期为10~60 d^[22-24], 在本研究中为观察有效且安全的光照剂量以及合适的治疗周期, 故设定照光时间为30 min, 每天1次, 治疗周期为60 d。小鼠随机分为四组: 0 J/cm²组(0 mW/cm², 30 min)、14.4 J/cm²组(8 mW/cm², 30 min)、32.4 J/cm²组(18 mW/cm², 30 min)、50.4 J/cm²组(28 mW/cm², 30 min)。

1.3 红光LED仪改善SKH-1小鼠皮肤自然老化的观察指标: 分别于治疗第0、10、30、60天对各组SKH-1小鼠进行以下评估。

1.3.1 鼠背皮肤外观改善评估: SKH-1小鼠放置于麻醉台, 异氟烷气体吸入诱导麻醉, 待SKH-1小鼠进入麻醉状态开始拍摄背部大体照片及皮肤镜照片, 观察并记录SKH-1小鼠背部皮肤老化程度, 对粗糙度、皮肤纹路及皮肤紧致度的评分标准参照Kong SZ等^[25]和Alam M等^[26]进行制定, 见表1。

表1 皮肤老化等级评分标准

评分/分	皮肤粗糙	皮肤皱纹	皮肤紧致
0	光滑	无	紧致
1	平滑	轻微纹路	稍松弛
2	轻度粗糙	中等褶皱	中等松弛
3	中度粗糙	较严重褶皱	较松弛
4	严重粗糙且有凹陷	严重且广泛褶皱	严重且广泛松弛

1.3.2 皮肤屏障功能相关指标检测: 对小鼠背部皮肤进行皮肤屏障功能相关指标检测, 使用皮肤角质层含水量检测仪、经皮水丢失检测仪, 分别于小鼠背部左右对称处测量三组WCSC和TEWL数据, 每次测量区域互不重合。

1.3.3 光学相干层析成像: 对小鼠背部治疗部位的皮肤进行

光学相干层析成像 (Optical coherence tomography, OCT) 检测, OCT成像完成后使用Image J软件进行信号强度测量, 从真皮层中随机选择3个大约 $0.05\text{ mm}\times 0.05\text{ mm}$ 的目标区域分析其平均灰度水平, 对比各组之间的真皮信号强度变化。

1.3.4 鼠背皮肤组织学观察: 取小鼠背部治疗部位的皮肤组织, 每块皮肤组织面积约为 1 cm^2 , 放入10%福尔马林中固定, 进行石蜡包埋切片。常规HE染色: 切片厚度约 $4\text{ }\mu\text{m}$, 切片晾干后于 55°C 烘烤2 h, 常规脱蜡、水化, 苏木素染细胞核、伊红染细胞质, 脱水、透明、封片后镜下观察及拍照。改良Masson三色染色: 石蜡切片胶原纤维被苯胺蓝染成蓝色, 而肌纤维呈红色, 观察各组真皮结构及胶原排列情况, 每张切片随机取3个大小相等的视野, 计算每个视野的胶原容积百分比, 比较各组间的胶原含量差异, 并对胶原排列紊乱度进行评估^[27], 评分标准见表2。

表2 胶原排列紊乱评分标准

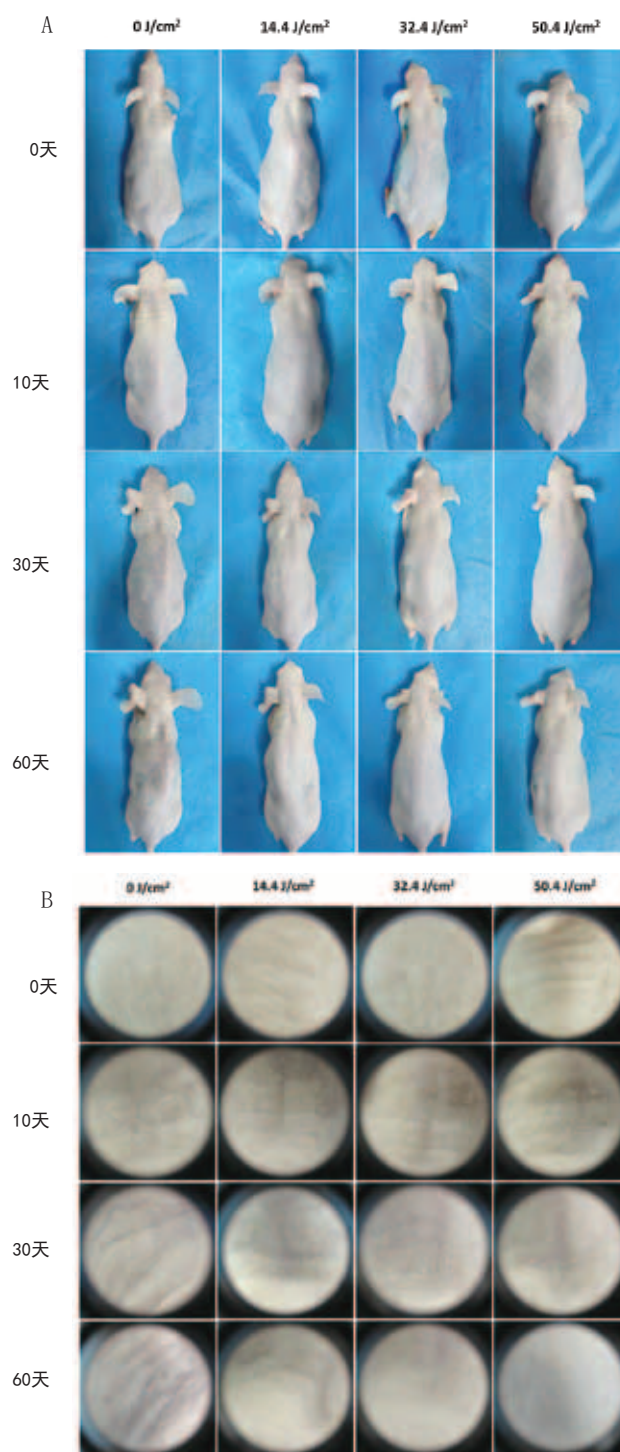
评分/分	胶原排列紊乱度
0	各胶原条排列整齐, 条理清晰
1	少于1/3的胶原束蜷曲成团, 排列紊乱
2	低于1/2高于1/3的胶原, 蜷曲成团, 排列紊乱
3	低于2/3高于1/2的胶原束蜷曲成团, 排列紊乱
4	超2/3胶原束束间蜷曲成团

1.4 统计学分析: 实验数据采用SPSS 17.0统计软件进行处理, 计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析, 组间两两比较使用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠皮肤外观变化: 肉眼观察四组小鼠皮肤外观发现, 随着时间的推移, 0 J/cm^2 组小鼠的老化程度不断加重, 表现出典型的皮肤老化表型, 如粗糙脱屑、皮肤松弛、色素沉着、皱纹深且多为横向; 而红光治疗组小鼠的皮肤状况有明显改善, 变得光滑细腻 (见图1A)。皮肤镜检查结果显示, 视野下对照组小鼠出现纵横交错的皱纹、皮肤干燥、黄色丘疹, 而在红光治疗组小鼠仅见少量浅表皱纹 (见图1B)。以上皮肤外观的改善在 32.4 J/cm^2 组和 50.4 J/cm^2 组尤为显著, 并持续至照光第60天。

2.2 皮肤老化等级评分: 治疗前, 各组的皮肤老化等级评分比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。相较于 0 J/cm^2 组, 32.4 J/cm^2 组和 50.4 J/cm^2 组小鼠的皮肤粗糙程度从照光第30天开始明显改善, 改善持续至照光第60天 (见图2A); 32.4 J/cm^2 组和 50.4 J/cm^2 组小鼠的皮肤皱纹从照光第10天开始明显改善, 随后第30天开始 14.4 J/cm^2 组小鼠的皮肤皱纹也得到了改善, 改善持续至照光第60天 (见图2B); 32.4 J/cm^2 组和 50.4 J/cm^2 组小鼠的皮肤紧致度从照光第30天开始有明显的改善效果, 随后第60天 14.4 J/cm^2 组小鼠

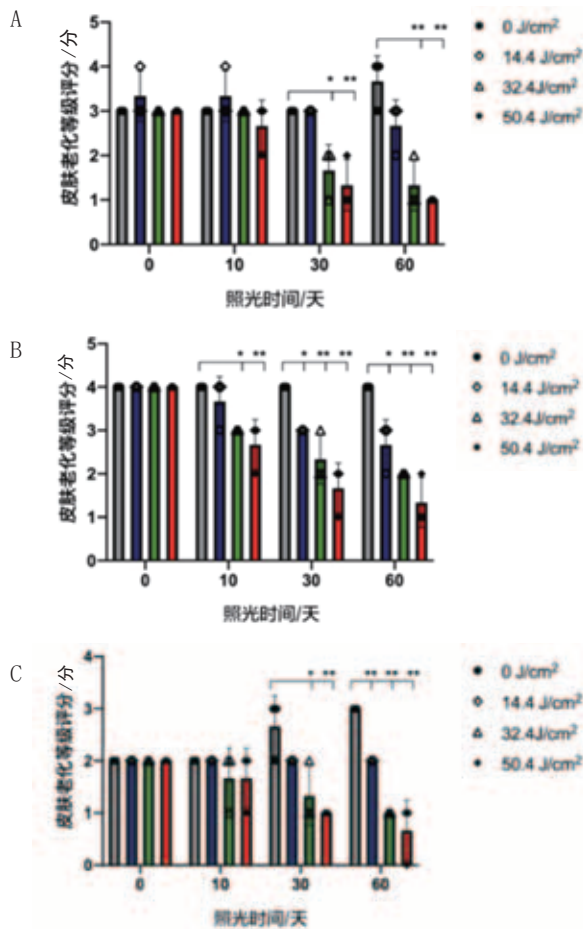


注: A. 治疗期间四组SKH-1小鼠大体照片; B. 治疗期间四组SKH-1小鼠颈背部皮肤镜照片

图1 治疗期间四组SKH-1小鼠的皮肤外观图片

也观察到皮肤紧致度的改善, 改善持续至照光结束 (见图2C)。综上, 红光治疗以时间-剂量依赖性方式改善皮肤老化产生的粗糙、皱纹及松弛等表现。

2.3 皮肤屏障功能相关指标测定: 治疗前, 各组皮肤屏障功能的差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与 0 J/cm^2 组相比, 32.4 J/cm^2 组和 50.4 J/cm^2 组小鼠的WCSC从第30天开始明显



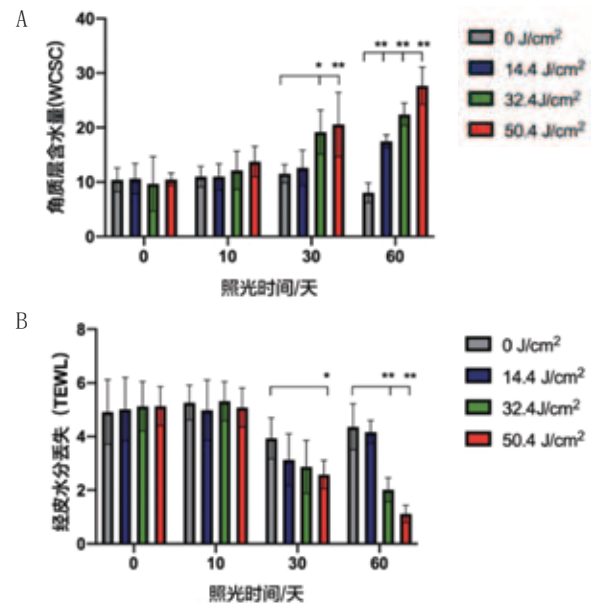
注: A. 治疗期间四组SKH-1小鼠皮肤粗糙等级评分; B. 治疗期间四组SKH-1小鼠皮肤皱纹等级评分; C. 治疗期间四组SKH-1小鼠皮肤紧致等级评分。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

图2 治疗期间四组SKH-1小鼠皮肤老化等级评分比较

增高并持续至照光第60天, 14.4 J/cm²组小鼠的WCSC在第60天明显升高(见图3A); 50.4 J/cm²组小鼠的TEWL从第30天开始明显降低并持续至照光第60天, 32.4 J/cm²组小鼠的TEWL在第60天明显降低(见图3B), 表明红光治疗可以改善皮肤屏障功能。

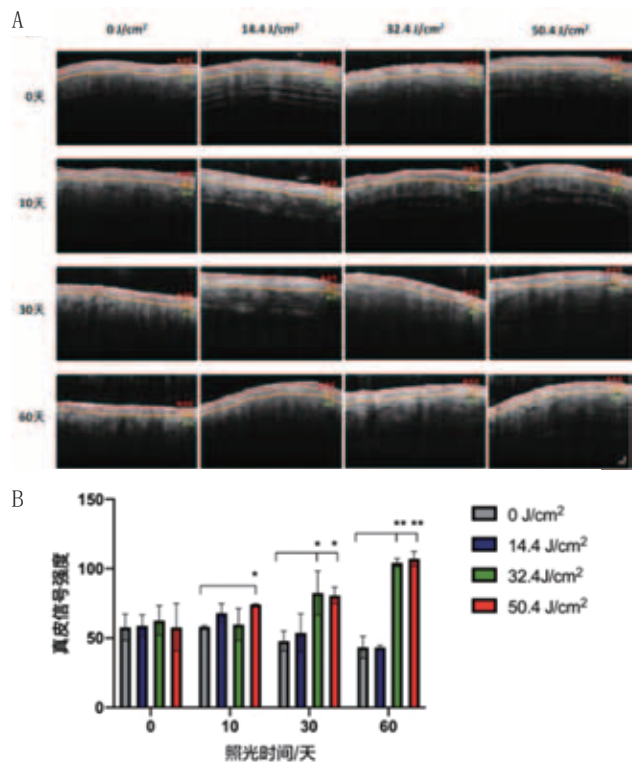
2.4 OCT检测: OCT是一种可以活体监测皮肤结构变化的新兴无创技术, 通过宽带光源检测组织不同深度层面的后向散射信号^[28]。OCT图像可清晰地观察到各组小鼠皮肤的角质层、表皮层与真皮层, 与0 J/cm²组小鼠相比, 32.4 J/cm²和50.4 J/cm²组小鼠的真皮层明显增厚(见图4A)。真皮层信号强度与真皮胶原纤维含量相关, 与0 J/cm²组小鼠相比, 50.4 J/cm²组小鼠的真皮信号强度从照光第10天开始明显升高并持续至照光第60天, 32.4 J/cm²组小鼠的真皮信号强度从照光第30天开始明显升高, 也持续至照光第60天(见图4B)。OCT检测表明光照剂量为32.4 J/cm²和50.4 J/cm²的红光治疗作用于真皮层, 增强真皮胶原纤维含量。

2.5 皮肤组织学结果: 小鼠皮肤组织HE染色结果显示, 对照组小鼠皮肤逐渐萎缩, 表皮和真皮逐渐变薄, 而中、高剂量组红光治疗的小鼠表皮层结构完整, 表皮细胞排列紧



注: A. 治疗期间四组SKH-1小鼠角质层含水量水平; B. 治疗期间四组SKH-1小鼠经皮水分丢失水平。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

图3 四组SKH-1小鼠的皮肤屏障功能相关指标比较



注: A. 治疗期间四组SKH-1小鼠OCT检测; B. 治疗期间四组SKH-1小鼠真皮信号强度。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

图4 四组自然老化SKH-1小鼠的OCT检测及真皮信号强度比较

密, 真皮组织呈波浪状, 真皮层细胞形态正常, 表明红光治疗可以改善小鼠的真表皮组织结构, 见图5。Masson染色组织学观察结果显示, 真皮层大量束状排列的胶原纤维被染成蓝色, 而肌纤维则呈红色(见图6A)。与0 J/cm²组相比, 32.4 J/cm²组和50.4 J/cm²组的胶原容积分数

(Collagen volume fraction, CVF) 从照光第10天开始显著增加并持续至照光第60天(见图6B), 表明红光治疗后真皮组织中胶原纤维含量明显增高; 32.4 J/cm²组和50.4 J/cm²组小鼠的胶原排列紊乱度从照光第30天开始显著改善, 持续至第60天, 表明红光治疗后胶原蛋白排列更加紧密规则, 蜷曲成团胶原纤维显著减少(见图6C)。

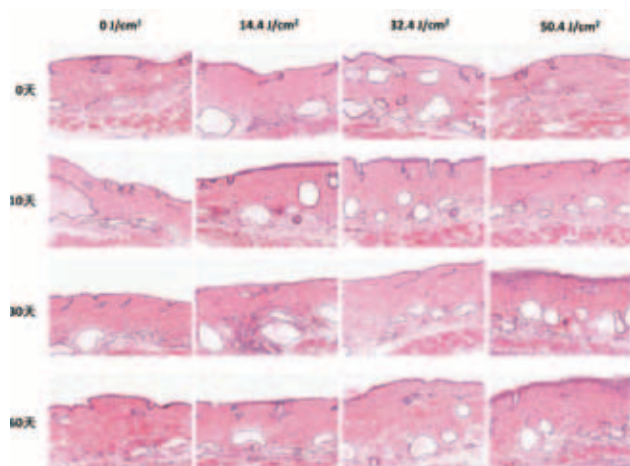


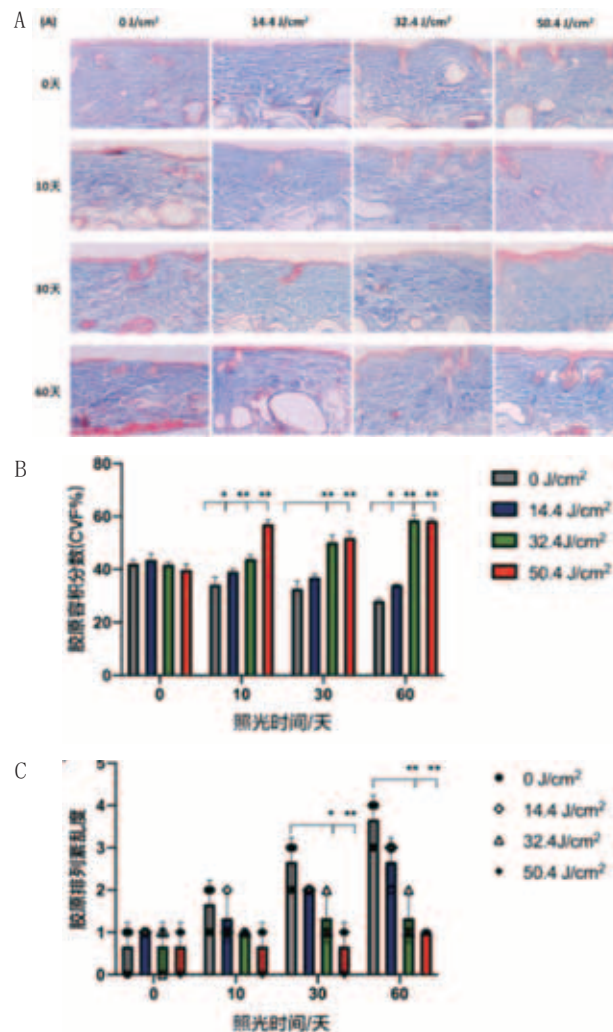
图5 照光不同时间四组小鼠的皮肤组织HE染色(100×)

3 讨论

红光LED是一种将电能转化为非相干光的仪器, 近年来发现红光具有光生物调节作用, 在皮肤创伤愈合^[29]、清除炎症^[22]、减少色素^[30]等方面具有促进作用。研究发现红光波长较长(625~760 nm), 可以穿透皮肤表层, 作用于真皮成纤维细胞, 促进胶原纤维增生, 有抗皮肤老化作用^[31]。红光照射是一种简单易行且安全性高的治疗手段, 近年来家用红光照射仪的出现让红光嫩肤的临床应用更加广泛, 故对红光LED仪治疗皮肤老化的探究是非常必要的。

在本研究中, 采用波长为635 nm的红光照射SKH-1小鼠, 为探索合适的红光治疗参数, 设置了四个组, 分别为0 J/cm²、14.4 J/cm²、32.4 J/cm²和50.4 J/cm²的光照剂量。肉眼观察到32.4 J/cm²和50.4 J/cm²组SKH-1小鼠的皮肤老化表现呈现明显的改善, 在皮肤镜下可以观察到皮肤更加光滑紧致, 通过皮肤老化等级评分说明小鼠的皮肤皱纹、粗糙度和紧致度均得到了不同程度的改善。皮肤屏障由皮肤“砖墙”结构构成, 与皮肤健康息息相关, TEWL和WCSC是评估皮肤屏障的两个重要指标^[6]。32.4 J/cm²和50.4 J/cm²组小鼠的TEWL较红光治疗前降低, 且WCSC较治疗前升高, 说明红光照射治疗对皮肤屏障功能有改善作用。以上实验结果说明32.4 J/cm²和50.4 J/cm²的能量密度, 60 d的治疗周期对自然老化的改善是安全有效, 并且不会影响皮肤屏障功能。

皮肤镜检测与OCT检测作为新兴的无创诊断技术, 对于及早发现皮肤老化具有重要意义^[32]。皮肤镜下结果显示, 0 J/cm²组小鼠皮肤表现为明显的横向皱纹、粗糙干燥, 而50.4 J/cm²组小鼠皮肤在第60天照射时仅见少量浅表皱纹。



注: A. 治疗期间四组SKH-1小鼠皮肤组织Masson染色; B. 治疗期间四组SKH-1小鼠胶原容积分数; C. 治疗期间四组SKH-1小鼠胶原排列紊乱度。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

图6 治疗期间各组SKH-1小鼠真皮胶原纤维的表达情况(200×)

通过OCT检测对红光治疗前后的老化皮肤进行跟踪观察, 结果显示对照组小鼠真皮层厚度不断变薄, 而32.4 J/cm²和50.4 J/cm²红光治疗组小鼠的真皮层厚度增加, 且真皮信号强度显著增强。通过以上两种无创在体技术证实了红光LED对皮肤老化的改善作用是十分显著的。

皮肤老化在组织结构上主要表现为表皮变薄、真皮萎缩, 真皮细胞数量减少、胶原纤维含量减少和排列紊乱^[29,33]。各组小鼠的皮肤组织HE染色结果可知对照组小鼠的真表皮厚度减薄, 角质层脱落、表皮细胞排列疏松、形态改变, 而光照剂量为32.4 J/cm²和50.4 J/cm²的红光治疗可维持表皮厚度, 表皮细胞排列紧密, 真皮组织呈波浪状, 真皮层细胞形态正常。真皮胶原纤维起到重要的支撑作用及营养功能, 胶原纤维的含量和排列是观察皮肤老化的重要指标。在本研究中进行Masson染色观察胶原纤维的变化, 可以观察到对照组小鼠胶原纤维含量逐渐减少, 且排列紊乱卷曲; 而32.4 J/cm²组和50.4 J/cm²组小鼠, 胶原纤维含量显著增

加,排列规整紧密,真皮胶原纤维空隙减小。可知红光可以通过促进真皮胶原纤维排列整齐紧密和增加胶原纤维密度,达到改善皮肤老化的作用。

综上,红光LED照射可显著改善自然老化SKH-1小鼠皮肤外观和皮肤屏障功能,增加表皮的厚度和真皮胶原含量,维持胶原纤维的紧密排列。本研究证实了红光LED对自然老化有显著的改善作用,为LED光源在皮肤老化的临床应用提供了新的实验依据。红光LED调控自然老化的机制还有待于进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1]Schumacher B, Krieg T M. The aging skin: from basic mechanisms to clinical applications[J]. *J Invest Dermatol*, 2021,141(4S):949-950.
- [2]Kohl E, Steinbauer J, Landthaler M, et al. Skin ageing [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2011,25(8):873-884.
- [3]Ke Y, Wang X J. TGF beta signaling in photoaging and UV-induced skin cancer[J]. *J Invest Dermatol*, 2021,141(4S):1104-1110.
- [4]Fitsiou E, Pulido T, Campisi J, et al. Cellular senescence and the senescence-associated secretory phenotype as drivers of skin photoaging[J]. *J Invest Dermatol*, 2021,141(4S):1119-1126.
- [5]王萌, 闫言. 美容营养品应用于改善皮肤老化的研究进展[J]. *中国美容医学*, 2021,30(8):179-182.
- [6]韩佳彤, 王佩茹, 王秀丽. 光动力治疗光老化及对皮肤屏障的影响[J]. *皮肤科学通报*, 2017,34(4):398-402,3.
- [7]Schneider S L, Lim H W. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2019,80(1):266-271.
- [8]Darlenski R, Surber C, Fluhr J W. Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach [J]. *Br J Dermatol*, 2010,163(6):1157-1165.
- [9]魏姝玥, 王海英, 李爱兰, 等. 脂肪干细胞对D-半乳糖致裸鼠皮肤老化的拮抗作用及对皮肤恢复功能的影响[J]. *中国美容医学*, 2020,29(1):62-67.
- [10]杨玉玲, 王佩茹, 曹智, 等. 脂肪干细胞细胞外囊泡在皮肤抗光老化中的研究进展[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2021,35(11):1295-1299.
- [11]Hesseler M J, Shyam N. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: A systematic review [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2019,81(3):834-846.
- [12]Lueangarun S, Namboonlue C, Tempark T. Postinflammatory and rebound hyperpigmentation as a complication after treatment efficacy of telangiectatic melasma with 585 nanometers Q-switched Nd: YAG laser and 4% hydroquinone cream in skin phototypes III-V [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2021,20(6):1700-1708.
- [13]Silpa-Archa N, Kohli I, Chaowattanapanit S, et al. Postinflammatory hyperpigmentation: A comprehensive overview: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, and noninvasive assessment technique [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 77(4): 591-605.
- [14]Sorbellini E, Rucco M, Rinaldi F. Photodynamic and photobiological effects of light-emitting diode (LED) therapy in dermatological disease: an update [J]. *Lasers Med Sci*, 2018,33(7):1431-1439.
- [15]Hession M T, Markova A, Graber E M. A review of hand-held, home-use cosmetic laser and light devices [J]. *Dermatol Surg*, 2015,41(3):307-320.
- [16]Guernonprez C, Declercq L, Decaux G, et al. Safety and efficacy of a novel home-use device for light-potentiated (LED) skin treatment [J]. *J Biophotonics*, 2020,13(12):e202000230.
- [17]赵欣研, 田燕, 刘玮. 非相干窄谱可见光(LEDs光源)在皮肤科的应用[J]. *中国美容医学*, 2015,24(14):82-85.
- [18]Hawkins D, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts [J]. *Photomed Laser Surg*, 2006,24(6):705-14.
- [19]Almeida Issa M C, Pineiro-Maceira J, Farias R E, et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in photodamaged skin by photodynamic therapy [J]. *Br J Dermatol*, 2009,161(3):647-653.
- [20]Pourang A, Tisack A, Ezekwe N, et al. Effects of visible light on mechanisms of skin photoaging [J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2022,38(3):191-196.
- [21]Kim S K, Koo G B, Kim Y S, et al. Epithelial-mesenchymal interaction during photodynamic therapy-induced photorejuvenation [J]. *Arch Dermatol Res*, 2016,308(7):493-501.
- [22]冯琴, 李海英, 李宇, 等. 高能窄谱红光联合烟酰胺和胶原贴敷料治疗面部皮炎疗效观察[J]. *中国美容医学*, 2018,27(11):53-56.
- [23]袁江, 龙新纯, 代国知, 等. 火针联合红蓝光治疗160例寻常性痤疮临床观察[J]. *中国美容医学*, 2016,25(11):100-102.
- [24]张方布, 蔡杏仪. 马齿苋、他克莫司联合LED红光治疗糖皮质激素依赖性皮炎疗效观察[J]. *皮肤病与性病*, 2019,41(6):852-854.
- [25]Kong S Z, Li D D, Luo H, et al. Anti-photoaging effects of chitosan oligosaccharide in ultraviolet-irradiated hairless mouse skin [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 103: 27-34.
- [26]Alam M, Hughart R, Champlain A, et al. Effect of platelet-rich plasma injection for rejuvenation of photoaged facial skin: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Dermatol*, 2018,154(12):1447-1452.
- [27]Yang Y, Shen S, Cao Y, et al. Remodeling lymphatic vessels in intrinsically aged skin on skh-1 mouse using low dose 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy via VEGF-C/VEGFR3 pathway [J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022,38:102851.
- [28]Vingan N R, Parsa S, Barillas J, et al. Evaluation and characterization of facial skin aging using optical coherence tomography [J]. *Lasers Surg Med*, 2023, 55(1): 22-34.
- [29]李明, 刘甜甜, 朱含汀, 等. LED红光联合胰岛素外用对糖尿病大鼠创面愈合的影响[J]. *医学研究杂志*, 2023,52(6):132-137.
- [30]李真真. 红光联合类人胶原蛋白敷料对CO₂点阵激光治疗术后色素沉着的改善作用[J]. *皮肤病与性病*, 2019,41(6):875-877.
- [31]Niu T, Tian Y, Ren Q, et al. Red light interferes in UVA-induced photoaging of human skin fibroblast cells [J]. *Photochem Photobiol*, 2014,90(6):1349-1358.
- [32]Wu S, Li H, Zhang X, et al. Optical features for chronological aging and photoaging skin by optical coherence tomography [J]. *Lasers Med Sci*, 2013,28(2):445-450.
- [33]Avila Rodriguez M I, Rodriguez Barroso L G, Sanchez M L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2018,17(1):20-26.

[收稿日期]2023-06-05

本文引用格式: 康紫薇, 陈琦, 申抒展, 等. 红光LED照射对自然老化SKH-1小鼠皮肤的影响[J]. *中国美容医学*, 2024,33(10):1-6.

· 论 著 ·

2-APB抑制静压力诱导髁突软骨细胞凋亡的作用及机制研究

古扎丽努尔·阿巴拜克力¹, 肖朋^{1,2}

(1.新疆医科大学第七附属医院口腔科 新疆 乌鲁木齐 830028; 2.新疆医科大学第二附属医院口腔科 新疆 乌鲁木齐 830063)

[摘要]目的: 探讨TRPM7抑制剂2-APB对静压力诱导的髁突软骨细胞凋亡抑制作用及其机制。方法: 通过胰蛋白酶消化法提取大鼠髁突软骨细胞, 施加不同条件静压力条件, 给予不同条件2-APB干预后, 以Flou-3AM荧光探针检测胞内钙离子浓度, 以流式细胞术检测细胞凋亡率, 以Western Blot检测p38蛋白表达, 以RT-PCR检测P38mRNA表达水平。进一步采用p38抑制剂进行干预处理, 分析细胞凋亡情况变化。**结果:** 不同压力条件下细胞内钙离子浓度与细胞凋亡率变化趋势高度一致, Pearson相关系数值为0.916 ($P < 0.01$), 有着显著的正相关关系。2-APB可明显抑制静压力诱导的胞内钙离子浓度增高 ($P < 0.01$); 2-APB与BAPTA-AM对胞内钙离子浓度抑制效果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。2-APB可明显抑制静压力诱导的细胞凋亡率升高及p38蛋白、mRNA高表达 ($P < 0.01$)。SB203580可明显抑制静压力诱导的细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)。**结论:** 2-APB对静压力诱导的髁突软骨细胞凋亡有抑制作用, 其机制可能与抑制TRPM7有关。静压力作用下TRPM7介导的钙离子增高是引发细胞凋亡损伤的途径, p38在其中发挥了重要作用, 抑制TRPM7介导的钙离子内流可能成为缓解压力诱导细胞损伤的途径。

[关键词] 静压力; 髁突软骨; TRPM7; p38通道; 细胞凋亡

[中图分类号]R782.6 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455 (2024) 10-0007-06

The Role and Mechanism of 2-APB Inhibits the Apoptosis of Condylar Chondrocytes Induced by Static Pressure

Guzhalinuer · ABABAIKELI¹, XIAO Peng^{1,2}

(1.Department of Stomatology, the Seventh Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830028, Xinjiang, China; 2.Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, Xinjiang, China)

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effect and mechanism of TRPM7 inhibitor 2-APB on static pressure induced by apoptosis of condylar chondrocytes. **Methods** The rat condylar chondrocytes were extracted through trypsin digestion method. Different static pressure conditions were administered. After the 2-APB intervention, intracellular calcium concentration was detected by Flou-3AM fluorescence probe. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression of p38 protein was detected by Western Blot, and the expression of p38mRNA was detected by RT-PCR. p38 inhibitor was further used to intervene and analyze the changes of cell apoptosis. **Results** Under different pressure conditions, the change trend of intracellular calcium concentration was highly consistent with that of cell apoptosis rate. The Pearson correlation value was 0.916 ($P < 0.01$), showing a significant positive correlation. 2-APB significantly inhibited the increase of intracellular calcium concentration induced by static pressure ($P < 0.01$). There was no significant difference between 2-APB and BAPTA-AM in inhibiting intracellular calcium concentration ($P > 0.05$). 2-APB could significantly inhibit the increase of cell apoptosis rate and the high expression of p38 protein and mRNA induced by static pressure ($P < 0.01$). SB203580 could significantly inhibit the increase of cell apoptosis rate induced by static pressure ($P < 0.01$). **Conclusion** The increase of calcium ion mediated by TRPM7 under static pressure is the way to cause cell apoptosis injury, and p38 plays an important role in it. Inhibiting TRPM7 mediated calcium ion influx may be a way to alleviate cell apoptosis induced by static pressure.

Key words: static pressure; condylar cartilage; trpm7; p38 channel; apoptosis

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金-医学联合基金项目 (编号: 2020D01C182)

通信作者: 肖朋, 主任医师、硕士研究生导师; 研究方向为颞下颌关节紊乱病的基础与临床。E-mail: kqxp2012@sina.cn

第一作者: 古扎丽努尔·阿巴拜克力, 主治医师; 研究方向为口腔医学。E-mail: guzalnur7@163.com

颞下颌关节紊乱病 (Temporomandibular disorders, TMD) 是口腔科的常见病, 其在青少年人群中发病率较高, 颞下颌关节髁突骨吸收不仅破坏了髁突正常形态, 而且妨碍髁突的生长发育, 导致下颌偏斜、小下颌畸形、前牙开殆等口颌面畸形, 严重影响患者的面容和身心健康^[1-4]。青少年颞下颌关节紊乱病引起髁突骨吸收的机制尚不明确, 部分学者认为髁突吸收与髁突受关节盘挤压关系密切^[5-6]。髁突软骨具有终身改建能力, 尤其在适当大小的力学刺激能促进髁突软骨细胞的增殖和生长, 但是过度持久的机械压力会直接损害关节软骨细胞的合成代谢等功能^[7-9]。前期研究发现一定压力可引起髁突软骨细胞的凋亡增加, p38通道抑制剂可明显抑制此现象, 但其中的机制没有阐明^[10]。

压力可激活瞬时电位受体 (Transient receptor potential, TRP) melastatin亚家族7 (TRPM7) 并诱导了细胞凋亡^[11]。TRPM7作为存在于细胞膜上的压力敏感通道, 可介导Ca²⁺内流, 内流的Ca²⁺激活p38通道诱导了细胞凋亡的发生^[12-14]。Ca²⁺是细胞最重要的第二信使之一, 对细胞的发生发展起着重要的调控作用。BAPTA-AM是研究Ca²⁺对细胞功能调节作用的标准工具药, BAPTA-AM进入细胞后在脂酶作用下释出BAPTA, 快速与Ca²⁺络合, 有效控制细胞内Ca²⁺水平^[15]。

p38 MAPK是MAPK家族中控制炎症反应最重要的成员之一, 可被生理性应激等因素激活, SB203580作为一种p38 MAPK特异性抑制剂, 可使其失去激酶活性^[16]。基于此, 本研究在前期研究的基础上, 引入TRPM7和p38信号通路, 探讨压力作用下髁突软骨细胞出现的凋亡等损伤的机制, 有助于阐释颞下颌关节紊乱病的病因与机制, 为临床预防、治疗青少年期髁突受压而导致的骨质破坏吸收提供理论支持。

1 资料和方法

1.1 实验动物: 健康的6周龄Sprague Dawley (SD) 青少年期大鼠, 雌雄不拘, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 生产许可证号: SYXK (新) 2017-001。

1.1.1 试剂: 胶原酶 (Worthington公司, 货号LS004174); FBS (Gibco公司, 货号2068801CP); Annexin V-FITC/PI试剂盒 (BD公司, 货号556547); Fluo-3 AM (Life Technologies公司, 货号F23915); 2-APB (Gene Operation公司, 货号ILL1031-0020MG); BAPTA-AM (MedChemExpress公司, 货号HY-100545); qPCR反应试剂盒 (Vazyme公司, 货号Q711-02); SB203580 (MECK公司, 货号S8307-1MG)。

1.1.2 仪器: 倒置拍照显微镜 (Leica公司, 型号DMI3000B); 流式细胞仪 (BD公司, 型号FACSVerse); 荧光显微镜 (Leica公司, 型号IX71); 酶标检测仪 (Molecular Devices公司, 型号SpectraMax i3); 电泳仪 (BIO-RAD公司, 型号mini protean 3 cell); 电转仪 (大连竞迈科

技公司, 型号PS-9); 一体式化学发光成像仪 (BIO-RAD公司; 型号ChemiDocXRS+); Real-time检测仪 (Roche公司, 型号LightCycler® 480II)。

1.2 方法

1.2.1 原代髁突软骨细胞的提取、培养及鉴定: 组织取材及细胞培养方法参考前期实验^[17], 取6周龄SD大鼠脱颈处死, 75%酒精消毒, 剖开关节取出髁突, PBS中去除干净表面杂质, 将组织剪碎成1 mm³以下, 加入0.25%胰酶, 37℃预消化1~2 h, 之后换成II型胶原酶, 4℃消化过夜。次日终止消化, 收集细胞悬液, 1 500 rpm离心5 min, 去上清, 留沉淀, 用完全培养基重悬接种。

1.2.2 细胞分组及处理

1.2.2.1 不同压力条件下细胞凋亡率及钙离子浓度: 按照不同加压条件分为0 kPa、8 kPa、16 kPa、32 kPa、64 kPa分别加压1 h, 选择32 kPa压力分别作用0 h、0.5 h、1 h、3 h。加压方式采用静水压力, 加压设备同前期实验设备^[10]。

1.2.2.2 TRPM7抑制剂2-APB对胞内钙离子的抑制作用: 分32 kPa、32 kPa+2-APB (20 μm) 和32 kPa+BAPTA-AM (10 μm) 组, 加压完毕后收集细胞检测胞内钙离子浓度。

1.2.2.3 TRPM7抑制剂2-APB对p38信号的激活作用和细胞凋亡率影响: 分0 kPa、32 kPa、2-APB (20 μm) 和32 kPa+2-APB (20 μm) 组, 对各组细胞加压后收集细胞分别检测p38蛋白、mRNA表达和各组细胞凋亡率。

1.2.2.4 p38抑制剂SB203580对细胞凋亡率的影响: 为了进一步证明静压力诱导的髁突软骨细胞凋亡与p38 MAPK信号通路有关, 根据培养基中加入SB203580的情况, 将髁突软骨细胞分成32 kPa和32 kPa+SB203580 (10 μm) 组, 检测两组细胞凋亡率。

1.2.2.5 Fluo-3AM荧光探针检测胞内钙离子水平: 细胞接种于6孔板中, 按1.2.2.3分组进行处理, 每孔加入Fluo-3 AM探针使其作用浓度为1 μmol/L, 37℃避光染色孵育1 h, PBS洗涤2次, 洗涤后37℃避光孵育30 min。用荧光显微镜观察拍照, 用酶标仪检测并读取荧光值。

1.2.2.6 Western Blot检测p38蛋白表达: 细胞接种于6孔板中, 给予相应处理后, 用预冷的PBS轻洗, 加入含蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA裂解液裂解细胞提取各组总蛋白, 蛋白定量分装后经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 采用湿法转膜1 h, 5%BSA室温封闭1 h, 加入相应的一抗 (p-p38、p38), 4℃孵育过夜。次日, TBST洗涤后加入二抗, 37℃孵育1 h, 避光加入ECL化学发光液, 采用Bio-Rad蛋白质谱成像系统采集图像, Image Lab 4.0软件分析蛋白条带灰度值。

1.2.2.7 RT-PCR检测p38基因表达: 收获对数生长期的细胞, 按TRIZOL实际说明书提取总RNA, 经紫外分光光度计定量RNA浓度和纯度, 逆转录合成cDNA, RT反应条件37℃ 5 min, 42℃ 60 min, 70℃ 10 min。将反应体系置PCR扩增仪上94℃预变性10 min, 然后开始PCR循环: 94℃ 20 s,

60℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共40个循环。

表1 引物序列表

名称	引物序列
p38上游引物	5' -GGCTCGGCACACTGATGAT-3'
p38下游引物	5' -TGGGGTTCCAACGAGTCTTAAA-3'
内参β-actin上游引物	5' -GGGTGTATTCCTCCATCG-3'
内参β-actin下游引物	5' -CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

1.2.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡率: 各组细胞处理后, 用不含EDTA的胰酶消化, 1 500 rpm离心5 min收集细胞。4℃预冷PBS洗涤细胞, 加入300 μl的1×Binding Buffer悬浮细胞, 加入10 μl的Annexin V-FITC和5 μl的PI染色混匀后, 避光, 室温孵育15 min, 用PBS将每管液体量补至1 ml后流式细胞分选仪下检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学分析: 采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析处理, 实验数据采用($\bar{x} \pm s$)记录, 多组内总体比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用SNK法; 两组间比较采用 t 检验; 不同压力条件下胞内钙离子浓度与细胞凋亡率关系

采用Pearson相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

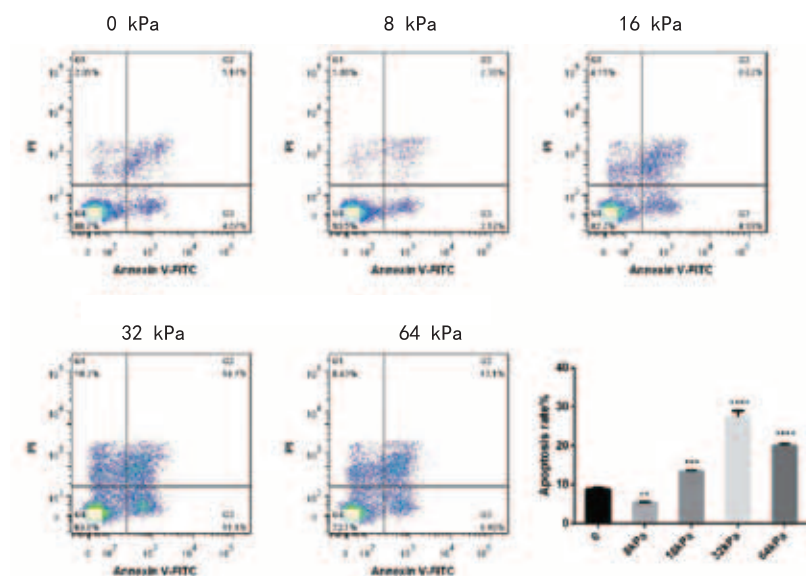
2.1 压力诱导细胞凋亡及胞内钙离子浓度升高条件的确定: 流式细胞术结果和胞内钙离子检测结果显示, 不同压力值加压1 h细胞凋亡率变化(0 kPa/1 h、8 kPa/1 h、16 kPa/1 h、32 kPa/1 h、64 kPa/1 h), 压力值为32 kPa, 不同时间点细胞凋亡率变化(32 kPa/0 h、32 kPa/0.5 h、32 kPa/1 h、32 kPa/3 h), 细胞凋亡率(见图1~2)和胞内钙离子(见图3~4)浓度变化趋势高度一致; 在同一加压时间下, 细胞凋亡率和胞内钙离子浓度随压力增加呈现出先降低后升高再降低的趋势; 在同一压力值条件下, 细胞凋亡率和胞内钙离子浓度呈现随时间延长而升高的趋势; 在多种压力条件下, 细胞凋亡率和胞内钙离子浓度两者Pearson相关系数值为0.916($P < 0.01$), 即不同压力条件下细胞凋亡率与胞内钙离子浓度之间有着显著的正相关关系。在压力条件为32 kPa/1 h下细胞出现明显凋亡且稳定, 故选择32 kPa/1 h压力条件用于后续实验。

2.2 TRPM7抑制剂2-APB对压力诱导的胞内钙离子浓度、细胞凋亡和p38蛋白、mRNA表达的影响

2.2.1 免疫荧光结果: 32 kPa组钙离子数量较密集, 其余两组数量稀疏, 钙离子浓度明显低于32 kPa组; 32 kPa+2-APB(20 μm)组可明显抑制胞内钙离子浓度和细胞凋亡率($P < 0.05$); 与32 kPa+BAPTA-AM(10 μm)相比, 32 kPa+2-APB(20 μm)组胞内钙离子浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图5。

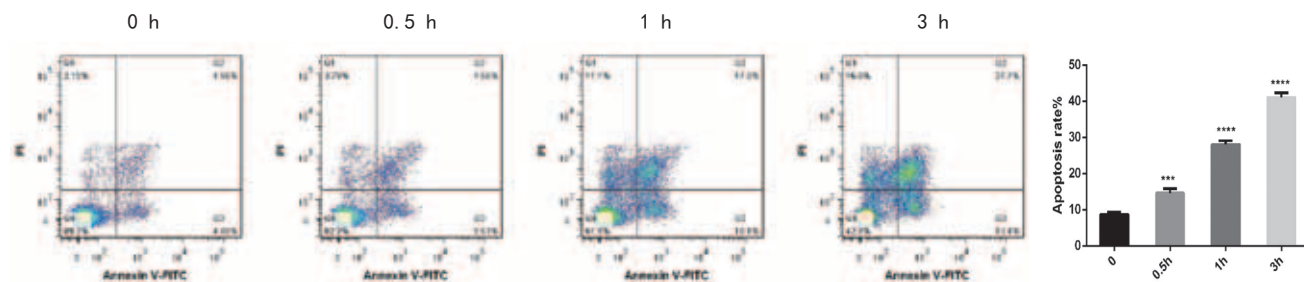
2.2.2 流式细胞分选仪结果显示: 与32 kPa组相比, 32 kPa+2-APB(20 μm)组可明显抑制细胞凋亡率($P < 0.001$); 与32 kPa+2-APB(20 μm)组相比, 2-APB(20 μm)组可明显抑制细胞凋亡率($P < 0.001$)。见图6。

2.2.3 Western Blot和RT-PCR: 结果显



注: **表示与0 kPa组相比, $P < 0.01$; ***表示与0 kPa组相比, $P < 0.005$; ****表示与0 kPa组相比, $P < 0.001$

图1 不同压力值加压1 h细胞凋亡率变化



注: **表示与0 kPa组相比, $P < 0.01$; ***表示与0 kPa组相比, $P < 0.005$; ****表示与0 kPa组相比, $P < 0.001$

图2 压力值为32 kPa时不同时间点细胞凋亡率变化

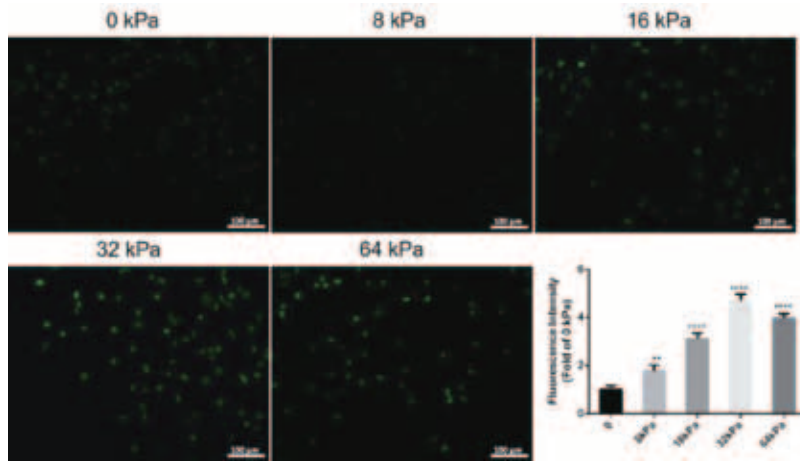
示,与32 kPa组相比,32 kPa+2-APB (20 μ m) 组可明显抑制32 kPa/1 h压力条件下p38蛋白、mRNA表达水平 ($P<0.001$)。与32 kPa+2-APB (20 μ m) 组对比,

2-APB (20 μ m) 组明显抑制p38的蛋白、mRNA的表达增高 ($P<0.05$)。相反,2-APB (20 μ m) 组、32 kPa组p38的蛋白、mRNA的表达增高。见图7~8。

2.3 p38抑制剂SB203580对压力诱导的细胞凋亡的影响:流式细胞分选仪结果显示,与32 kPa组比较,32 kPa+SB203580 (10 μ m) 可明显抑制32 kPa/1 h压力条件诱导的细胞凋亡率 ($P<0.05$),结果表明p38 MAPK抑制剂SB203580 部分逆转了静压力诱导的髌突软骨细胞凋亡作用。见图9。

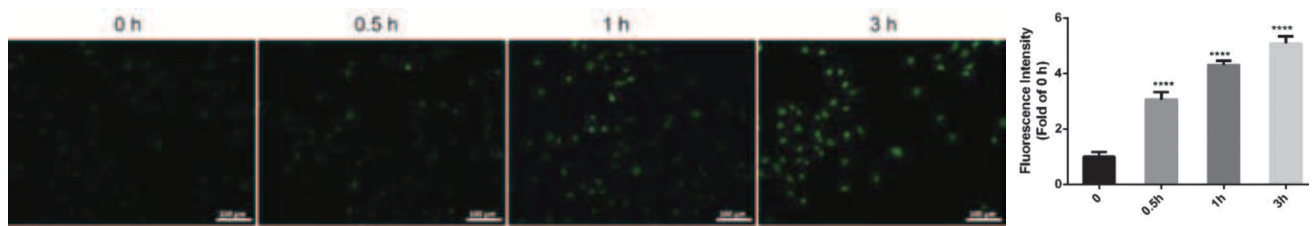
3 讨论

颞下颌关节紊乱病是一种能够累及整个颞下颌关节组织,导致患者口颌功能障碍及严重疼痛的慢性退行性疾病,其病因与机制复杂,至今尚未有明确的定论,其中咬合紊乱因素和精神心理因素为两个重要危险因素^[1]。在行使咀嚼等功能时,异



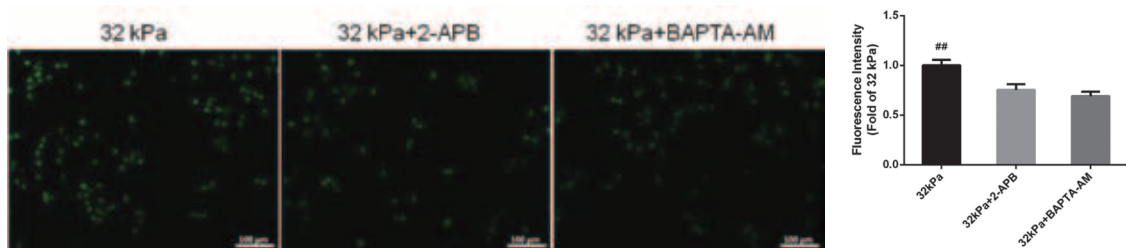
注: **表示与0 kPa组相比, $P<0.01$; ****表示与0 kPa组相比, $P<0.001$

图3 激光共聚焦显微镜不同压力值加压1 h胞内钙离子浓度变化 (200 \times)



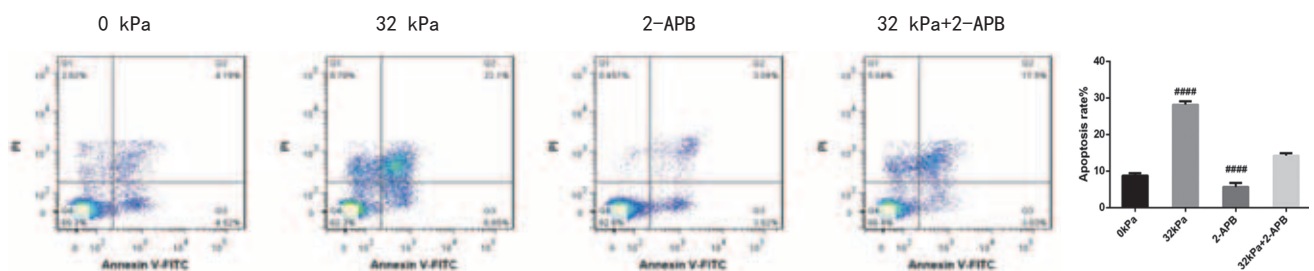
注: ****表示与0 kPa组相比, $P<0.001$

图4 激光共聚焦显微镜下压力值为32 kPa时不同时间点胞内钙离子浓度变化



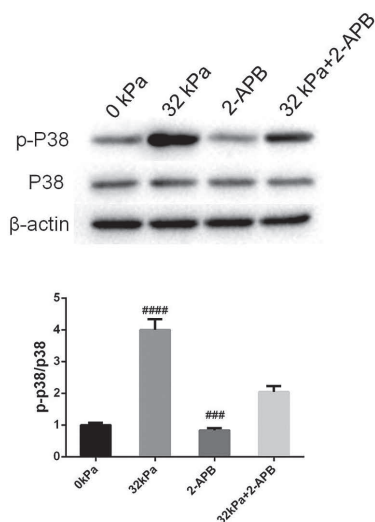
注: 激光共聚焦显微镜下图片 (200 \times); **表示与32 kPa+2-APB组相比, $P<0.01$

图5 32 kPa/1 h压力条件下施加2-APB (20 μ m) 和BAPTA-AM (10 μ m) 干预后胞内钙浓度变化



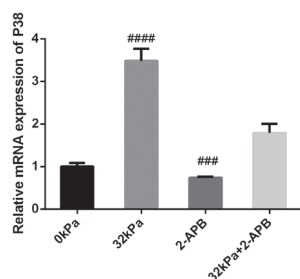
注: ****表示与32 kPa+2-APB (20 μ m) 组相比, $P<0.001$

图6 不同实验条件下的细胞凋亡率水平



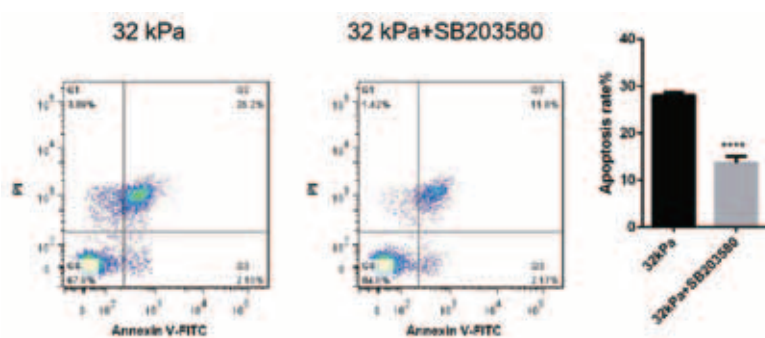
注: ###表示与32 kPa+2-APB (20 μm) 组相比, $P < 0.005$; ####表示与32 kPa+2-APB (20 μm) 组相比, $P < 0.001$

图7 不同实验条件下p38蛋白表达水平



注: ###表示与32 kPa+2-APB (20 μm) 组相比, $P < 0.005$; ####表示与32 kPa+2-APB (20 μm) 组相比, $P < 0.001$

图8 不同实验条件下p38mRNA表达水平



注: ****表示与32 kPa组相比, $P < 0.001$

图9 SB203580 (10 μm) 对压力诱导的细胞凋亡率的影响

常的咬合关系导致的关节异常受力可能是诱发颞下颌关节紊乱病的重要原因。单侧咬合接触等咬合紊乱情况下出现的髁突表面应力改变^[18]。患者紧咬牙情况下, 颞肌、咬肌等升颌肌群发生等长收缩, 产生肌力更大, 对髁突则形成持续长时间应力, 增加髁突受压^[19-20], 以上两者可能是造成TMD的病因之一。本实验中通过机械刺激建立动物模

型, 采取的压力方式为静压力, 对紧咬牙情况所致的颞下颌关节改变具有更好的指导意义。

压力可引起细胞凋亡的现象已被众多学者证实, 并在医学不同学科领域有不同程度的应用研究, 但压力在颞下颌关节疾病中的致病机制尚未完全阐明。前期的实验初证实了TRPM7和p38通道在压力诱导的髁突软骨细胞凋亡中发挥了作用^[10-11]。TRPM7作为通道激酶之一, 常表达于哺乳动物细胞中, 其对细胞迁移, 细胞增殖等细胞活动中发挥着一定的调控作用^[21-23], TRPM7作为压力敏感通道并可介导 Ca^{2+} 内流, 从而在炎症控制中发挥着重要作用。

本实验结果证实胞内 Ca^{2+} 信号随压力条件变化呈现一定规律性变化, 同时细胞凋亡率亦随着压力条件变化而变化, 胞内 Ca^{2+} 信号变化曲线与细胞凋亡率曲线形态极相似, 呈明显正相关, 更加支持了胞内 Ca^{2+} 信号介导了细胞凋亡发生的可能, 但其中的作用机制需要进一步探讨。有学者报道药物可通过 Ca^{2+} /CaMK II 信号改变心肌细胞的凋亡损伤现象^[24], 推测本实验中压力可能也通过 Ca^{2+} /CaMK II 信号方式诱导了细胞凋亡, 可通过后续研究来进一步证实。本实验施加TRPM7抑制剂2-APB干预后, 胞内 Ca^{2+} 浓度明显下降, 推测一定浓度的TRPM7抑制剂2-APB可明显抑制压力介导的细胞凋亡率升高, 但未能完全阻断压力介导的细胞凋亡。由此可见TRPM7在压力介导的细胞凋亡中发挥了重要作用, 但并非唯一途径; 本实验进一步施加了选择性胞内 Ca^{2+} 螯合剂BAPTA-AM来清除胞内 Ca^{2+} , 发现2-APB抑制效果与BAPTA-AM效果差异无统计学意义。此现象说明压力介导 Ca^{2+} 内流主要通过了TRPM7通道。

p38 MAPK信号通路作为MAPK家族中的重要组成部分, 在炎症、细胞应激、细胞周期等多种生理病理过程中具有重要作用^[25]。学者Liu S^[26]报道, 内流的 Ca^{2+} 导致了p38磷酸化, 即激活了p38通道。部分学者报道p38被激活后, 可介导炎症和细胞凋亡等引发一系列临床问题^[27-28]。本实验通过抑制TRPM7即抑制了 Ca^{2+} 内流同样抑制了压力对p38的激活作用, 说明压力通过TRPM7内流的 Ca^{2+} 确实可激活p38, 但实验结果显示一定浓度的2-APB未能完全抑制压力介导的p38活化, 推测压力介导p38活化可能存在其他途径或抑制剂浓度偏低所致。前期实验^[7]证实不同压力作用引起了FAS蛋白的不同表达, p38抑制剂可抑制压力介导的FAS过表达, 进一步说明FAS作为一个重要的细胞凋亡途径, 参与了压力诱导的细胞凋亡, 且此过程中有p38通道参与并发挥了重要作用。由于细胞凋亡的途径有许多种, 在静压力诱导的细胞凋亡中是否存在其他途径尚需进一步证实。笔者通过近年来的临床观察, 发现临床中部分不可复性关节盘前移位患者1~3个月内出现明显的髁突骨质破坏吸收和不同程度炎性疼痛, 其机制可能是髁突受到移位关节盘挤压, 压力经TRPM7激活了p38通道, 而

抑制压力介导的FAS过表达, 进一步说明FAS作为一个重要的细胞凋亡途径, 参与了压力诱导的细胞凋亡, 且此过程中有p38通道参与并发挥了重要作用。由于细胞凋亡的途径有许多种, 在静压力诱导的细胞凋亡中是否存在其他途径尚需进一步证实。笔者通过近年来的临床观察, 发现临床中部分不可复性关节盘前移位患者1~3个月内出现明显的髁突骨质破坏吸收和不同程度炎性疼痛, 其机制可能是髁突受到移位关节盘挤压, 压力经TRPM7激活了p38通道, 而

p38进一步介导了局部炎症和细胞凋亡,提示抑制p38信号通路可减少组织的炎症反应,是否存在上述推测,需要进一步研究证实。

综上所述,本实验证实了抑制TRPM7明显降低静压力诱导的髌突软骨细胞凋亡,其中的机制可能为抑制了经TRPM7内流的 Ca^{2+} ,进一步抑制了p38信号通道。抑制TRPM7介导的 Ca^{2+} 内流,可能成为缓解压力诱导细胞损伤的途径。由此可见,深入研究TRPM7及p38信号通路在髌突软骨细胞改建中的作用机制具有重要的临床意义,将为修复软骨缺损维持组织完整性提供新的思路和治疗靶点

[参考文献]

- [1]马绪臣,张震康.颞下颌关节紊乱病的命名、诊断分类及治疗原则[J].中华口腔医学杂志,2002,37(4):241-243.
- [2]Zhao Y P, Zhang Z Y, Wu Y T, et al. Investigation of the clinical and radiographic features of osteoarthritis of the temporomandibular joints in adolescents and young adults[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011,111(2):e27-34.
- [3]Krisjane Z, Urtane I, Krumina G, et al. The prevalence of TMJ osteoarthritis in asymptomatic patients with dentofacial deformities: a cone-beam CT study[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2012,41(6):690-695.
- [4]Manfredini D, Segu M, Arveda N, et al. Temporomandibular joint disorders in patients with different facial morphology. A systematic review of literature[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2016,74(1):29-46.
- [5]Lee L M, Zhang D D, Zhu Y M, et al. Outcomes of treatment with genioplasty and temporomandibular joint anchorage surgery[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2021,49(3):177-183.
- [6]Feng S Y, Lei J, Chen H M, et al. Increased chemokine RANTES in synovial fluid and its role in early-stage degenerative temporomandibular joint disease[J]. J Oral Rehabil, 2020,47(9):1150-1160.
- [7]徐高丽,肖芳,霍光.颞下颌关节盘移位后关节的适应性改建[J].口腔颌面外科杂志,2016,26(1):61-64.
- [8]Li B, Guan G, Mei L, et al. Pathological mechanism of chondrocytes and the surrounding environment during osteoarthritis of temporomandibular joint[J]. J Cell Mol Med, 2021,25(11):4902-4911.
- [9]Fang L, Ye Y, Tan X, et al. Overloading stress-induced progressive degeneration and self-repair in condylar cartilage[J]. Ann N Y Acad Sci, 2021,1503(1):72-87.
- [10]马绿渊,肖朋,陈秋秋.体外静水压力作用下SB203580对大鼠髌突软骨细胞FAS蛋白和细胞凋亡率的影响[J].新疆医科大学学报,2017,40(8):1057-1060.
- [11]陈秋秋,刘海霞,肖朋.不同静水压力对大鼠髌突软骨细胞的TRPM7和Fas蛋白表达的影响[J].中国美容医学,2017,26(7):44-47.
- [12]Colston J T, Chandrasekar B, Freeman G L. A novel peroxide-induced calcium transient regulates interleukin-6 expression in cardiac-derived fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2002,277(26):23477-83.
- [13]Song S, Yamamura A, Yamamura H, et al. Flow shear stress enhances intracellular Ca^{2+} signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014,307(4):C373-383.
- [14]Lee W, Nims R J, Savadipour A, et al. Inflammatory signaling sensitizes Piezo1 mechanotransduction in articular chondrocytes as a pathogenic feed-forward mechanism in osteoarthritis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021,118(13):e2001611118.
- [15]Williams J A, Hou Y, Ni H M, et al. Role of intracellular calcium in proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress, autophagy, and cell death[J]. Pharm Res, 2013,30(9):2279-2289.
- [16]Bai J, Bai Y, Wang X P, et al. Carbon monoxide-releasing molecule-3 ameliorates acute lung injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation: roles of p38MAPK signaling pathway[J]. Shock, 2020,55(6):816-26.
- [17]陈秋秋,肖朋,刘海霞,等.大鼠髌突软骨细胞培养及生物学特性研究[J].中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(2):128-131.
- [18]陈新,刘洪臣,王延荣.单侧咬合接触对颞颌关节髌突应力分布的影响[J].医学临床研究,2010,27(5):775-777.
- [19]黄泽伦,薛智谦,顾瑜.低年级大学生颞下颌关节紊乱病咬合异常因素的logistic回归分析[J].口腔疾病防治,2021,29(1):45-49.
- [20]May B M, Garabadian C. Reducing condylar compression in clenching patients[J]. Crit Rev Biomed Eng, 2000,28(3-4):389-394.
- [21]Inoue K, Xiong Z G, Ueki T. The TRPM7 channel in the nervous and cardiovascular systems[J]. Curr Protein Pept Sci, 2020,21(10):985-992.
- [22]Liang H Y, Chen Y, Wei X, et al. Immunomodulatory functions of TRPM7 and its implications in autoimmune diseases [J]. Immunology, 2022,165(1):3-21.
- [23]Hu F, Li M, Han F, et al. Role of TRPM7 in cardiac fibrosis: A potential therapeutic target (Review) [J]. Exp Ther Med, 2021,21(2):173.
- [24]张光琼,王声全,付凌云,等.环维黄杨星D调控 Ca^{2+} /CaMKII信号改善醛固酮诱导心肌细胞损伤的实验研究[J].中国药理学通报,2021,37(4):564-570.
- [25]Bai J, Bai Y, Wang X P, et al. Carbon monoxide-releasing molecule-3 ameliorates acute lung injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation: roles of p38MAPK signaling pathway [J]. Shock, 2020,55(6):816-826.
- [26]Liu S, Xu X, Fang Z, et al. Piezo1 impairs hepatocellular tumor growth via deregulation of the MAPK-mediated YAP signaling pathway[J]. Cell Calcium, 2021,95:102367.
- [27]Shen L, Yang Q, He Y, et al. BmK NT1-induced neurotoxicity is mediated by PKC/CaMKII-dependent ERK1/2 and p38 activation in primary cultured cerebellar granule cells[J]. Toxicology, 2019,421:22-29.
- [28]Liu Z, Huang Y, Liu L, et al. Inhibitions of PKC and CaMK-II synergistically rescue ischemia-induced astrocytic dysfunction[J]. Neurosci Lett, 2017,657:199-203.

[收稿日期]2023-04-10

本文引用格式:古扎丽努尔·阿巴拜克力,肖朋.2-APB抑制静压力诱导髌突软骨细胞凋亡的作用及机制研究[J].中国美容医学,2024,33(10):7-12.

·论著·

黄柏碱调节MCP-1/CCR2信号通路对特应性皮炎大鼠炎症反应的影响

于现朝¹, 寇旺², 杨洋³

(1.解放军总医院京北医疗区北苑门诊部 北京 100012; 2.解放军总医院第六医学中心药剂科 北京 100037; 3.解放军总医院第六医学中心皮肤科 北京 100037)

[摘要]目的: 探讨黄柏碱对特应性皮炎(Atopic dermatitis, AD)大鼠炎症反应的影响及其作用机制。方法: 构建AD大鼠模型, 大鼠分为正常组、模型组、黄柏碱低剂量组、黄柏碱高剂量组、黄柏碱+巨噬细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)组; 给药结束后, 各组大鼠做皮损评分, 记录搔抓次数, HE染色观察皮肤组织病理变化, 甲苯胺蓝染色测定肥大细胞数, ELISA试剂盒测定皮肤组织活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和血清免疫球蛋白(IgE)、白介素-17(Interleukin, IL-17)、IL-6的含量, Western blot检测皮肤组织MCP-1、CC类趋化因子受体2(CC chemokine receptor 2, CCR2)蛋白表达。结果: 与正常组相比, 模型组大鼠脱毛处皮肤发生溃疡、红斑, 表皮和棘层增厚且有大量炎性细胞浸润, 搔抓次数、肥大细胞数、ROS、IgE、IL-17、IL-6及MCP-1、CCR2蛋白表达水平增加($P < 0.05$); 与模型组相比, 黄柏碱低、高剂量组皮肤组织红斑、溃疡情况、炎性细胞浸润减少, 未见脱屑, 搔抓次数、肥大细胞数、ROS、IgE、IL-17、IL-6及MCP-1、CCR2蛋白表达水平依次降低($P < 0.05$); 与黄柏碱高剂量组相比, 黄柏碱+MCP-1组皮肤红斑、溃疡和炎性细胞浸润加重, 搔抓次数、肥大细胞数、ROS、IgE、IL-17、IL-6及MCP-1、CCR2蛋白表达水平增加($P < 0.05$)。结论: 黄柏碱可能通过抑制MCP-1/CCR2信号通路降低AD大鼠炎症反应。

[关键词]特应性皮炎; 炎症反应; 黄柏碱; MCP-1/CCR2信号通路; 巨噬细胞趋化蛋白-1

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2024)10-0013-05

Effect of Phellodendrine on Inflammatory Response in Rats with Atopic Dermatitis by Regulating MCP-1/CCR2 Signaling Pathway

YU Xianchao¹, KOU Wang², YANG Yang³

(1.Department of Beiyuan Outpatient, People's Liberation Army General Hospital, Jingbei Medical District, Beijing 100012, China; 2.Department of Pharmacy, the Sixth Medical Center of the General Hospital, Beijing 100037, China; 3.Department of Dermatology, the Sixth Medical Center of the General Hospital, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Phellodendrine on inflammatory response in rats with atopic dermatitis (AD) and its mechanism. **Methods** AD rat model was established. The rats were separated into normal group, model group, low-dose Phellodendrine group, high-dose Phellodendrine group, Phellodendrine+macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) group. After the end of administration, the rats in each group were scored for skin lesions, and the number of scratches was recorded, HE staining was applied to observe pathological changes in skin tissue, Toluidine blue staining was applied to determine the number of Mast cells, ELISA kits were applied to measure the content of reactive oxygen species (ROS) in skin tissue and serum immunoglobulin (IgE), interleukin-17 (IL-17) and IL-6, and Western blot was applied to detect the expression of MCP-1 and CC Chemokine receptor 2 (CCR2) proteins in skin tissue. **Results** Compared with the normal group, the depilated skin of the model group developed ulcers, erythema, thickening of the epidermis and spinous layer, and a large number of inflammatory cell infiltration, the scratching times, the number of Mast cells, ROS, IgE, IL-17, IL-6, the protein expression levels of MCP-1 and CCR2 were increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the erythema, ulcer and inflammatory cell infiltration of skin tissue in the low and high dose Phellodendrine groups were reduced, and no desquamation was found, the scratching times, the number of Mast cells, ROS, IgE, IL-17, IL-6, the protein expression levels of MCP-1 and CCR2 were decreased in turn ($P < 0.05$). Compared with the high dose Phellodendrine group, the skin erythema, ulcer and inflammatory cell infiltration in the Phellodendrine+MCP-1 group were aggravated, the scratching times, the number of Mast cells, ROS, IgE, IL-17, IL-6, the protein

expression levels of MCP-1 and CCR2 were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Phellodendrine may reduce the inflammatory response in AD rats by inhibiting MCP-1/CCR2 signaling pathway.

Key words: atopic dermatitis; inflammatory response; phellodendrine; MCP-1/CCR2 signaling pathway; macrophage chemoattractant protein-1

特应性皮炎(AD)是一种慢性非传染性炎症性皮肤病,特点是持续的皮肤瘙痒,且长期复发,极大地降低了患者及其家人的生活质量。AD的病理生理学是复杂的、多因素的,它包括遗传疾病、表皮屏障缺陷、免疫反应改变以及皮肤微生物平衡破坏等^[1]。治疗AD除了日常清洁外,局部使用皮质类固醇是其一线治疗方法,也可联合吡美莫司和他克莫司使用,中重度AD使用紫外线光疗,抗葡萄球菌抗生素是治疗继发性皮肤感染的有效药物,但对炎症的改善作用不一,且成本过高^[2]。黄柏碱来源于芸香科植物黄柏的树皮和茎皮,网络药理学和实验已经证实,黄柏碱具有多靶点和多途径抑制炎症的作用,可能是一种潜在的治疗炎症相关疾病的有效药物^[3]。研究发现,人巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及其受体CC类趋化因子受体2(CCR2)在过敏性皮炎中高表达,缺乏CCR2的皮肤病小鼠的炎症因子显著降低^[4]。黄柏碱能否通过调节MCP-1/CCR2信号改善AD炎症反应尚不清楚。本研究将探索黄柏碱对AD大鼠及MCP-1/CCR2信号的影响,为AD的临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

1.1.1 实验动物:8周龄SD雄性大鼠,购自上海泰楚生物技术有限公司[SCXK(沪)-2023-0001],动物饲养环境为清洁安静、通风良好的SPF级动物房。

1.1.2 试剂、仪器:黄柏碱(纯度 $\geq 98\%$,DH0031),购自德思特生物;二硝基氯苯(DNCB,97-00-7),购自西亚试剂;活性氧(ROS)检测试剂盒(S0033S),购自碧云天生物;免疫球蛋白(IgE,m1003022)、白介素-17(IL-17,m1003003)、IL-6(m1064292)ELISA试剂盒,购自上海酶联生物;一抗MCP-1(ab7202)、CCR2(ab223366),购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 动物造模、分组:造模前1 d剪去大鼠背部毛发,使用脱毛膏在此区域(2 cm \times 2 cm)脱毛;造模当天,将2% DNCB溶液(丙酮:橄榄油=1:4)涂抹于背部皮肤(300 μ l)进行首次致敏;造模第3、5、7、9、11天,于背部脱毛处涂抹DNCB进行激发,每天1次。大鼠皮肤出现红斑、水肿、出血,表皮脱落、结痂、鳞屑等症状时,表示AD大鼠模型构建成功^[5]。

大鼠随机分为正常组、模型组、黄柏碱低剂量组、黄柏碱高剂量组、黄柏碱+MCP-1组,每组12只。除正常组外,所有大鼠构建AD模型;正常组仅作脱毛处理,使用溶剂(丙酮:橄榄油=1:4)进行涂抹,操作同造模组。确认建模成功后,将黄柏碱溶于生理盐水,黄柏碱低、高剂量

组大鼠分别皮下注射2.1 mg/kg/d、10 mg/kg/d黄柏碱-生理盐水溶液^[6];黄柏碱+MCP-1组大鼠皮下注射10 mg/kg/d黄柏碱-生理盐水溶液+2 μ g MCP-1重组蛋白;正常组和模型组皮下注射等量生理盐水。给药持续14 d。

1.2.2 皮损评分:给药期结束后,参照SCORAD评分标准^[7],对各组大鼠皮肤脱屑/干燥、水肿/肥厚/苔藓样变、红斑/出血、抓痕/溃疡方面做分值评价:0分,无;1分,轻度;2分,中度;3分,重度;4分,极重度。

1.2.3 记录搔抓次数:使用DNCB激发大鼠后,将大鼠单独放置于安静环境,统计5 min内大鼠搔抓/舔舐身体的次数。

1.2.4 观察脱毛处皮肤病理变化:每组取6只大鼠,吸入乙醚麻醉后,腹主动脉取血5 ml,离心后取上层血清,分装储存待测;采集背部及右耳脱毛处皮肤,放入4%多聚甲醛中固定,制作石蜡切片;切片经二甲苯梯度脱蜡,乙醇梯度脱水,HE染液染色,再次脱水,二甲苯透明,封片。光镜下观察皮肤病理形态变化。

1.2.5 测定肥大细胞数量:将1.2.4石蜡切片脱蜡至水,进行甲苯胺蓝染色,光镜下肥大细胞颗粒为深蓝紫色,随机选择5个视野,计数视野下肥大细胞的数目,取平均值。

1.2.6 测定皮肤组织ROS和血清IgE、IL-17、IL-6的含量:将每组剩余6只大鼠麻醉后处死,采集背部脱毛处皮肤组织,剪碎,加入组织裂解液,匀浆后分装储存;取一份皮肤组织匀浆液,离心后取上清,使用试剂盒检测上清中ROS的含量;取1.2.4血清样本,使用ELISA试剂盒按操作要求检测IgE、IL-17、IL-6的含量

1.2.7 检测MCP-1、CCR2蛋白表达水平:取1.2.6皮肤组织匀浆液,使用Western blot法检测MCP-1、CCR2蛋白表达水平。定量匀浆液蛋白浓度,在SDS-PAGE凝胶中点样,电泳,转膜,封闭PVDF膜,剪切目的蛋白条带并置于MCP-1、CCR2抗体稀释液中过夜,常温下使用二抗孵育目的条带1 h,滴加200 μ l发光液,分析蛋白表达水平。

1.3 统计学分析:所有数据符合正态分布并以平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,使用GraphPad Prism 8.0.2分析,多组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠皮损评分比较:正常组大鼠皮肤粉嫩,色泽均一;模型组大鼠背部发生明显红斑,抓痕较多,表皮溃疡、剥脱;黄柏碱低、高剂量组较模型组红斑、皮肤溃疡情况减少,未见脱屑;黄柏碱+MCP-1组皮损情况严重,与模型组类似。见图1。与正常组相比,模型组大鼠皮损评分

升高 ($P<0.05$)；与模型组相比，黄柏碱低、高剂量组皮损评分呈剂量依赖性降低 ($P<0.05$)；与黄柏碱高剂量组相比，黄柏碱+MCP-1组皮损评分升高 ($P<0.05$)。见表1。

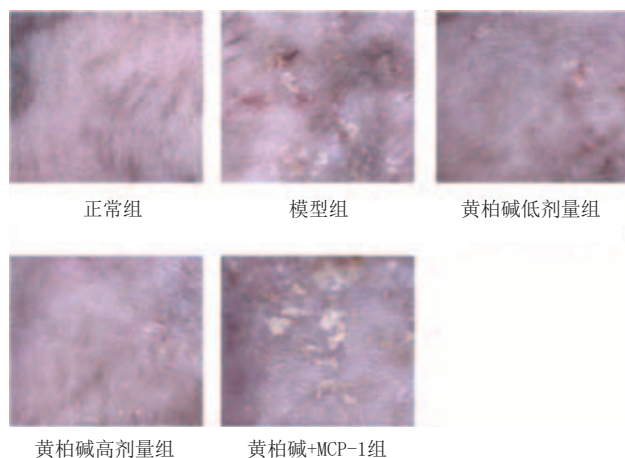


图1 各组大鼠皮损情况

表1 各组大鼠皮损评分比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	皮损评分/分
正常组	0.00±0.00
模型组	10.91±1.06*
黄柏碱低剂量组	7.92±0.84 [#]
黄柏碱高剂量组	4.83±0.50 [#]
黄柏碱+MCP-1组	9.08±0.95 [△]
F值	367.986
P值	<0.001

注：*表示与正常组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与模型组比较， $P<0.05$ ；[△]表示与黄柏碱低剂量组比较， $P<0.05$ ；[△]表示与黄柏碱高剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠搔抓次数比较：与正常组相比，模型组大鼠搔抓次数增加 ($P<0.05$)；与模型组相比，黄柏碱低、高剂量组搔抓次数呈剂量依赖性减少 ($P<0.05$)；与黄柏碱高剂量组相比，黄柏碱+MCP-1组搔抓次数增加 ($P<0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠搔抓次数比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	搔抓次数/次
正常组	1.67±0.23
模型组	9.75±0.96*
黄柏碱低剂量组	6.75±0.75 [#]
黄柏碱高剂量组	3.92±0.40 [#]
黄柏碱+MCP-1组	8.08±0.91 [△]
F值	249.619
P值	<0.001

注：*表示与正常组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与模型组比较， $P<0.05$ ；[△]表示与黄柏碱低剂量组比较， $P<0.05$ ；[△]表示与黄柏碱高剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠皮肤病理形态变化：正常组皮肤组织结构正

常，无明显病理异常改变；模型组表皮和棘层增厚、过度角化，皮肤溃疡且有大量炎性细胞浸润；黄柏碱低、高剂量组较模型组表皮和棘层增厚逐渐减轻，溃疡和炎性细胞浸润逐渐减少；黄柏碱+MCP-1组表皮角化，皮肤溃疡，大量炎性细胞浸润。见图2。

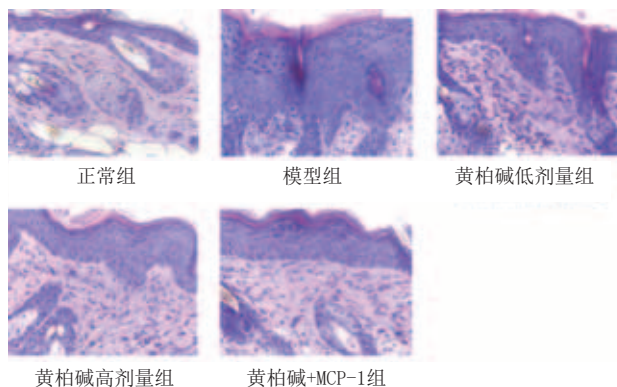


图2 各组大鼠背部皮肤组织HE染色结果 (100×)

2.4 各组大鼠皮肤组织肥大细胞数量比较：与正常组相比，模型组肥大细胞数量增加 ($P<0.05$)；与模型组相比，黄柏碱低、高剂量组肥大细胞数量呈剂量依赖性减少 ($P<0.05$)；与黄柏碱高剂量组相比，黄柏碱+MCP-1组肥大细胞数量增加 ($P<0.05$)。见图3、表3。

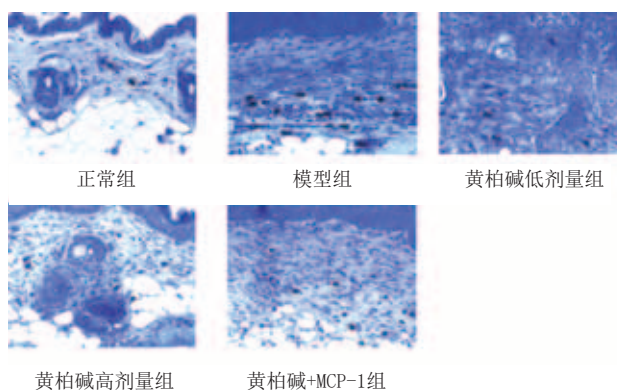


图3 各组大鼠背部皮肤组织肥大细胞甲苯胺蓝染色结果 (100×)

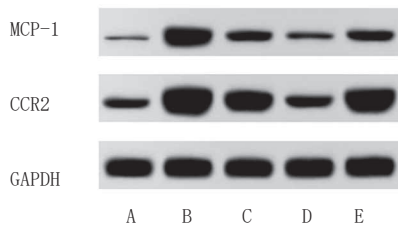
表3 各组大鼠肥大细胞数量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	肥大细胞计数/个	
	背部	耳部
正常组	2.00±0.31	2.53±0.27
模型组	17.43±1.86*	24.23±2.54*
黄柏碱低剂量组	10.97±1.16 [#]	17.90±2.05 [#]
黄柏碱高剂量组	5.67±0.52 [#]	6.10±0.55 [#]
黄柏碱+MCP-1组	15.07±1.41 [△]	20.07±2.14 [△]
F值	172.148	168.431
P值	<0.001	<0.001

注：*表示与正常组比较， $P<0.05$ ；[#]表示与模型组比较， $P<0.05$ ；[△]表示与黄柏碱低剂量组比较， $P<0.05$ ；[△]表示与黄柏碱高剂量组比较， $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠皮肤组织ROS和血清IgE、IL-17、IL-6的含量比较:与正常组相比,模型组皮肤组织ROS和血清IgE、IL-17、IL-6的含量升高($P<0.05$);与模型组相比,黄柏碱低、高剂量组皮肤组织ROS和血清IgE、IL-17、IL-6的含量呈剂量依赖性下降($P<0.05$);与黄柏碱高剂量组相比,黄柏碱+MCP-1组皮肤组织ROS和血清IgE、IL-17、IL-6的含量升高($P<0.05$)。见表4。

2.6 各组大鼠皮肤组织MCP-1、CCR2蛋白表达水平比较:与正常组相比,模型组MCP-1、CCR2蛋白表达水平升高($P<0.05$);与模型组相比,黄柏碱低、高剂量组MCP-1、CCR2蛋白表达水平呈剂量依赖性降低($P<0.05$);与黄柏碱高剂量组相比,黄柏碱+MCP-1组MCP-1、CCR2蛋白表达水平升高($P<0.05$)。见图4、表5。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 黄柏碱低剂量组; D. 黄柏碱高剂量组; E. 黄柏碱+MCP-1组

图4 各组大鼠蛋白表达水平

表5 各组大鼠皮肤组织MCP-1、CCR2蛋白表达水平比较 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	MCP-1/GAPDH	CCR2/GAPDH
正常组	0.16±0.02	0.50±0.07
模型组	0.98±0.06*	1.49±0.12*
黄柏碱低剂量组	0.60±0.05 [#]	1.13±0.12 [#]
黄柏碱高剂量组	0.25±0.03 ^{##}	0.65±0.09 ^{##}
黄柏碱+MCP-1组	0.57±0.06 [△]	1.15±0.13 [△]
F值	288.191	83.141
P值	<0.001	<0.001

注: *表示与正常组比较, $P<0.05$; [#]表示与模型组比较, $P<0.05$; [△]表示与黄柏碱低剂量组比较, $P<0.05$; [△]表示与黄柏碱高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

AD是常见的慢性炎症性皮肤病,受损的皮肤屏障可

能是AD发展的第一步,这将导致进一步的皮肤炎症和过敏敏感性,免疫系统失调是AD的重要发病基础^[8]。虽然关于AD确切的发病机制尚不清楚,但是学者一致认为,改善皮肤屏障功能障碍和免疫失调是治疗AD可行的方法^[9]。为了进一步了解AD,本研究通过在脱毛处涂抹DNCB构建AD大鼠模型。结果显示,与正常组比较,模型组大鼠背部和耳部脱毛处皮肤溃疡、红斑、脱屑,且抓痕较多,搔抓次数增多,HE染色显示患处表皮和棘层增厚、过度角化,皮肤溃疡且有大量炎性细胞浸润,提示该模型较好地还原了AD的病理状态,模型建立成功,可以在此基础上做深一层探索。黄柏碱是一种异喹啉生物碱,以黄柏碱为主要有效成分的中药制剂已经在我国被广泛用于治疗AD^[10]。黄柏碱本身具有抑制炎症的作用,本研究使用不同剂量的黄柏碱处理AD大鼠,显著缓解背部和耳部脱毛处皮肤溃疡、红斑和脱屑,病理损伤改善,抓痕和搔抓次数减少,且治疗作用随剂量升高而增强,说明黄柏碱对AD的进展具有抑制作用,研究其作用机制意义重大。

肥大细胞为一种粒细胞,积累在与过敏、伤口愈合和恶性肿瘤相关的炎症部位,通过诱导血管扩张、促进血管通透性、吸收炎症细胞促进适应性免疫反应,并调节血管的生成和纤维化,是过敏和其他炎症反应的关键引发剂和调节剂^[11]。包括肥大细胞在内的几种免疫细胞以及它们产生的炎症细胞因子广泛影响与屏障功能相关的基因表达,采用全身抗炎疗法可以改善AD中功能失调的皮肤屏障^[12]。IL-17主要存在于活化的CD4⁺ T细胞,IL-17的激活直接造成细胞间脂质的异常,这关系到AD表皮屏障的损害^[13]。抑制促炎因子IL-6可显著缓解AD小鼠耳部组织肿胀及瘙痒感,改善嗜酸性粒细胞介导的过敏性炎症^[14]。过高的IgE与免疫缺陷疾病有关,包括AD、复发性皮肤和肺部感染等^[15]。临床研究发现,AD成年患者往往有严重的皮肤症状,并表现出高的IgE水平^[16]。本研究也发现,AD大鼠血清IgE、IL-17、IL-6的含量升高,且皮肤溃疡,说明过激的免疫炎症反应可能是皮肤屏障受损的直接因素;黄柏碱处理AD大鼠显著降低IgE、IL-17、IL-6的含量,表现出了明显的抗炎作用。此外,氧化应激与AD的发展密切相关,且过敏性炎症条件和氧化应激参与特应性疾病的进展^[17]。已有研究报道,肥大细胞与过

表4 各组大鼠皮肤组织ROS和血清IgE、IL-17、IL-6的含量比较

($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	ROS/ (U/kg)	IgE/ (pg/ml)	IL-17/ (pg/ml)	IL-6/ (ng/ml)
正常组	0.95±0.10	2.24±0.25	49.65±4.60	0.13±0.02
模型组	6.87±0.64*	12.55±1.33*	191.38±20.05*	0.65±0.07*
黄柏碱低剂量组	4.39±0.41 [#]	8.12±0.83 [#]	136.24±12.87 [#]	0.49±0.05 [#]
黄柏碱高剂量组	2.47±0.31 ^{##}	3.10±0.29 ^{##}	69.23±7.82 ^{##}	0.27±0.03 ^{##}
黄柏碱+MCP-1组	5.50±0.62 [△]	10.07±1.10 [△]	184.04±20.30 [△]	0.57±0.06 [△]
F值	156.403	155.561	118.640	113.951
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: *表示与正常组比较, $P<0.05$; [#]表示与模型组比较, $P<0.05$; [△]表示与黄柏碱低剂量组比较, $P<0.05$; [△]表示与黄柏碱高剂量组比较, $P<0.05$ 。

敏原诱导的皮肤炎症有关,肥大细胞缺陷小鼠皮肤炎症减轻,而抑制ROS的表达可以阻止过敏原诱导的肥大细胞活化和炎症介质释放^[18]。本研究亦检测到AD大鼠创伤皮肤组织ROS含量升高,这与前述肥大细胞数量增加一致;黄柏碱处理AD大鼠显著降低其ROS含量,但作用机制有待深究。

MCP-1是由单核吞噬细胞分泌的趋化因子,也是一种多克隆性炎症介质,能够吸引或增强炎症因子/细胞的表达,在炎症部位的迁移和浸润中发挥重要作用^[19]。CCR2是MCP-1的受体,在慢性皮肤病中,单核细胞及其分泌蛋白MCP-1和CCR2的异常激活,单核细胞分化为巨噬细胞,并从血液转移到炎症部位,这个过程会导致病变的形成^[20]。本研究中,AD大鼠病变皮肤组织MCP-1和CCR2蛋白表达水平升高,说明MCP-1/CCR2轴激活;黄柏碱可以降低AD大鼠MCP-1、CCR2蛋白表达,黄柏碱对AD大鼠症状的缓解作用可能与抑制MCP-1/CCR2信号通路激活有关;使用MCP-1与黄柏碱共同处理AD大鼠,对炎症反应及MCP-1/CCR2轴没有影响,提示黄柏碱对AD大鼠炎症反应的抑制作用与抑制MCP-1/CCR2轴激活有关。

综上,黄柏碱可能通过抑制MCP-1/CCR2信号通路降低AD大鼠炎症反应。由于AD是典型的皮肤屏障功能异常皮肤疾病,黄柏碱能否在缓解症状的同时,通过修复皮肤屏障功能降低炎症反应,也是后续研究的方向。

[参考文献]

- [1]Sroka-Tomaszewska J, Trzeciak M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(8):4130-4144.
- [2]Frazier W, Bhardwaj N. Atopic dermatitis: diagnosis and treatment[J]. *Am Fam Physician*, 2020,101(10):590-598.
- [3]Hu L, Wang J, Wu N, et al. Utilizing network pharmacology and experimental validation to investigate the underlying mechanism of phellodendrine on inflammation[J]. *Peer J*, 2022,10(1):1-19.
- [4]Shibuya R, Ishida Y, Hanakawa S, et al. CCL2-CCR2 signaling in the skin drives surfactant-induced irritant contact dermatitis through IL-1 β -mediated neutrophil accumulation[J]. *J Invest Dermatol*, 2022,142(3 Pt A):571-582.
- [5]余何, 张伟明, 饶琪, 等. 玉屏风颗粒抑制肥大细胞及白细胞介素31缓解特应性皮炎大鼠的瘙痒症状[J]. *中药新药与临床药理*, 2022,33(8):1017-1024.
- [6]尹舒鹤. 黄柏碱抑制C48/80诱导的过敏反应及其机制研究[D]. 吉林: 北华大学, 2022.
- [7]沈云章, 竺璐, 杨红霞. 山柰酚对特应性皮炎小鼠炎症反应的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023,39(1):76-80.
- [8]Kim J, Kim B E, Leung D Y M. Pathophysiology of atopic dermatitis: Clinical implications[J]. *Allergy Asthma Proc*, 2019,40(2):84-92.
- [9]Yang G, Seok J K, Kang H C, et al. Skin barrier abnormalities and immune dysfunction in atopic dermatitis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(8):2867-2880.
- [10]Xia T, Liang X, Liu CS, et al. Network pharmacology integrated with transcriptomics analysis reveals ermiao wan alleviates atopic dermatitis via suppressing MAPK and activating the EGFR/AKT signaling[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022,16(1):4325-4341.
- [11]Elieh Ali Komi D, Wöhrl S, Bielory L. Mast cell biology at molecular level: a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020,58(3):342-365.
- [12]Beck L A, Cork M J, Amagai M, et al. Type 2 inflammation contributes to skin barrier dysfunction in atopic dermatitis[J]. *JID Innov*, 2022,2(5):1-20.
- [13]Tokura Y, Hayano S. Subtypes of atopic dermatitis: From phenotype to endotype[J]. *Allergol Int*, 2022,71(1):14-24.
- [14]Hou T, Sun X, Zhu J, et al. IL-37 ameliorating allergic inflammation in atopic dermatitis through regulating microbiota and AMPK-mTOR signaling pathway-modulated autophagy mechanism[J]. *Front Immunol*, 2020,11(1):1-18.
- [15]Al-Shaikhly T, Ochs H D. Hyper IgE syndromes: clinical and molecular characteristics[J]. *Immunol Cell Biol*, 2019,97(4):368-379.
- [16]Tamagawa-Mineoka R, Katoh N. Atopic dermatitis: identification and management of complicating factors[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(8):2671-2685.
- [17]Tsuge M, Ikeda M, Matsumoto N, et al. Current insights into atopic march[J]. *Children (Basel)*, 2021,8(11):1067-1083.
- [18]Luo X, Chen J, Yang H, et al. Dendritic cell immunoreceptor drives atopic dermatitis by modulating oxidized CaMKII-involved mast cell activation[J]. *JCI Insight*, 2022,7(5):1-21.
- [19]Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021,101(Pt B):1-11.
- [20]Behfar S, Hassanshahi G, Nazari A, et al. A brief look at the role of monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in the pathophysiology of psoriasis[J]. *Cytokine*, 2018,110(1):226-231.

[收稿日期]2023-07-20

本文引用格式: 于现朝, 寇旺, 杨洋. 黄柏碱调节MCP-1/CCR2信号通路对特应性皮炎大鼠炎症反应的影响[J]. *中国美容医学*, 2024,33(10):13-17.

CGF用于牙髓血管再生对内皮细胞增殖的影响

单轶, 刘虹秀, 包春艳, 刘海波

(秦皇岛市妇幼保健院口腔科 河北 秦皇岛 066000)

[摘要]目的: 研究浓缩生长因子 (Concentrated growth factor, CGF) 用于牙髓血管再生对内皮细胞增殖的影响。方法: 选取笔者医院2019年3月-2021年3月拟行牙髓血管再生的年轻恒牙髓坏死患儿84例作为研究对象, 按照随机数表法分为CGF组和对照组, 各42例。两组均行牙髓血管再生治疗, CGF组采用CGF覆盖, 对照组采用无机三氧化物聚合体 (Mineral trioxide aggregate, MTA) 覆盖。手术6个月后观察两组临床疗效, 观察术前、术后6个月牙根尺寸变化情况[牙根长度、根尖孔直径、影像学牙根区域 (Radiographic root area, RRA)], 观察两组术后6个月牙髓活力恢复情况, 测定两组手术前后血管内皮细胞表面标记物表达情况[血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31)、血管内皮生长因子受体2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、血管内皮钙黏蛋白 (Vascularendothelial cell cadherin, VE-Cadherin)], 统计两组随访期间并发症发生情况。**结果:** 观察组总有效率为100.00%, 对照组为97.62%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。术后6个月, CGF组牙根长度、PRA显著高于本组术前及对照组术后6个月, 根尖孔直径显著低于同组术前及对照组术后6个月 ($P < 0.05$)。CGF组患儿牙髓活力测试阳性率为40.48% (17/42), 对照组为19.05% (8/40), 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。术后6个月, CGF组CD31、VEGFR2、VE-Cadherin表达水平高于本组术前及对照组术后6个月 ($P < 0.05$)。两组并发症发生率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** CGF用于牙髓血管再生可有效促进年轻恒牙继续发育, 恢复部分牙髓活力, 改善患牙内皮细胞增殖情况, 值得临床推广。

[关键词] 浓缩生长因子; 无机三氧化物聚合体; 牙髓血管再生; 内皮细胞增殖; 牙髓活力; 血管内皮细胞; 并发症

[中图分类号] R781.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2024) 10-0018-04

Effect of CGF on Endothelial Cell Proliferation in Dental Pulp Vascular Regeneration

SHAN Yi, LIU Hongxiu, BAO Chunyan, LIU Haibo

(Department of Stomatology, Qinhuangdao Maternal and Child Health Hospital, Qinhuangdao 066000, Hebei, China)

Abstract: Objective To study the effect of concentrated growth factor (CGF) on endothelial cell proliferation in dental pulp vascular regeneration. **Methods** 84 children with pulp necrosis of young permanent teeth who planned to undergo pulp vascular regeneration in the author's hospital from March 2019 to March 2021 were selected as the research objects. They were randomly divided into CGF group and control group, with 42 cases in each group. Both groups were treated with pulp vascular regeneration. The CGF group was covered with CGF and the control group was covered with inorganic trioxide polymer (MTA). The clinical effects of the two groups were observed 6 months after operation. The changes of root size [root length, apical hole diameter, imaging root area (RRA)] were observed before and 6 months after operation. The recovery of dental pulp vitality in the two groups was observed 6 months after operation. The expression of vascular endothelial cell surface markers [platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), vascular endothelial cadherin] before and after operation were measured, the complications of the two groups during follow-up were counted. **Results** The total effective rate was 100.00% in the observation group and 97.62% in the control group, with no significant difference ($P > 0.05$). 6 months after operation, the root length and pra of CGF group were significantly higher than those before operation and 6 months after operation in the control group, and the diameter of apical foramen was significantly lower than that before operation and 6 months after operation in the control group ($P < 0.05$). The positive rate of dental pulp viability test in CGF group was 40.48% (17/42) and that in control group was 19.05% (8/40). The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of CD31, VEGFR2 and ve cadherin in CGF group were higher than those before operation and 6 months after operation in control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the incidence of complications between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** CGF used in dental pulp vascular regeneration can effectively promote the continuous development of young permanent teeth, restore the vitality of some dental pulp, and improve

the proliferation of endothelial cells of affected teeth, which is worthy of clinical promotion.

Key words: concentrated growth factor; mineral trioxide aggregate; dental pulp vascular regeneration; endothelial cell proliferation; pulp vitality; vascular endothelial cells; complication

年轻恒牙是牙根发育不完全且根尖孔未闭的恒牙,其发生牙髓感染、坏死与外伤、龋病等有关,可导致牙根停止发育。以往多采用根尖诱导成形术治疗,但结局往往是愈后不稳定、冠根比例不协调等^[1-3]。随着组织工程学的发展,牙髓血管再生技术逐渐应用至临床,并已经开始围绕牙髓血管再生手术的方法和材料进行研究^[4]。无机三氧化物聚合体(MTA)是目前应用较广的牙髓血管再生治疗材料,因其较好的封闭性、生物相容性和抑菌性而广受认可,但MTA固化时间长、遇唾液易溶解,固化后牙冠易变色,且操作难度高,因此临床一直在寻找更为适宜的替换材料^[5]。自体血小板浓缩物中的生长因子可调节细胞增殖、分化、趋化,并加快软硬组织再生,在牙髓血管再生中的应用价值备受关注^[6]。本研究分别对比浓缩生长因子(CGF)和MTA在牙髓血管再生中的应用效果和对患儿内皮细胞增殖的影响,旨在为临床年轻恒牙牙髓坏死治疗方式的选择提供参考。现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料:选取笔者医院2019年3月-2021年3月拟行牙髓血管再生的84例年轻恒牙牙髓坏死患儿作为研究对象,按照随机数表法分为两组,CGF组和对照组,各42例。其中CGF组男21例,女21例;年龄6~12岁,平均年龄 (9.32 ± 2.01) 岁;对照组男23例,女19例;年龄6~12岁,平均年龄 (9.42 ± 2.11) 岁。两组基础资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性,本研究获笔者医院医学伦理委员会批准。

1.2 纳入和排除标准

1.2.1 纳入标准:①年轻恒牙因发育异常、外伤、龋病引起的牙髓炎或根尖周炎患儿^[7];②拟行牙髓血管再生手术,符合手术指征;③患牙牙根尚未发育完成,Nolla钙化分期为7、8、9期^[7];④患儿家长签署知情同意书。

1.2.2 排除标准:①根折或全脱位牙齿;②根尖发育完成的患牙;③药物过敏者;④随访失访者。

1.3 方法

1.3.1 CGF制备:取患儿外周血9 ml于CGF无菌离心管中,置于Medifuge离心机(Silfradent srl,意大利)中,离心14 min后将离心管中液体分3层,分别为贫血小板层、CGF凝胶层以及红细胞层,镊子夹起CGF凝胶,以无菌眼科剪剪开中、下层的交界处,后将CGF凝胶层剪成约2 mm×2 mm大小备用。

1.3.2 手术方法:两组均行牙髓血管再生治疗,CGF组采用CGF覆盖,对照组采用MTA覆盖,具体如下。术前拍摄X线片观察患牙根尖发育情况、病变情况和工作长度,以2%利多

卡因行局部麻醉,显微镜(苏州速迈医疗设备,中国)下开髓引流,揭全髓顶,充分暴露根管口,形成直线通路。以超声(EMS,瑞士)和化学预备荡洗清理根管,去除坏死物质,K锉预备根管,预备时尽可能保留牙本质壁,0.5%次氯酸钠液反复冲洗根管,无菌吸潮纸尖蘸干根管,将环丙沙星、甲硝唑、米诺环素以1:1:1比例碾成粉末,与生理盐水调制成三联抗生素糊剂,用螺旋输送器将糊剂导入根管,冠方使用暂封膏暂封,1周后复诊,若患牙未明显改善或出现叩痛、牙龈红肿、瘘管等现象则再次进行上述操作,症状消除后局麻下使用橡皮障隔离患牙,显微镜下去除冠方暂封材料,打开并清除根管内物质,以次氯酸钠液和生理盐水冲洗根管,超声荡洗至根管完全洁净,无菌吸潮纸尖蘸干根管,放置CGF块前,以根管锉刺破根尖牙乳头,出血达釉牙骨质界下2~3 mm,暂封膏暂时封闭,等候约20 min以形成较好血凝块。①CGF组以可吸收明胶海绵覆盖凝血块表面作为支架,用镊子将CGF小块置于根管中,垂直加压器加压,反复操作至CGF封闭根管上段。②对照组同样用可吸收明胶海绵支架,填入MTA封闭根管上段。两组封闭成功后,均放置厚度约为2 mm的Vitapex,GIC垫底,复合树脂充填窝洞。术后1、3、6、12个月定期复查,临床检查与影像学检查,观察牙根发育、根尖周病变的愈合状况和牙髓活力恢复情况。

1.4 观察指标

1.4.1 临床疗效:手术6个月后观察两组临床疗效^[8]。治愈:患牙无叩击痛,牙龈肿胀和瘘管消失,牙松动度同对照牙;X线片显示牙周膜影像清晰连续,根尖周低密度影消失,患牙牙根继续发育,根尖孔直径减小、根管壁增厚。好转:患牙无叩击痛,牙龈无肿胀,未见瘘管,牙松动度同对照牙;X线片见根尖周低密度影消失,患牙牙根无明显发育。失败:未达以上标准。总有效率=(治愈+好转)例数/总例数×100%。

1.4.2 牙根尺寸变化情况:观察术前、术后6个月牙根尺寸变化情况,观察内容包括牙根长度、根尖孔直径、影像学牙根区域(RRA)。Image J图像处理软件分析图片,测量前先以软件中TurboReg插件校准图像以减少因X光片投射角度变化导致的图片偏差。其中牙根长度:近远中根尖点连线中点与近远中釉牙骨质界点连线中点的距离。根尖孔直径:近远中根尖点的距离。RRA:Image J中以多边形工具勾勒出近远中釉牙骨质界点及牙周韧带,获得牙根总面积,牙根总面积为牙根整个平面面积,并使用多边形工具勾勒出根管空间的轮廓,获取根管空间面积。RRA测量值=每个X片中的牙根总面积-根管空间面积。

1.4.3 牙髓活力恢复情况:观察两组术后6个月,患牙牙髓

冷热测试和牙髓电活力测试（长沙得悦，中国）与对照牙相同或稍迟钝于对照牙视为牙髓活力测试阳性。

1.4.4 血管内皮细胞表面标记物表达情况：测定两组手术前后血管内皮细胞表面标记物表达情况，取患儿血清5 ml，以常规Trizol（购自美国Invitrogen公司）提取总细胞中RNA并进行逆转录，以Primer Premier 5.0软件设计引物，以 β -actin为内参，采用7 500 Real Time PCR以荧光实时定量反转录聚合酶链反应（VQ-RT-PCR）测定血小板-内皮细胞黏附分子（CD31）、血管内皮生长因子受体2（VEGFR2）、血管内皮钙黏蛋白（VE-Cadherin）表达水平。

1.4.5 并发症：统计两组随访期间根管内感染、牙齿染色、牙龈肿痛及填充物脱落等并发症发生情况。

1.5 统计学分析：选用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析，计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，两两比较行独立样本 t 检验，同组内比较采取配对样本 t 检验，计数资料以[例（%）]表示，组间行 χ^2 检验及Fisher精确概率法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效：观察组总有效率与对照组比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。见表1。两组典型病例手术前后X线片见图1~2。

表1 两组临床疗效比较				[例（%）]
组别	治愈	好转	失败	总有效
CGF组（ $n=42$ ）	29（69.05）	13（30.95）	0（0.00）	42（100.00）
对照组（ $n=42$ ）	21（50.00）	20（47.62）	1（2.38）	41（97.62）
P 值	0.257 [▲]			

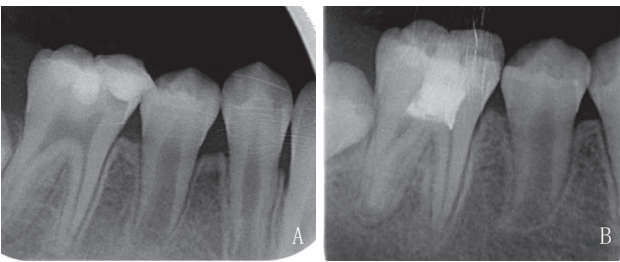
注：[▲]表示采用Fisher精确概率法。

表2 两组手术前后牙根尺寸变化情况比较					($\bar{x} \pm s$, 素值/像素值的平方)			
组别	牙根长度		根尖孔直径		PRA			
	术前	术后6个月	术前	术后6个月	术前		术后6个月	
CGF组 ($n=42$)	374.52±31.41	423.71±35.15*	72.08±10.15	50.12±9.78*	31 825.15±6 698.52	38 982.42±5 894.12*		
对照组 ($n=42$)	375.58±30.42	392.51±34.22*	72.11±10.84	55.15±9.55*	31 714.14±6 705.12	35 948.71±4 854.15*		
t 值	0.157	4.122	0.013	2.385	0.076		2.575	
P 值	0.876	<0.001	0.990	0.019	0.940		0.012	

注：*表示与同组术前比较， $P < 0.05$ 。

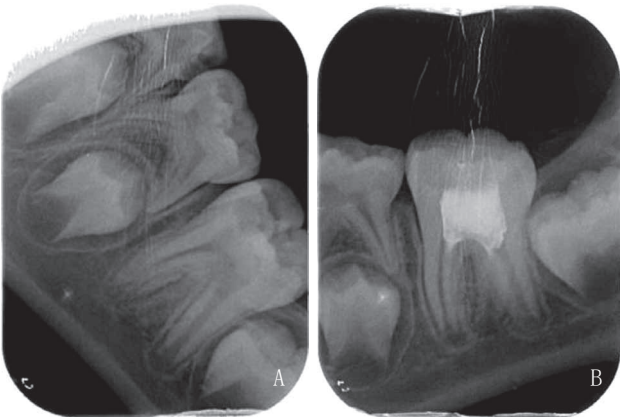
表3 两组手术前后血管内皮细胞表面标记物表达情况比较						(例, $\bar{x} \pm s$)	
组别	CD31		VEGFR2		VE-Cadherin		
	术前	术后6个月	术前	术后6个月	术前	术后6个月	
CGF组（ $n=42$ ）	0.82 \pm 0.24	2.38 \pm 0.88*	0.86 \pm 0.18	2.91 \pm 0.76*	0.91 \pm 0.21	3.05 \pm 0.98*	
对照组（ $n=42$ ）	0.83 \pm 0.26	1.53 \pm 0.75*	0.84 \pm 0.19	1.72 \pm 0.39*	0.94 \pm 0.17	1.64 \pm 0.51*	
t 值	0.183	4.764	0.495	9.028	0.720	8.271	
P 值	0.855	<0.001	0.622	<0.001	0.474	<0.001	

注：*表示与同组术前比较， $P < 0.05$ 。



注：A. 术前；B. 术后6个月

图1 CGF组手术前后X线片



注：A. 术前；B. 术后6个月

图2 对照组手术前后X线片

2.2 手术前后牙根尺寸变化情况：术前两组牙根长度、根尖孔直径、PRA比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），术后6个月CGF组牙根长度、PRA显著高于本组术前及对照组术后6个月，根尖孔直径显著低于本组术前及对照组术后6个月（ $P < 0.05$ ）。见表2。

2.3 术后6个月牙髓活力恢复情况：CGF组患儿牙髓活力测试阳性率为40.48%（17/42），对照组为19.05%（8/42），

差异有统计学意义 ($\chi^2=4.613$, $P=0.032$)。

2.4 手术前后血管内皮细胞表面标记物表达情况: 术前两组CD31、VEGFR2、VE-Cadherin表达水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 术后6个月CGF组CD31、VEGFR2、VE-Cadherin表达水平高于本组术前及对照组术后6个月 ($P<0.05$)。见表3。

2.5 两组并发症发生情况: 两组并发症发生率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表4。

表4 两组并发症发生情况比较 [例(%)]

组别	根管内感染	牙齿染色	牙龈肿痛	填充物脱落	总并发症
CGF组 (n=42)	1 (2.38)	0 (0.00)	3 (7.14)	0 (0.00)	4 (9.52)
对照组 (n=42)	2 (4.76)	1 (2.38)	5 (11.90)	1 (2.38)	9 (21.43)
χ^2 值	2.275				
P值	0.131				

3 讨论

年轻恒牙具有根尖乳头、牙周膜、牙髓、牙囊等多种干细胞, 其中根尖乳头干细胞可诱导分化为牙本质和牙髓样组织, 为牙髓血管再生手术成功的重要原因^[9]。年轻恒牙具有血运丰富的特点, 且有较强的牙髓抗感染能力, 尽管牙髓感染或坏死, 但仍可能有根管内牙髓组织存在, 即使根尖存在较为严重的病变, 也可能保存部分牙乳头、牙髓组织, 当牙周炎症得以控制且根管消毒后, 这些残留组织就会增殖^[10-11]。牙髓血管再生技术可利用牙周膜组织、根尖周组织和根管内剩余牙髓组织, 通过改善微环境充分发挥其生长潜能, 促使其增殖、分化, 从而促进牙髓样组织成熟, 使年轻恒牙继续发育, 而找到适宜的材料可为牙髓血管再生治疗提供较好的生物学基础和微环境^[12-13]。

本研究中, 两组临床疗效比较差异无统计学意义, 但术后6个月CGF组牙根长度、PRA显著高于同组术前及对照组术后6个月, 根尖孔直径显著低于本组术前及对照组术后6个月。CGF组患儿牙髓活力测试阳性率显著高于对照组。提示两种材料运用至牙髓血管再生技术中均可获得较好临床疗效, 但CGF对牙根继续发育、牙髓活力改善有更好的促进作用。其原因分析如下: PRA可反应牙根的平面面积, 为牙根发育的有效评价指标, 较单一测量更加全面。CGF取自自体外周静脉血, 由特定离心机处理后获得, 制备操作简便快速, 离心过程中血小板之间高频率撞击, 使得CGF富含高浓度的生长因子, 可促进软硬组织的愈合、修复和再生^[14-16]。CGF为三维纤维蛋白网络结构, 白细胞、生长因子、血小板聚集于纤维蛋白基质中缓慢释放, 使生长因子长时间存在于体内, 促进组织再生, 同时纤维蛋白网络结构可作为支架, 加快微血管形成, 为软硬组织的愈合、修复和再生提供较高的生物学基础^[17-18]。

本研究中, 术后6个月CGF组CD31、VEGFR2、VE-Cadherin表达水平高于本组术前及对照组术后6个月。提示

CGF用于牙髓血管再生可有效促进牙周周围内皮细胞增殖。

CD31、VEGFR2、VE-Cadherin为常见的血管内皮细胞表面标记物, 可用于反应牙周周围内皮细胞增殖情况^[19]。CGF离心后因血小板碰撞生成大量 α 颗粒, 包括富含血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)和转化生长因子- β (TGF- β), 这些物质可将未分化的间充质细胞吸引至相应部位, 促进细胞增殖和血管生成^[20-21]。其中VEGF可促进血管内皮细胞迁移、增殖, 并提高血管通透性, 促进血浆蛋白渗出, 有利于血管再生^[22-23]; PDGF可诱导受损部位的上皮细胞与内皮细胞分裂、增殖, 促进血管生成, 并趋化白细胞、间充质干细胞、成纤维细胞、成骨细胞等发生作用, 其还可通过增加胶原蛋白合成、刺激骨细胞有丝分裂来促进新骨形成^[24]; TGF- β 可募集多种免疫细胞, 并促进骨细胞增殖和分化, 抑制破骨细胞生成, 其还为细胞因子中促纤维生成的最强介质, 可促进创口愈合^[25]。本研究中, 两组并发症风险基本相当, 提示CGF用于牙髓血管再生安全性较高。

综上, CGF用于年轻恒牙牙髓坏死的牙髓血管再生治疗中疗效确切, 有利于牙根继续发育和牙髓活力恢复, 在促进牙周周围内皮细胞增殖中也具有较好效果, 值得临床推广。

【参考文献】

- [1]Amaro R G, Dos S L, Lima T, et al. Pulp healing in immature replanted permanent teeth: A competing risk analysis[J]. Dent Traumatol, 2021,37(3):447-456.
- [2]杨光, 尹雪莲, 马东杰, 等. 三氧化聚合物MTA在年轻恒牙活髓保存术后的治疗效果及对牙髓干细胞体外增殖分化的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2020,17(1):15-18.
- [3]王小黎, 徐丽, 张容秀, 等. Vitapex对年轻恒牙牙髓血运重建术疗效的影响[J]. 中华全科医学, 2020,18(5):727-729.
- [4]Huang Y, Tang X, Cehreli Z C, et al. Autologous transplantation of deciduous tooth pulp into necrotic young permanent teeth for pulp regeneration in a dog model[J]. J Int Med Res, 2019,47(10):5094-5105.
- [5]揭育培, 林竺. 牙髓血管再生术治疗年轻恒牙牙髓坏死的临床观察[J]. 中国美容医学, 2019,28(2):123-126.
- [6]Xu F, Qiao L, Zhao Y, et al. The potential application of concentrated growth factor in pulp regeneration: an in vitro and in vivo study[J]. Stem Cell Res Ther, 2019,10(1):134.
- [7]Saoud T, Ricucci D, Lin L M, et al. Regeneration and repair in endodontics-a special issue of the regenerative endodontics-a new era in-clinical endodontics[J]. Dent J(Basel), 2016,4(3):1-15.
- [8]樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012:170-174.
- [9]殷光亮, 王好公, 李春年, 等. 牙髓血运重建术治疗年轻恒牙根尖周疾病的研究情况[J]. 现代口腔医学杂志, 2020,34(5):309-311.
- [10]孙毅, 林玉红. 牙髓血运重建治疗前磨牙牙内吸收1例[J]. 北京口腔医学, 2022,30(3):216-219.

- [11]张玉杰, 张楠, 张雪飞, 等. 牙髓血运重建术治疗年轻恒牙根尖周病变的效果及安全性观察[J]. 解放军医药杂志, 2020,32(10):54-57.
- [12]Khazaei S, Khademi A, Torabinejad M, et al. Improving pulp revascularization outcomes with buccal fat autotransplantation[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2020,14(9):1227-1235.
- [13]杨柳青. 牙髓血运重建术治疗年轻恒牙根尖周病变的临床价值分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2021,43(8):2775-2777.
- [14]Li Z, Liu L, Wang L, et al. The effects and potential applications of concentrated growth factor in dentin-pulp complex regeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2021,12(1):357.
- [15]刘彩霞, 王立, 袁铮. 富血小板血浆应用于牙髓血运重建的实验研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2020,23(2):123-127.
- [16]苏勤, 田立华, 金松, 等. 浓缩生长因子纤维蛋白膜联合Bio-Oss骨粉修复拔牙术后牙槽骨缺损疗效分析[J]. 中国美容医学, 2023,32(6):163-166.
- [17]林远洪, 龙军, 游洋. 自体骨联合CGF在牙槽嵴裂修复中的临床效果及骨吸收情况分析[J]. 中国美容医学, 2022,31(10):101-104.
- [18]殷亮亮, 李春年. 浓缩生长因子和根管冲洗液对牙髓细胞的保护及贴附作用[J]. 河北医药, 2021,43(23):3569-3573.
- [19]石笑, 赵寅华, 赵莹, 等. 不同浓度血管内皮细胞生长因子对人牙周膜干细胞内皮向分化的影响[J]. 口腔医学, 2020,40(6):506-512.
- [20]王鑫, 侍泉华. 浓缩生长因子在下颌阻生齿拔除术中的应用效果及对患者生活质量的影响[J]. 中国美容医学, 2023,32(5):142-145.
- [21]魏中武, 黄谢山, 陈灼庚. 浓缩生长因子在口腔临床中的应用及研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2020,47(2):235-243.
- [22]Nagaraja S, Mathew S, Abraham A, et al. Evaluation of vascular endothelial growth factor - A release from platelet-rich fibrin, platelet-rich fibrin matrix, and dental pulp at different time intervals[J]. J Conserv Dent, 2020,23(4):359-363.
- [23]郑新宇. 功能矫形对安氏II类错殆模型大鼠髁突软骨生长发育及VEGF表达的影响[J]. 中国美容医学, 2022,31(3):103-106.
- [24]刘娟, 陈斌, 闫福华. 富血小板血浆和浓缩生长因子对人牙周膜细胞增殖和成骨分化影响的研究[J]. 国际口腔医学杂志, 2021,48(5):520-527.
- [25]韩亚琨, 于程程, 于艳. 牙周炎宿主转化生长因子- β +调节性B细胞变化特点[J]. 口腔医学研究, 2020,36(2):135-138.

[收稿日期]2023-04-19

本文引用格式: 单轶, 刘虹秀, 包春艳, 等. CGF用于牙髓血管再生对内皮细胞增殖的影响[J]. 中国美容医学, 2024,33(10):18-22.

杭州市2~6岁儿童乳牙龋病的流行病学调查分析和乳牙预成冠的力学实验研究

孙晓美, 刘天爽, 方力, 刘小雅

(杭州口腔医院城西院区 浙江 杭州 310006)

[摘要]目的: 了解杭州市2~6岁儿童龋齿的牙面分布规律, 比较树脂、氧化锆、玻璃陶瓷乳牙预成冠的抗压缩破坏力值。方法: 抽取杭州口腔医院城西院区儿童口腔科就诊的1 000名2~6岁儿童进行口腔检查并记录, 分析患龋差异。将树脂、氧化锆、玻璃陶瓷乳牙预成冠分别用树脂粘接剂粘接在下颌第二乳磨牙的树脂模型上。在万能材料试验机上进行抗压缩强度测试, 记录试件抗压缩破坏力值。采用SPSS 24.0统计分析软件对数据进行统计分析。结果: 右下第二乳磨牙患龋风险最高, 左侧第二乳磨牙次之。乳磨牙患龋率高于乳前牙。龋齿牙面风险切端/殆面大于近中远中邻面, 舌面患龋率最低。三组抗压缩破坏力值依次为A组(694.85 ± 292.20) N, B组(537.31 ± 152.03) N, C组(613.73 ± 303.92) N。两两相较, 三种材料的差别均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: 杭州市2~6岁儿童乳牙龋有牙面特异性, 乳磨牙患龋率高, 牙面多。三种乳牙预成冠材料均可满足临床需要。树脂预成冠抗压缩破坏力值大于玻璃陶瓷乳牙预成冠和氧化锆预成冠。

[关键词] 龋病; 乳牙; 发病率; 瓷预成冠; 抗压缩破坏力

[中图分类号] R788.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455 (2024) 10-0022-04

Epidemiological Investigation and Mechanical Experiment of Deciduous Tooth Precrown in 2-6 Year Old Children in Hangzhou City

SUN Xiaomei, LIU Tianshuang, FANG Li, LIU Xiaoya

基金项目: 杭州市医药卫生科技项目 (编号: B20200632)

通信作者: 刘小雅, 主治医师; 研究方向为口腔修复学和材料学。E-mail: lxydentist@163.com

第一作者: 孙晓美, 主治医师; 研究方向为儿童口腔医学。E-mail: 453028709@qq.com

(West Branch of Hangzhou Stomatology Hospital, Hangzhou 310006, Zhejiang, China)

Abstract: Objective To investigate the regularities of caries distribution in the primary dentition of children in Hangzhou, China. To measure the compressive failure resistance of primary mandibular second molar crowns from three different manufacturers-resin preformed crown, zirconia preformed crown and glass preformed crown. **Methods** A total of 1 000 children aged 2-6 years were selected from the children's Stomatology department in the west of Hangzhou Stomatology Hospital. Resin, zirconia and glass-ceramic deciduous teeth were preformed on the resin model of mandibular second deciduous molar with resin adhesive respectively. The compressive strength test was carried out on the universal material test machine, and the compressive destructive force value of the specimen was recorded. SPSS 24.0 statistical analysis software was used for statistical analysis of the data. **Results** Right mandibular second primary molars are at highest risk of caries, followed by left. Primary molars suffer from higher caries than primary anterior teeth. The distribution of caries concentrated on the occlusal surface, followed by the mesial and distal proximal caries, and lingue caries have the lowest rate. 3 group of compressive failure resistance respectively: resin group (694.85 ± 292.20)N, zirconia group (537.31 ± 152.03)N, glass group (613.73 ± 303.92) N. The comparison between any two of them has no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** The primary tooth caries distribution has specificity in tooth surface. Primary molars have a high rate of caries, and there are many caries surfaces. The forces required to fracture the resin crowns were greater than the glass porcelain and zirconia crowns.

Keywords: caries; primary teeth; prevalence; porcelain preformed crown; compression failure resistance

第四次全国口腔流行病学调查显示,我国儿童患龋情况呈现上升态势,5岁组儿童乳牙患龋率高达70.9%,比十年前上升了5.8个百分点^[1],龋病及其继发病严重危害乳牙的生理功能,影响儿童颌骨发育甚至身心健康^[2]。预成冠是一种与天然牙体解剖形态相似的修复技术,冠中空可容纳水门汀,在大面积牙体缺损的乳牙龋病修复治疗中成功率较高^[3]。本课题调查了乳牙不同牙位的患龋发生率,在患龋率最高的牙位上应用不同材料预成冠进行修复,并检测不同材料预成冠修复后修复复合物的抗压缩破坏力值。以期对乳牙预成冠临床选择和研发方向提供参考。

1 材料和方法

1.1 流行病学调查:随机选取2021年1月-2021年6月在杭州口腔医院城西院区儿科就诊的1 000名乳牙龋坏的2~6岁儿童患者,记录龋坏的牙位和牙面位置(唇侧、近中、远中、切端、舌/腭侧),得到乳牙龋坏的分布概率。

1.2 乳磨牙预成冠复合体模型建立:临床收集一颗牙冠完整的右下第二乳磨牙,患儿家属知情同意,刮除牙周膜,检查牙齿大小、形态正常,按照乳牙预成冠预备方法常规预备,殆面磨除2 mm,轴面去除倒凹,近远中面预备1.0~1.5 mm,羽状肩台在龈下1.5~2.0 mm。

将预备好的乳磨牙应用椅旁口内扫描系统(3shape,丹麦)扫描获得数字化模型,3D打印24个光敏树脂牙,去除支撑,震荡漂洗。随机分为三组,每组8个,分别选择型号适合的氧化锆预成冠(Bedicrown,英国),玻璃陶瓷预成冠(汉文,中国)和树脂预成冠(汉文,中国)。自粘树脂水门汀RelayTM U200(3M ESPE,美国)通过混合头分别注入预成冠内,完全就位后去除多余的水门汀,光固化灯光

照20 s。使用自凝树脂包埋树脂牙根部,完成乳磨牙预成冠复合体的模型。包埋底座统一灌制为底面边长为40 mm、高度为15 mm的正方体,牙长轴垂直于底面,切端应调至与底面平行,以便RGT-15万能材料试验机测力,见图2。



图1 乳磨牙修复后试件

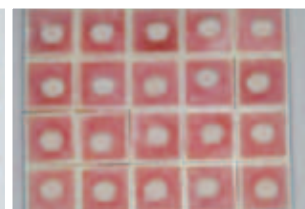


图2 乳磨牙包埋后试件

1.3 乳磨牙预成冠复合体的力学测试:选择合适的钢珠放置在乳磨牙预成冠复合体的咬合面上,钢珠的大小和预成冠中央窝匹配。在万能材料试验机上对乳磨牙预成冠复合体上的钢珠垂直加力直至应力骤降,提示乳磨牙预成冠复合体破损。读取应力最高值为预成冠的抗破坏强度值,见图3~4。



图3 RGT-15万能材料试验机

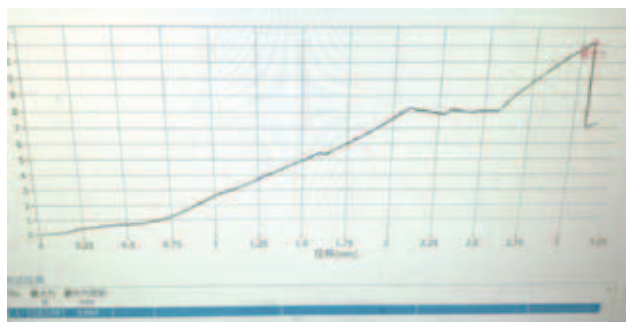


图4 乳磨牙预成冠复合体应力最高值

1.4 统计学分析：记录每个复合体测试数据，采用Excel工作表录入数据，SPSS 24.0对数据进行统计学分析，采用单因素方差分析三组预成冠的抗破坏强度值。

2 结果

2.1 患龋儿童的乳牙龋患龋情况：各牙位的患龋率高低顺序为右下第二乳磨牙>左下第二乳磨牙>右上第二乳磨牙，见图5。从牙面分布来看，切端/殆面龋率最高，近中邻面、远中邻面次之，见图6。乳磨牙的龋坏常累及多个牙面。

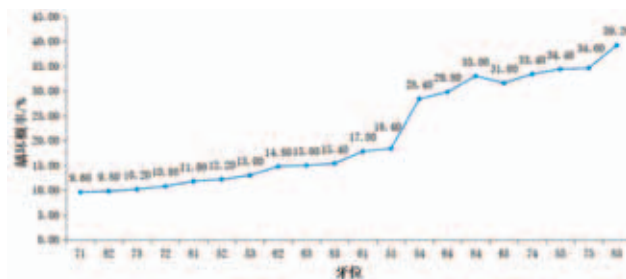


图5 乳牙牙位的龋坏概率

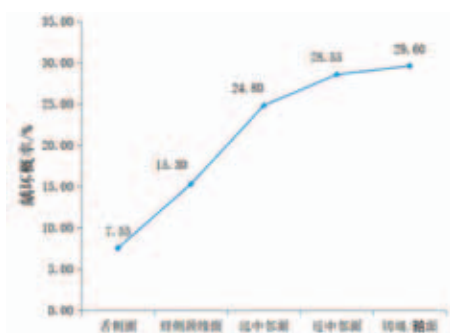


图6 每个牙面龋坏概率平均值

2.2 三种乳牙预成冠抗破坏情况：本研究共纳入24个修复体，每组分别为8个。玻璃陶瓷、氧化锆以及树脂预成冠抗破坏强度值依次为（694.85±292.20）N，（537.31±152.03）N，（613.73±303.92）N。两两比较，差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

3 讨论

龋病被认为是全球最常见的传染病^[4-5]，近些年儿童的发病率逐渐上升，一项基于1995年-2019年发表的81篇文章的荟萃分析表明，乳牙的患龋率随着时间的推移而增加^[6]。全球乳牙的龋病患病率约为46%，而在发展中国家，患病率更高^[6-7]。

本项研究结果发现2~6岁儿童龋齿分布具有以下特点：①乳磨牙患龋率高于乳前牙，第二乳磨牙患龋率最高；②下颌患龋率高于上颌；③左右侧患龋率不对称；④切端/殆面、近远中邻面的患龋率高于唇舌面。

大部分研究表明^[8]，奶瓶使用造成乳前牙患龋率较高，本研究结果与之不一致可能与流行病学调查样本分布差异及乳前牙龋病已被及时充填有关。儿童随着年纪的增大，乳磨牙的萌出，饮食结构发生改变，且乳磨牙较乳前殆面点隙窝沟复杂，口内位置相对靠后，窝沟龋患龋率高，表现为第二乳磨牙较第一乳磨牙易感。唾液腺开口使下颌乳磨牙患龋率高于上颌乳磨牙^[8]。本研究发现左右侧患龋率呈现不对称性，右侧患龋率明显高于左侧，这可能与右手习惯有关。乳牙除了窝沟复杂引起殆面高患龋率外，还常表现为邻接松，牙间隙增大，容易食物嵌塞，又因牙位靠后难以清洁而加重邻面龋。

目前金属预成冠被认为是修复乳磨牙多个牙面和较大龋坏的合适选择。比起传统的充填治疗，金属预成冠有更长的寿命和耐久性，可在较长时间内降低伴有龋齿或根管治疗后的乳磨牙的失败或疼痛的风险，提供更长久的修复^[9-10]。尽管乳牙金属预成冠有上述优点，但由于金属物质的暴露，美学功能较差，可能对患儿的身心健康造成不利影响。全瓷预成冠和树脂预成冠具有美观耐用、生物相容性好、牙龈刺激小、脱落率低等特点，受到医生和患儿家长的广泛关注^[11]。

Donly SD等^[12]发现6~8岁儿童的平均最大咬合力为78 N，而10~12岁儿童在第一磨牙区域的平均最大咬合力高达106 N。Jayakumar KJ等^[13]对纳入研究的13篇文献进行meta分析发现3~6岁儿童平均咬合力为246.22 N。本研究中3种乳牙预成冠的抗破坏强度值均大于正常殆力，低于Hayek P等^[14]及Kist El Hayek J等^[15]的研究结果，但均可有效满足正常咀嚼的需要，不易出现修复体破碎的情况，是一种较好的乳牙大面积龋损修复的方式。

为了样本的一致性，本研究选择3D打印树脂牙模型进行研究，其弹性模量与牙本质（12~18 GPa）接近，并且避免了离体牙之间解剖形态、脱水等造成样本差异；也在一定程度上避免了三维有限元分析应用数字化模型建立的弊端^[16]。树脂预成冠与3D打印树脂牙具有接近的弹性模量，修复乳牙在承受外力时应力可更好地分散和传导，提高抗折性。而玻璃陶瓷及氧化锆预成冠弹性模量与树脂牙差异较大，弹性模量更高，到达并集中在水门汀粘接层的应力越多，粘接层破裂，导致抗破坏强度值偏小^[17]。

另一方面本文使用的氧化锆乳牙全瓷冠为国外品牌，

其型号大小基于欧美人口牙齿形态大小预设制作,周永川等^[18]研究发现美国金属预成冠最大近远中径、颊舌径、冠高等均与我国儿童乳牙形态差异较大,医生临床操作时反复取戴选择了相对合适型号,但仍出现了边缘不准、粘接层较另外两组过厚的问题,这可能是导致其抗破坏强度值偏小的原因^[19]。

综上所述,杭州市2~6岁儿童龋面分布以切端/殆面、近远中邻面为主,呈现乳磨牙高于乳前牙,尤以下颌第二乳磨牙最严重的特点。国产树脂、玻璃陶瓷预成冠和贝迪氧化锆冠均具有良好的抗破坏强度,既满足了美学要求,同时增加抗断裂性,为临床治疗中大范围推广提供实验依据。然而,本研究仍然存在一些局限性,样本量可以更大,以提高结果的准确性和研究的有效性,体外和体内研究进一步评估国产树脂、玻璃陶瓷预成冠的其他机械性能和临床效果。

【参考文献】

- [1]冯希平.中国居民口腔健康状况——第四次中国口腔健康流行病学调查报告[C].2018年中华口腔医学会第十八次口腔预防医学学术年会论文汇编,2018.
- [2]Guan M, Nada O A, Wu J J, et al. Dental caries and associated factors in 3-5 year old children in Guizhou province, China: an epidemiological survey (2015-2016)[J]. Front Public Health, 2021,9:747371.
- [3]施宜君,杨燃,王艳,等.乳磨牙金属预成冠修复后咬合及颞下颌关节评估的临床研究[J].口腔疾病防治,2022,30(11):785-791.
- [4]Fernandez M D S, Pauli L A, da Costa V P P, et al. Dental caries severity and oral health related quality of life in Brazilian preschool children[J]. Eur J Oral Sci, 2022,130(1):e12836.
- [5]Peres M A, Macpherson L M D, Weyant R J, et al. Oral diseases: A global public health challenge[J]. Lancet, 2019,394(10194):249-260.
- [6]Kazeminia M, Abdi A, Shohaimi S, et al. Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: A systematic review and meta-analysis[J]. Head Face Med, 2020,16(1):22.
- [7]Khan S Y, Javed F, Ebadi M H, et al. Prevalence and risk factors for ECC Among preschool children from India along with the need of its own CRA tool- a systematic review[J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2022,12(3):295-308.
- [8]Cheng H, Chen R, Milosevic M, et al. Interventions targeting bottle and formula feeding in the prevention and treatment of early childhood caries, overweight and obesity: an integrative review[J]. Int J Environ Res Public Health, 2021,18(23):12304.
- [9]蒋子晨,宋玉梦,康方芳,等.南京市449例乳牙期儿童龋面分布特点[J].口腔医学,2021,41(1):54-58.
- [10]张佳丽,姚军.金属预成冠与树脂充填治疗乳磨牙邻面龋的对比分析[J].福建医科大学学报,2022,56(4):357-360.
- [11]Ayedun O S, Oredugba F A, Sote E O. Comparison of the treatment outcomes of the conventional stainless steel crown restorations and the hall technique in the treatment of carious primary molars[J]. Niger J Clin Pract, 2021,24(4):584-594.
- [12]Alzanbaqi S D, Alogaiel R M, Alasmari M A, et al. Zirconia crowns for primary teeth: a systematic review and meta-Analyses[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022,19(5):2838.
- [13]Donly K J. Restorative dentistry for children[J]. Dent Clin North Am, 2013,57(1):75-82.
- [14]Jayakumar P, FelsyPremila G, Muthu M S, et al. Bite force of children and adolescents: a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Pediatr Dent, 2023,47(3):39-53.
- [15]Elian El Hayek J, El Osta N, et al. Fracture strength of preformed zirconia crown and new custom-made zirconia crown for the restoration of deciduous molars: in vitro study[J]. Eur Arch Paediatr Dent, 2022,23(2):333-339.
- [16]Kist S, Stawarczyk B, Kollmuss M, et al. Fracture load and chewing simulation of zirconia and stainless steel crowns for primary molars[J]. Eur J Oral Sci, 2019,127(4):369-375.
- [17]张东晗.高嵌体桩钉长度对3D打印树脂牙抗压破坏力影响的实验研究[D].沈阳:中国医科大学,2017.
- [18]周永川,王金业,平雅坤,等.计算机辅助测量上颌第一乳磨牙牙冠与其不锈钢预成冠形态差异[J].实用口腔医学杂志,2021,37(3):5.
- [19]Wimmer T, Erdelt K J, Raith S, et al. Effects of differing thickness and mechanical properties of cement on the stress levels and distributions in a three-unit zirconia fixed prosthesis by FEA[J]. J Prosthodont, 2014,23(5):358-366.

[收稿日期]2023-04-20

本文引用格式:孙晓美,刘天爽,方力,等.杭州市2~6岁儿童乳牙龋病的流行病学调查分析和乳牙预成冠的力学实验研究[J].中国美容医学,2024,33(10):22-25.

· 告作者和读者 ·

版权转让声明

凡向本刊所投稿件,全体作者需在收到编辑部发出的稿件回执时签署《论文投送介绍信》,将该论文的汇编权、发行权、印刷版和电子版的复制权、翻译权、信息网络传播权在世界范围内转让给本刊。本刊已加入《中国学术期刊综合评价数据库》,被《中国期刊网》和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。凡被本刊录用的稿件将同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务,并赠送当期杂志两册。