



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R783.1

U D C 616.31

密 级 公开

博士学位论文

三种常用牙科单体细胞毒性机理的实验研究

焦 阳

培 养 类 别 全日制

学 号 3022008007

学 位 类 型 专业学位

一级学科(专业类) 口腔医学

二级学科(专业) 口腔医学(口腔修复学)

研 究 方 向 牙科单体细胞毒性研究

指 导 教 师 陈吉华 教授(主任医师)

培 养 单 位 第四军医大学口腔医院修复科

二〇一六年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____日期：_____

保护知识产权声明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业离校后，发表论文等使用论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____导师签名：_____日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	5
英文摘要	10
前 言	16
文献回顾	17
正 文	33
第一部分、树脂单体引起细胞毒性的可能机理	33
实验一、树脂单体对细胞增殖及细胞内氧化还原平衡的影响	34
1 材料	34
2 方法	35
3 结果	43
4 讨论	46
实验二、内源性凋亡通路在树脂单体引起的细胞毒性中的作用	49
1 材料	49
2 方法	50
3 结果	54
4 讨论	57
实验三、树脂单体对线粒体结构和功能的影响	59
1 材料	59
2 方法	59
3 结果	62
4 讨论	64
第二部分、添加 NAC 对 PMMA 牙树脂生物相容性及机械性能的影响	66
实验四、添加 NAC 对 PMMA 牙科树脂生物相容性的影响	67
1 材料	67

2 方法	67
3 结果	69
4 讨论	71
实验五、添加 NAC 对 PMMA 牙科树脂机械性能的影响	73
1 材料	73
2 方法	73
3 结果	75
4 讨论	76
第三部分、Nrf2 信号通路在缓解牙科单体细胞毒性的作用研究	78
实验六、干预 Nrf2 信号通路对牙科单体的细胞毒性及氧化应激的影响	79
1 材料	79
2 方法	79
3 结果	80
4 讨论	82
实验七、上调 Nrf2 信号通路对牙科单体引起的内源性凋亡的影响	84
1 材料	84
2 方法	84
3 结果	87
4 讨论	89
小 结	91
参考文献	93
个人简历和研究成果	105
致 谢	108

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ARE	Antioxidant response element	抗氧化反应原件
ATR-FTIR	Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy	衰减全反射-傅立叶红外光谱仪
Bax	Bcl-2 Associated X Protein	Bcl-2 相关 X 蛋白
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 细胞淋巴瘤因子 2
Bis-GMA	bisphenol A diglycidyl methacrylate	双酚 A-二甲基丙烯酸缩水甘油酯
BPO	benzoyl peroxide	过氧化苯甲酰
caspase	cysteiny l aspartate specific proteinase	含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶
CAT	catalase	过氧化氢酶
CQ	camphoroquinone	樟脑醌
CTR	carboxyl-terminal region	C 端结构域
Cyto C	Cytochrome C	细胞色素 C
DMAEMA	N,N-Dimethylaminoethyl acrylate	N,N-二甲胺基甲基丙烯酸乙酯
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
ERK	extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
GCL	Glutamate cysteine ligase	谷氨酸半胱氨酸连接酶

GC/MS	gas chromatography/mass spectrometry	气相色谱/质谱
GPx	glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
GR	glutathione reductase	谷胱甘肽还原酶
GSH	glutathione	(还原型) 谷胱甘肽
GSSG	oxidized glutathione	氧化型谷胱甘肽
GST	glutathione S-transferase	谷胱甘肽 S-转移酶
HEMA	2-hydroxyethyl methacrylate	甲基丙烯酸-2-羟乙酯
hDPCs	human dental pulp cells	人牙髓细胞
HO-1	heme oxygenase-1	血红素氧合酶
HPLC	high performance liquid chromatography	高效液相色谱法
IL	interleukin	白介素
IR	infrared	红外
IVR	Intervening Region	干预区
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基末端激酶
Keapl	Kelch-like ECH-associated protein 1	Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1
LD50	50% lethal dose	半数致死浓度
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
MAPK	mitogen-activated protein kinases	促分裂素原活化蛋白激酶
MDA	malondialdehyde	丙二醛
MMA	methyl methacrylate	甲基丙烯酸甲酯
MMP	mitochondrial membrane potential	线粒体膜电位
NAC	N-acetyl-L-cysteine	N-乙酰半胱氨酸

Neh	double glycine repeat	双甘氨酸重复区
NQO1	quinone oxidoreductase 1	NAD(P)H:醌氧化还原酶 1
Nrf2	NF-E2-related factor 2	核因子 E2 相关转录因子 2
NTR	N-terminal region	N 端结构域
OD	Optical density	光密度
OS	oxidative stress	氧化应激
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PGE2	ProstinE2	前列腺素 E2
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PMMA	polymethyl methacrylate	聚甲基丙烯酸甲酯
RNS	reactive nitrogen species	活性氮
ROS	reactive oxygen species	活性氧
RT-PCR	real time PCR	实时荧光定量
SOD	superoxide dismutase	过氧化物歧化酶
tBHQ	tertiary butylhydroquinone	特丁基对苯二酚
TEGDMA	triethylene glycol dimethacrylate	双甲基两稀酸二缩三乙二醇酯
TEM	transmission electron microscope	透射电镜
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
UDMA	urethane dimethacrylate	氨基甲酸酯双甲基丙烯酸酯
UV	ultraviolet	紫外线
wt. %	weight percent	质量百分比

4-META	4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride	4-甲基丙烯酰乙氧基苯三酸酐
10-MDP	10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate	10-甲基丙烯酰氧癸基磷酸酯

三种常用牙科单体细胞毒性机理的实验研究

博士研究生：焦 阳

导 师：陈吉华 教授(主任医师)

辅 导 老 师：马 赛 讲师

第四军医大学口腔医院修复科，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金(81300927、81130078)

长江学者及创新团队发展计划(IRT13051)

中文摘要

1. 背景

树脂基材料是目前口腔临床工作中最常用、最重要的一类材料。临床最常见的树脂基牙科材料包括复合树脂、自凝及热凝树脂、树脂水门汀、核树脂、窝沟封闭剂、树脂类根管充填材料以及粘接剂等。然而，由于树脂材料聚合不完全以及其在口腔中的生物降解，树脂单体可以释放到口腔中，从而对相关组织产生损伤。已有许多学者证实，常用的牙科单体都具有细胞毒性，而单体诱导的细胞内氧化应激是其细胞毒性的重要机理之一。

树脂单体可以导致细胞内非酶类抗氧化剂谷胱甘肽的耗竭和活性氧的增多，同时影响细胞内抗氧化酶的活性，导致细胞发生氧化应激。过量的活性氧对细胞内重要的细胞器以及 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子造成氧化损伤，导致细胞周期阻滞、细胞凋亡和坏死。然而目前关于树脂单体导致细胞凋亡的机制并不清楚。因此，阐明树脂单体导致细胞凋亡的具体分子机制对于提高牙科树脂基材料的生物相容性、进一步改善其临床效果具有重要的意义。

Nrf2 (NF-E2-related factor 2) 信号通路是细胞针对氧化损伤的主要防御机制。

在正常条件下, Nrf2 被其胞浆伴侣蛋白 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 所抑制, 二者以结合的形式存在于细胞质中; 而当氧化应激时, Nrf2 与 Keap1 解偶联, 在多种蛋白激酶的磷酸化作用下, Nrf2 与 Keap1 解离, 转移到细胞核中, 与抗氧化反应元件 ARE (Antioxidant response element) 结合, 诱导下游的对氧化损伤具有保护作用的酶类发生转录和表达。这些酶类包括过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx)、血红素氧合酶 (heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H:醌氧化还原酶1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (glutamate cysteine ligase, GCL) 等, 他们可以催化 ROS 转变成其它物质, 从而缓解这些物质引起的细胞毒性作用从而缓解这些物质引起的细胞毒性作用。因此, 我们猜测 Nrf2 信号通路在保护细胞抵抗牙科树脂单体引起的氧化损伤中可能发挥重要作用。

2. 研究目的

2.1 以常用的树脂单体 HEMA、MMA 和 TEGDMA 为研究对象, 对它们的细胞毒性进行较为系统的评价和比较, 并在此基础上在细胞水平探索其细胞毒性的分子机制, 为提高其生物安全性提供理论及实验支持。

2.2 探讨在临床常用的 PMMA (Polymethyl methacrylate, PMMA) 自凝树脂中添加 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 对其生物相容性以及机械性能的影响。

2.3 分析 Nrf2 信号通路在正常细胞和暴露于树脂单体的细胞中的表达差异, 探讨人为干预 Nrf2 信号通路的表达后树脂单体毒性以及细胞抗氧化系统的变化。

3. 主要研究方法:

3.1 利用不同浓度的树脂单体处理人牙髓细胞 hDPCs, CCK-8 实验检测细胞增殖情况, 明确树脂单体对 hDPCs 的毒性作用。利用 NAC 与树脂单体共同处理细胞, 探讨 NAC 对树脂单体毒性的可能缓解作用。

3.2 利用相关试剂盒检测树脂单体处理后细胞内 ROS 和 MDA 水平以及非酶类抗氧化剂 GSH 含量和抗氧化酶 SOD、GPx 和 CAT 的活性, 同时我们利用氧化剂

NAC 与树脂单体共同处理 hDPCs, 从而研究 NAC 对单体毒性可能的缓解作用。

3.3 通过流式细胞术、免疫印迹实验和免疫荧光实验探索树脂单体对细胞内 Bcl-2、Bax、细胞色素C以及 Caspase-3 等内源性凋亡通路的相关分子的表达及分布的影响, 明确内源性凋亡通路在树脂单体引起的细胞死亡中的作用, 并研究能否通过添加 NAC 保护细胞, 减少或抑制细胞凋亡的发生。

3.4 通过酶联免疫标记仪、流式细胞术、酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 以及透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 检测树脂单体对线粒体结构和功能的影响, 并研究 NAC 对线粒体可能的保护作用。

3.5 制备含不同比例 NAC 的 PMMA 实验自凝树脂试件, 制取浸提液培养人牙髓细胞, 通过 CCK-8 细胞增殖实验和细胞粘附实验探讨 NAC 能否提高 PMMA 自凝树脂的生物相容性。

3.6 分别利用衰减全反射-傅立叶红外光谱仪、电子万能实验机、显微硬度仪、三维非接触式光学轮廓仪和扫描电镜检测添加 NAC 对 PMMA 自凝树脂机械性能的影响。

3.7 利用 Nrf2 信号通路的激活剂特丁基对苯二酚 (tertiary butylhydroquinone, tBHQ) 和 HEMA 共同处理细胞, CCK-8 实验检测细胞增殖情况, 随后检测细胞内 ROS 和 MDA 水平以及 GSH 含量和 SOD、GPx、CAT 的活性, 探索通过药物干预 Nrf2 信号通路的表达后单体毒性以及抗氧化系统的变化。

3.8 利用外源性药物认为上调 Nrf2 通路后, 检测细胞的凋亡坏死情况, 同时通过实时定量定量 PCR (RT-PCR)、酶联免疫标记仪、流式细胞术和 ELISA 检测 *NRF2*、*BCL-2*、*BAX* 和 *CASPASE-3* 细胞内源性凋亡通路相关基因的表达以及细胞色素 C、Caspase-3 的活性和线粒体膜电位的变化, 探索通过药物干预 Nrf2 信号通路的表达对树脂单体引起的细胞内源性凋亡的影响。

4. 结果:

4.1 CCK-8 实验结果显示, 树脂单体对细胞的增殖呈现浓度以及时间依赖性的抑制作用, 树脂单体的毒性大小与其化学结构有关。分别采用 1.0 mM HEMA, 5.0 mM MMA 和 1.0 mM TEGDMA 处理 24 h 是体外人牙髓细胞牙科单体细胞毒性模型的最佳条件。

4.2 与对照组相比, 暴露于树脂单体的细胞中 ROS、MDA 水平和 CAT 活性升高、SOD 和 GPx 活性及总 GSH 和 GSH 含量降低, 说明牙科单体可以引起细胞氧化应激。

4.3 与对照组相比, 暴露于树脂单体后, 活细胞的百分比减少而早期凋亡和晚期凋亡 / 坏死细胞的增加; 同时免疫印迹实验结果显示内源性凋亡通路中 Bcl-2 表达下调, 而 Bax, p53 和激活型 Caspase-3 的表达上调。免疫荧光双标实验结果显示, 树脂单体处理后 Bax 和细胞色素 C 的表达分别转移到线粒体和胞浆中。提示树脂单体激活了内源性凋亡通路。

4.4 透射电镜观察发现树脂单体处理后, 细胞出现核边聚, 核染色体固缩等细胞凋亡的标志, 线粒体内外膜和线粒体嵴结构的完整性被破坏。同时细胞内的 ATP 水平降低, 而线粒体膜电位丧失的细胞比例和胞浆中细胞色素 C 的含量显著增高, 说明树脂单体可引起线粒体结构和功能的破坏。

4.5 NAC 可以缓解树脂单体引起的氧化应激, 从而保护细胞, 降低树脂单体引起的毒性作用和内源性凋亡, 并一定程度上保护线粒体的结构和功能。

4.6 CCK-8 实验结果显示, PMMA 自凝树脂浸提液对细胞增殖具有显著的抑制作用, 添加 NAC 可显著降低 PMMA 自凝树脂的细胞毒性, 且该保护作用呈剂量依赖性。细胞粘附实验结果显示, 对照 PMMA 树脂组细胞生长不良, 呈圆形。而含 NAC 的实验 PMMA 树脂组, 细胞生长良好, 呈典型的长梭形或多角形。同时, 在 PMMA 树脂中加入 NAC 量越多, 粘附的细胞数目也越多。这说明添加 NAC 可以显著提高 PMMA 树脂的生物相容性。

4.7 添加 NAC 可以剂量依赖性地降低 PMMA 树脂的双键转化率、挠曲强度和表面硬度, 增加其表面粗糙度。同时, 对试件折断面的扫描电镜观察发现, 添加过多的 NAC 导致 PMMA 树脂中产生气泡, 从而影响其机械性能。将 NAC 的添加量限制在 0.15 wt.% 能够在不影响 PMMA 自凝树脂机械性能的前提下降低其毒性作用。

4.8 采用 Nrf2 信号通路的激活剂 tBHQ 与 HEMA 共同处理细胞可以显著减少 HEMA 引起的细胞死亡, 同时缓解细胞氧化应激。

4.9 上调 Nrf2 通路可抑制 HEMA 引起的细胞凋亡。RT-PCR 结果表明, Nrf2 信号通路的激活剂 tBHQ 提高了 *NRF2* 基因和具有抑制凋亡作用的 *BCL-2* 基因的表达, 同时降低了具有促进凋亡的 *BAX* 基因以及下游 *CASPASE-3* 基因的表达, 降低了 Caspase-3 的活性, 线粒体膜电位丧失细胞所占的百分比以及胞浆中细胞色素 C 的含

量，从而抑制细胞内源性凋亡的发生。

5. 结论：

5.1 树脂单体具有细胞毒性作用且其细胞毒性与氧化应激有关。树脂单体可以破坏细胞内的氧化还原平衡，导致线粒体的结构和功能损伤，进而激活细胞内源性凋亡通路，导致细胞凋亡的发生。

5.2 NAC 可以缓解树脂单体的细胞毒性，减轻氧化应激，减少内源性凋亡的发生并一定程度上保护线粒体的结构和功能。

5.3 添加 NAC 可以拮抗 PMMA 自凝树脂的细胞毒性。虽然加入过多的 NAC 会影响 PMMA 树脂的机械性能，但限制 NAC 的添加量在 0.15 wt.% 既可以提高树脂的生物相容性，同时又不显著影响其机械性能。

5.4 利用药物上调 Nrf2 信号通路可以降低 HEMA 的细胞毒性，缓解氧化应激并减少凋亡细胞。

综上所述，树脂单体可以打破细胞内的氧化还原平衡，进而激活内源性凋亡通路。添加 NAC 可缓解树脂单体及 PMMA 自凝树脂的细胞毒性。利用药物上调 Nrf2 信号通路可以拮抗树脂单体其细胞毒性。

关键词：树脂单体；细胞毒性；氧化应激；抗氧化剂；Nrf2信号通路

Exploration of Mechanisms underlying the Cytotoxicity of Three Common Dental Monomers

Candidate for Ph D: Yang Jiao

Supervisor: Prof. Ji-hua Chen

Advisor: Sai Ma

Department of Prosthodontics, School of Stomatology,

Fourth Military Medical University,

Xi'an, 710032, China

Sponsored Programs:

National Nature Science Foundation of China grant (No. 81300927 and 81130078)

Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (No. IRT13051)

Abstract

1. BACKGROUND:

Resin-based materials are widely used in clinical practice of restorative dentistry. Diverse resinous materials, such as composite resin, self-curing and heat-curing resin, resin cements, pit and fissure sealants, resinous root canal filling materials, dental adhesives (primer and bonding agents), are available for clinical applications. However, it has been found that unpolymerized resin monomers may leach out from resinous restorations due to the insufficient monomer-polymer conversion and biodegradation of resin materials by wear and enzymatic degradation. Leached dental monomers could cause adverse biological effects on adjacent oral tissues. Several principal dental monomers have been identified as cytotoxic molecules that can disrupt the intracellular redox balance and result in oxidative stress.

Prior reports have suggested that resin monomers could cause disturbances in

intracellular redox equilibrium due to induction of reactive oxygen species (ROS) and depletion of anti-oxidative glutathione (GSH). The overproduced ROS can attack important intracellular organelles and react with cellular macromolecules, such as lipids, proteins, and DNA, resulting in cell cycle arrest, cell apoptosis and necrosis. However, the exact and detailed mechanism underlying dental monomer-induced apoptosis is still largely unknown. In order to improve the biocompatibility of dental materials, it is of great significance to clarify the molecular mechanism underlying dental monomer-induced apoptosis.

The nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway plays a key role in the cellular defense system against oxidative stress. Under basal conditions, Nrf2 is kept transcriptionally inactive when bound to Keap1. When cells are exposed to oxidative stress, modification of cysteine residues in Keap1 induces Nrf2 dissociation from Keap1 and subsequent nucleus translocation. Consequently, Nrf2 accumulates in the nucleus, where it induces the expression of its antioxidant response element (ARE)-regulated phase II detoxifying and antioxidant enzymes, which include NADH quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutamyl-cysteine ligase (GCL), heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and Glutathione-S-transferase (GST). These enzymes could help enzymatically catalyze the activated forms of xenobiotics and transform them to larger, less active forms that can be excreted more easily, and therefore restore redox homeostasis. We hypothesized that Nrf2 signaling pathway may play an important role in protecting cells against oxidative damage induced by dental monomers.

2. AIM:

2.1. To evaluate and compare the cytotoxicity of three commonly used dental monomer HEMA, MMA and TEGDMA and to explore the molecular mechanisms underlying their cytotoxicity;

2.2. To investigate the influence of N-acetyl cysteine (NAC) on the cytotoxicity and mechanical properties of Poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin;

2.3. To analyze expression and functional changes expression and functional changes in human dental pulp cells (hDPCs) and hDPCs exposed to dental monomers, and to explore the changes of dental monomer cytotoxicity and intracellular antioxidant system after the intervened expression of Nrf2 signaling pathway.

3. METHODS

3.1. Firstly, hDPCs were treated with different concentrations of dental monomers, and the cell proliferation was detected by CCK-8 assay. Accordingly, the optimal concentrations were determined which would lead to a consistent and high degree of cytotoxicity.

3.2. Then, after 24 h treatment with optimal concentrations of dental monomers without or with NAC in hDPCs, the intracellular levels of ROS, malondialdehyde (MDA) and GSH content as well as SOD, GPx and CAT activities were determined with commercial assay kits.

3.3. Flow cytometry, western blot were performed to study the activity of Caspase 3, the expression pattern of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3 (cysteiny l aspartate specific proteinase 3) and p53 in hDPCs exposed to dental monomers without or with NAC. In addition, the expression of Bax and Cytochrome C (Cyto C) and their distribution position have been studied by laser confocal scanning microscopy.

3.4. Next, the morphologies and functions of mitochondria were studied with transmission electron microscope (TEM) and commercial assay kits in hDPCs treated with dental monomers without or with NAC.

3.5. Experimental PMMA resin was prepared by incorporating various concentrations of NAC (0, 0.15, 0.3, 0.6 and 0.9 wt.%). CCK-8 assay was performed to investigate viability of human dental pulp cells after exposure to extract of PMMA resin with or without NAC. Cell adhesion on resin specimens was examined with scanning electron microscopy.

3.6. Degree of conversion of experimental PMMA resin with various concentrations of NAC was studied with attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). Flexural strength, microhardness and surface roughness were evaluated using a universal testing machine, microhardness tester and optical profilometer,

respectively.

3.7. The apoptosis and necrosis of the treated cells were detected by flow cytometry, and the intracellular levels of ROS, MDA and GSH content as well as SOD, GPx and CAT activities were determined with commercial assay kits in hDPCs exposed to dental monomers without or with Nrf2 activator tBHQ.

3.8. After co-treatment of hDPCs with dental monomers and Nrf2 activator tBHQ, the expression of three main downstream genes (*BCL-2*, *BAX* and *CASPASE-3*) of Nrf2 pathway was determined by real-time PCR (RT-PCR). The cytosolic Cyto C was quantified with an ELISA kit. The activity of Caspase-3 and disruption of mitochondrial membrane potential (MMP) were analyzed using commercial assay kits.

4. RESULTS

4.1. The CCK-8 assay results revealed that treatment of hDPCs with dental monomers for 24 h decreased cell viability in a dose-dependent and time-dependent manner. Compared with the control group, groups that were treated with HEMA (≥ 1 mM), MMA (≥ 5 mM), or TEGDMA (≥ 1 mM) exhibited significantly lower cell viability. In subsequent experiments to investigate influences of dental monomers on intracellular redox balance and apoptosis, hDPCs were treated with dental monomers at the lowest concentrations that can induce significant difference on cell viability.

4.2. Compared with the control group, the intracellular ROS and MDA levels as well as CAT activity were increased in hDPCs after treatment with dental monomers, whereas SOD and GPx activities as well as total GSH and GSH contents were decreased, indicating that dental monomers caused intracellular oxidative stress.

4.3. According to the results of Annexin V/PI staining, a dose-dependent decrease in the percentage of viable cells was observed in hDPCs exposed to dental monomers. Dental monomers dose-dependently increased the percentage of cells in early apoptosis as well as in late apoptosis/necrosis. Western blot analysis revealed that in the presence of dental monomers, the expression of Bcl-2 was down-regulated, while the expression of Bax, p53 and cleaved Caspase-3 were up-regulated. Immunofluorescence analysis revealed that Bax

translocated to mitochondria after dental monomer treatment, while Cyto C redistributed diffusely in the cytoplasm.

4.4. The transmission electron microscope observation showed that after monomer treatment, some cells showed nuclear and cytoplasmic signs of apoptosis, including condensed/peripheralized nuclear chromatin and/or cytoplasm, cytoplasmic vacuolization. In addition, the mitochondria became larger and elongated with less number of cristae or deformed cristae as well as altered integrity of mitochondrial membrane (inner and outer membranes).

4.5. The antioxidant NAC could alleviate dental monomer-induced oxidative stress and thus protected the cells from intrinsic apoptosis and their destructive effects on the structures and functions of mitochondria.

4.6. CCK-8 assay revealed that incorporation of NAC into PMMA resin reduced its cytotoxicity in a concentration-dependent manner. Scanning electron microscope showed that NAC could enhance cell adhesion on the surface of PMMA resin specimens. These results indicated that NAC could improve the biocompatibility of PMMA resin.

4.7. NAC induced negative influences on the mechanical and physical properties of PMMA resin in a dose-dependent manner. Scanning electron microscope showed that the addition of NAC produced internal defects in PMMA resin specimens. However, when the concentration of NAC added to PMMA resin was limited to 0.15 wt%, it could enhance cell viability without posing significant negative influences on the mechanical properties of the carrying PMMA resin.

4.8. The presence of tBHQ in dental monomer-treated cell cultures significantly raised the percentage of viable cells, and alleviated HEMA-induced oxidative stress.

4.9. Up regulation of Nrf2 pathway using tBHQ could reduce the percent of apoptotic cells. Real-time PCR results showed that the presence of tBHQ in dental monomer-treated cell cultures caused higher expression of *NRF2* and *BCL-2* whereas lower expression of *BAX* and *CASPASE-3*. In addition, tBHQ reduced Caspase-3 activity and reversed dental monomer-induced disruption of MMP as well as the increased cytosolic Cyto C level.

5. CONCLUSIONS

5.1. Dental monomers caused disturbance of intracellular redox balance, which is characterized by depletion of GSH, over-production of ROS, and differential changes of anti-oxidative enzymes. The oxidative stress subsequently impaired mitochondria structures and functions, and eventually initiated the intrinsic apoptosis pathway.

5.2. NAC remarkably relieved dental monomer- induced oxidative stress and subsequently protected the cells against apoptosis.

5.3. The incorporation of NAC reduced the cytotoxicity of dental PMMA resin. Although adding too much NAC to PMMA resin resulted in compromised DC, flexural strength, microhardness and surface roughness, limiting the concentration of NAC within 0.15 wt.% remarkably improved biocompatibility of PMMA resin without exerting significant negative influence on mechanical properties.

5.4. Nrf2 pathway is involved in the cytotoxic process of dental monomers. The up-regulation of Nrf2 signaling pathway could inhibit dental monomer-induced oxidative stress and intrinsic apoptosis, on the other hand, down-regulation of Nrf2 pathway could exacerbate dental monomer-induced cytotoxicity and oxidative stress.

In conclusion, our work laid the foundation for the further understanding of the mechanisms underlying dental monomer-induced cytotoxicity. Meanwhile, The results of our study not only enriches and improves the oxidative stress pathogenesis in dental monomer-induced cytotoxicity, but also provides a promising strategy to improve the biocompatibility of resin-based dental materials.

Key words: dental monomers; oxidative stress; cytotoxicity; antioxidant; Nrf2 signaling pathway

前 言

树脂基材料是目前口腔临床工作中最常用、最重要的一类材料。然而，由于树脂基材料聚合不完全以及其在口腔中的生物降解，使树脂单体释放到口腔中，从而对口腔中的相关组织产生不利影响。已有许多学者证实，常用的牙科树脂单体都具有细胞毒性，而单体诱导的细胞内氧化应激是其细胞毒性的重要机理之一。

树脂单体可以导致细胞内非酶类抗氧化剂谷胱甘肽的耗竭和活性氧的增多，同时影响细胞内抗氧化酶的活性，导致细胞发生氧化应激。过量的活性氧对细胞内重要的细胞器以及 DNA，蛋白质和脂质等生物大分子造成氧化损伤，导致细胞凋亡和坏死。然而目前关于树脂单体导致细胞凋亡的机制并不清楚。

Nrf2 信号通路是细胞对抗过氧化损伤的主要防御机制。细胞的氧化应激可激活该通路，使 Nrf2 与胞浆伴侣蛋白 Keap1 解偶联，在多种蛋白激酶的磷酸化作用下，Nrf2 进入细胞核中与抗氧化反应元件 ARE 的 DNA 序列结合，诱导下游的抗氧化酶转录和表达，发挥强大的抗氧化作用，促进对细胞内的 ROS 灭活，恢复体内氧化-抗氧化平衡，缓解这些物质引起的细胞毒性作用。

本课题首先以常用的牙科单体 HEMA、MMA 和 TEGDMA 为研究对象，对它们的细胞毒性进行较为系统的评价和比较，在细胞水平探索其细胞毒性的分子机制，并在此基础上探究降低其细胞毒性的可能途径，为提高牙科树脂材料的生物相容性提供新的理论及实验依据。

文献回顾

1 树脂基牙科材料

树脂基材料是目前口腔临床工作中最常用、最重要的一类材料^[1,2]。单就复合树脂而言，自上世纪 60 年代被首次引入牙科修复领域（图1），其因具有优良的美学性能，良好的物理化学性能和方便的临床操作等特点而被广泛地被应用于窝洞的直接充填^[3,4]。

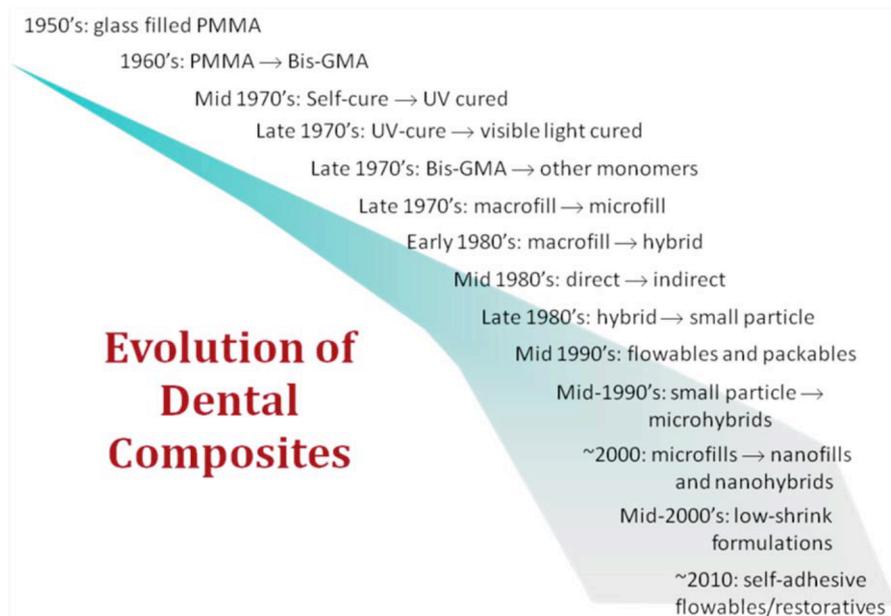


图1 树脂基牙科修复材料的演变^[3]

目前临床常用的树脂基牙科材料除了用于直接充填治疗的复合树脂外，还包括自凝及热凝树脂、树脂水门汀、核树脂、窝沟封闭剂、树脂类根管充填材料以及粘接剂等。上述这些树脂基材料的组成都类似，都包括：可聚合的有机树脂基质，有机或无机增强填料，引发体系、偶联剂和其他成分^[5]。

1.1 树脂基牙科材料的组成

1.1.1 复合树脂的基本组成

1.1.1.1 有机树脂基质

有机树脂基质是复合树脂的主体成分。目前绝大多数的商业用树脂基牙科修复材料的有机树脂基质多由两部分组成。一部分是做为主体的一类高黏度的甲基丙烯酸酯类树脂单体,包括氨基甲酸酯双甲基丙烯酸酯(urethane dimethacrylate, UDMA)、双酚A-二甲基丙烯酸缩水甘油酯(bisphenol A diglycidyl methacrylate, Bis-GMA)等。这些单体结构中含有两个或两个以上的甲基丙烯酸酯官能团,可用于交联聚合。其中,UDMA 的聚合收缩度及黏稠度较 Bis-GMA 略低。除上述交联单体外,复树脂基质中还包含一类是低黏度的稀释性单体,如双甲基两稀酸二缩三乙二醇酯(triethylene glycol dimethacrylate, TEGDMA)等。而 Bis-GMA 的聚合收缩度相对较小,但由于其分子较长,同时含有苯环结构,因此它较为黏稠,不利于填料的加入^[6, 7](图2)。而这些稀释性单体分子较小,相对稀薄,可以有效降低有机树脂基质的黏度,从而提高填料的添加量,但其具有聚合收缩大的缺点,因此必须与 Bis-GMA 等交联单体配合使用^[8]。

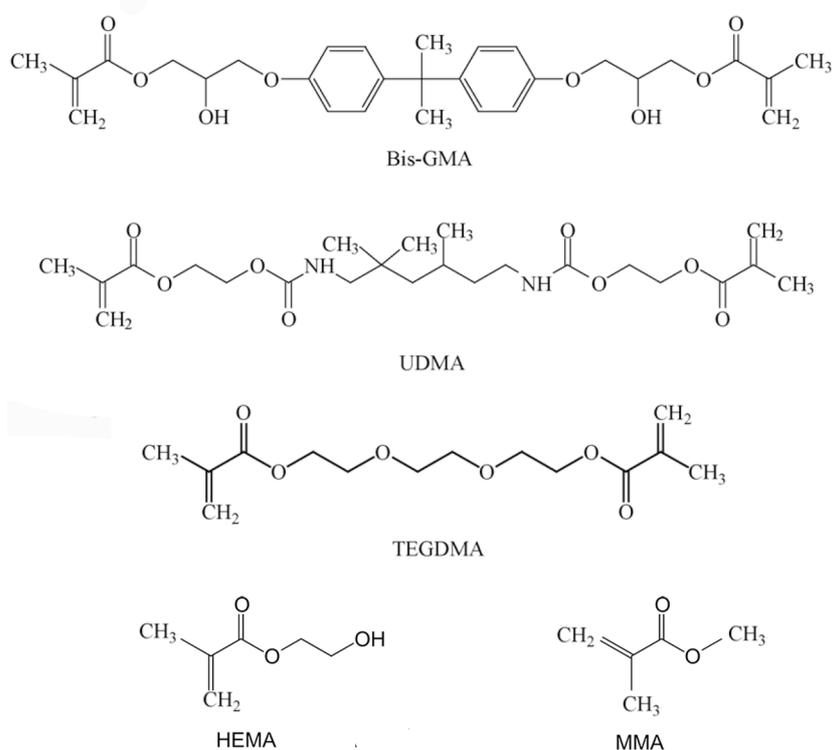


图2 常用的甲基丙烯酸酯类树脂单体

在这一树脂基质体系中，Bis-GMA 和 UDMA 是发生交联的主要单体，而 TEGDMA 作为稀释单体，一方面可以有效降低有机树脂基质的黏度，另一方面可以提高填料的添加量^[9-12]。有学者发现，Bis-GMA 和 UDMA 的转化率与 TEGDMA 的添加比例呈正相关。但是当 TEGDMA 的添加比例过大时，就会导致聚合后的树脂发生较大的聚合收缩。这主要是由于 TEGDMA 是分子量较小的柔性小分子，其过多存在于树脂体系，使树脂的硬度和弹性模量都降低。而随着 TEGDMA 的添加比例的降低，树脂基质会变得黏稠，转化率也会随之降低，从而影响空间三维结构的形成，单体的释出也会随之增加。因此，在树脂基质体系中，添加合适比例的稀释单体对于树脂的机械性能有十分重要的意义。通常控制添加的 TEGDMA 的摩尔比例在 37.5-62.5% 的范围内，对树脂的性能不会造成较大影响^[13]。

1.1.1.2 增强填料

固化后的树脂基质强度较低，而添加增强填料可以显著改善其机械性能^[2]。常见的复合树脂中填料的比​​例一般介于 70-85 wt.%。填料的组成一般包括石英颗粒、硼硅酸盐、玻璃粉、陶瓷粉以及高度分散的无定型二氧化硅。另外，某些含有钡、锶、锌等金属元素的填料还可以赋予复合树脂 X 射线阻射等性能，方便临床观察修复体充填的情况^[14]。

增强填料对复合材料的各方面性能影响较大。一般说来，填料量与复合材料的机械强度呈正相关。填料量一方面与其硅烷化处理有关，另一方面也与其粒度的大小以及其在树脂材料中的分布有关。目前常用复合树脂材料中填料的粒径介于 0.04 μm （超微颗粒填料）到 0.6-3.0 μm （大颗粒填料）之间^[15]。早期的填料主要是大颗粒型的石英，为了降低填料的表面粗糙度，而改用更容易抛光的超微二氧化硅颗粒。但超微二氧化硅颗粒的表面积较大，不利于填料的添加，因此添加量较少。为了改善填料自身的物理性能，提高增强填料的添加量，又产生了混合型复合树脂。而近年来，人们开始尝试将纳米颗粒作为增强填料来改善复合树脂的性能，目前粒径介于 5-100 nm 的纳米填料已经开始被用于复合树脂中^[15]。研究表明，纳米填料的应用一方面可以通过减少复合树脂的聚合收缩，降低微渗漏和继发龋发生的概率，另一方面可以显著改善复合树脂的物理机械性能，提高其耐磨性^[16]。

1.1.1.3 引发体系

复合树脂充填材料通常为光固化引发体系，由光引发剂和促进剂组成^[17]。其中，

樟脑醌 (camphoroquinone, CQ) 是目前最常用的光引发剂^[18]。其在 440-500 nm 的蓝光以及促进剂如 N,N-二甲氨基甲基丙烯酸乙酯 (N,N-Dimethylaminoethyl acrylate, DMAEMA) 的作用下, 发生分解产生活性自由基引发树脂基质单体聚合。除光固化引发体系外, 树脂水门汀等双固化材料通常还含有化学固化引发体系, 由化学引发剂和促进剂构成。常用的化学引发剂包括过氧化苯甲酰 (benzoyl peroxide, BPO), 促进剂有芳香叔胺等。当分别含有二者的双组份复合树脂混合后, 发生化学反应引发树脂基质单体聚合。

1.1.1.4 偶联剂

树脂基质与无机填料之间需要通过硅烷偶联剂进行联接。硅烷偶联剂通常含有硅-巯基团和甲基丙烯酰基团, 其中硅-巯基团能够与无机填料的表面发生结合, 而其甲基丙烯酰基团则能与树脂基质发生交联反应。不同组分的填料需要不同的硅烷偶联剂以实现与树脂基质的化学结合^[19, 20]。

1.1.1.5 其他成分

复合树脂中的其他成分包括为了匹配天然牙颜色的着色剂和遮色剂, 防止复合树脂自发反应的阻聚剂等^[21]。

1.1.2 粘接剂的主要组成

与复合树脂类似, 粘接剂中最重要的成分为树脂基质。其中 HEMA、TEGDMA 等小分子亲水性单体可渗透入脱矿的牙本质胶原网中, 改善牙本质的润湿性, 进而促进 BisGMA 及 UDMA 等大分子量的疏水性单体渗透进入牙本质胶原网中, 并与之形成相互缠绕的、有一定机械强度的混合层^[22]。除了上述与复合树脂中类似的单体外, 自酸蚀粘接剂中还可能含有一类特殊的、弱酸性的功能单体, 例如10-甲基丙烯酰氧癸基磷酸酯 (10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate, 10-MDP) 及4-甲基丙烯酰乙氧基苯三酸酐 (4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride, 4-META) ^[23]。这类单体对牙体硬组织具有酸蚀作用, 能够在不去除玷污层的条件下与其共同形成混合层, 提供物理嵌合作用。另外, 10-MDP 及 4-META 等功能单体还能够与羟基磷灰石中的钙发生化学反应, 进而为自酸蚀粘接剂提供化学粘接。与复合树脂相比, 粘接剂中还含有一类特殊的成分, 那就是溶剂。最常见的溶剂有水、乙醇和丙酮, 它们可以降低粘接剂的黏稠度, 提高其亲水性, 进而促进粘接剂在脱矿牙本质中的

渗透。通常，粘接剂中是不含填料的，但是，也有个别厂商为了提高粘接剂的机械强度或赋予其一定的释氟性能而在其中添加填料。与复合树脂不同，粘接剂中的填料一般都是纳米级别的，且添加量有限，否则会导致粘接剂过于粘稠并影响粘接剂对脱矿牙本质胶原网及牙本质小管的渗透。

1.1.3 其它树脂基牙科材料

自凝及热凝树脂、树脂水门汀、核树脂、窝沟封闭剂等其他树脂基牙科材料的基本组成均与复合树脂类似，其主要树脂基质成分、填料含量及引发体系因材料的用途而不同。

1.2 树脂基材料的降解及单体的释放

牙科树脂基材料是由聚合物的网状结构组成的，这种结构容易吸水。这种吸水效应不但影响修复体的物理机械性能，也会导致树脂基材料的降解以及其中未聚合单体的释放。树脂单体的自由基聚合可以产生一个高度交联的聚合物网络，但也会产生未反应的单体和低聚物。在实际情况下，单体的聚合度并不能达到 100%。比如，对于大多数树脂基材料，利用卤光灯或 LED 灯光直接照射固化后其聚合度在 55% 到 75% 之间，而在实验室条件下，利用各种高强度的光，热等条件，可使聚合度达到 80%。而如果在材料聚合的过程中，过多的氧气接触到树脂表面形成氧气层，其聚合度只能达到在 25-35%。较低的转化率会导致大量的残余单体释放到口腔中。学者们采用了紫外线 (Ultraviolet, UV) 和红外 (Infrared, IR) 辐射、气相色谱/质谱 (gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 等技术对残余单体进行了定性与定量分析。研究结果表明树脂基牙科材料可以释放出 30 多种物质^[24]。这些物质包括单体，添加剂，聚合反应体系的化合物（共引发剂，稳定剂或抑制剂），以及填料颗粒中释放的离子。其中，未聚合的单体成分，包括 TEGDMA、Bis-GMA 和 HEMA 的释放量最多。有文献证实，自凝树脂和热凝树脂可以在人唾液中释放未固化的 MMA 单体^[25]，而含有酯酶的人工唾液可以加速树脂材料的降解^[26]。Baker 等人对复合树脂的定量的分析了显示约有占整个修复体 0.05 wt.% 到 2.0 wt.% 的残余单体渗出到水溶液中。其中，亲水性单体如 TEGDMA 的渗出量最多，其质量分数达到 0.04-2.3%，而

Bis-GMA 的质量分数达为 0.03-0.07%^[24]。与复合树脂类似，牙本质粘接材料的老化过程中也伴随有单体的释放，研究发现 HEMA 的释放浓度可以达到 1.5-8 mmol/L，而 TEGDMA 的浓度可以达到 4 mmol/L^[27, 28]。各种树脂基材料所释放的单体一方面可能随唾液到达口腔环境中，另一方面也可能通过牙本质小管渗透到深部牙本质，甚至牙髓腔中。已有研究表明，毫摩数量级的亲水性单体 HEMA 和 TEGDMA 可以通过牙本质小管渗透到牙髓腔，而当牙本质的厚度降低或牙本质经酸蚀脱矿后，渗透到牙髓腔中的单体量会进一步增加^[27, 28]。这些高浓度的单体足以对牙髓的健康造成不利影响。

树脂材料中未聚合单体的渗出通常在聚合后的几小时或几天内完成，其释放受到许多因素的影响，包括复合材料的化学性质（主要是单体的溶解度和分子量）、聚合物网络的交联度、填料颗粒的表面处理以及溶剂的性质等。在临床环境下，树脂修复体暴露在一个十分复杂的环境中。口腔中各种复杂的环境因素，如唾液、咀嚼、热学、化学、饮食习惯、微生物因素等，会加速树脂修复体发生降解，使单体释放到口腔中^[27, 28]。

1.3 引起树脂基牙科材料降解的因素

1.3.1 唾液因素

水是唾液中最丰富的成分，是引起树脂基牙科材料降解的主要因素之一。树脂修复体一种极性材料，易于从口腔环境中吸收水分。水分子可以轻易地穿透树脂基材料的高分子网状结构，使未聚合的树脂单体和各种填料从材料中扩散出来。有学者证实，水扩散的过程遵循 Fickian 扩散动力学^[29]。因此，通常在修复后 1-2 个月内，树脂基材料达到吸水饱和的状态。有学者还认为树脂材料在吸水的同时，一部分水分还会从材料中释放出来，这种反复的循环导致微裂纹的形成，加速聚合物降解以及残余单体的释放^[30]。此外，在唾液中发生的水解和酶促反应也是树脂高分子结构生物降解的主要原因^[31]。唾液酶可以通过攻击高分子网状结构的侧链，从而促进网状结构降解，而发生降解的主要产物是各种单体。有研究证实，唾液中的多种酶类都会参与到这一过程中。这些酶解反应会显著减低树脂基材料的表面硬度和耐磨性。此外，口腔中的微生物也会与树脂基材料发生反应。Willershausen 等人发现，在体外环境下细菌可以定植在牙科树脂材料的表面，使材料的表面粗糙度增加，这

些结果表明在微生物的作用下，修复体的表面发生了降解^[32]。

1.3.2 咀嚼因素

在口腔内，材料的疲劳可以导致生物降解。持续的机械和环境负荷会导致树脂材料的逐步退化以及裂纹产生和扩展，最终导致了树脂破坏。而材料加工过程中产生的气泡可以进一步加速这一过程。此外，咀嚼力也可以导致在咀嚼面的修复体发生磨损。Graham 等人发现树脂材料在临床条件下会比体外条件下释放更多的单体^[33]。

1.3.3 热学和化学因素

日常饮食会引起口腔内的温度变化。由于修复材料内部各部分的聚合度并不完全相同使其在温度变化的过程中，形变量也不同，这导致了材料内部微裂纹的产生^[34]。此外，由于修复材料和牙体组织的热膨胀系数也不同，口腔内的温度变化导致修复体和牙体组织的粘接界面产生裂痕，增加了修复体从牙体组织上脱落的几率^[35]。

2 树脂基材料的生物相容性

2.1 树脂基材料的系统毒性

急性系统毒性通常用半数致死浓度（50% lethal dose, LD50）来反映，即被检测化学物质引起半数实验动物死亡的浓度。大量研究表明，树脂基材料中最主要的成分-树脂单体-的 LD50 均大于 2000 mg/kg 体重，因此不能被归于“毒性物质”^[36]。考虑到实际上从树脂基材料中释放出的单体浓度一般较小，因此目前认为树脂单体及树脂基材料不会引起急性系统毒性。

2.2 树脂基材料引起的过敏反应

树脂基材料中的单体、引发剂、阻聚剂等多种成分都可能引起过敏反应。有患者在牙科树脂材料修复后出现口腔疼痛、烧灼感，累及部位包括腭、舌、口腔黏膜和咽部。一项纳入 16000 名患者的研究发现，MMA 是最易引起过敏反应的牙科材料成分，而 HEMA 及 TEGDMA 等也被归为“有高度致敏风险”的成分^[37-39]。对于

牙科医师而言,也有约 2% 的医师对树脂及材料过敏。一项瑞典的研究发现,约 2% 牙科医师在用手直接接触复合树脂或粘接剂后产生湿疹^[40]。另外,近年一项对 1632 名牙科医师及患者的研究发现 2.3% 的患者及 5.8% 的医师对甲基丙烯酸酯类树脂单体产生了阳性反应^[39]。

2.3 树脂基材料引起的局部反应

研究表明,树脂基材料具有一定的细胞毒性作用^[41]。固化后的复合树脂细胞毒性较小,然而未固化或刚刚固化的复合树脂则具有较强的细胞毒性作用^[41]。除此以外,与机械去除表面氧阻聚层复合树脂试件相比,未去除阻聚层的实验组细胞毒性作用更强^[42]。另外,复合树脂的细胞毒性作用还与材料的聚合度有关,光照试件短、聚合度低的材料较光照时间长、聚合度高者细胞毒性更为显著^[43]。填料的含量也对复合树脂的细胞毒性有影响,填料比例低的流动树脂的细胞毒性要高于成分类似的填料比例较高的常规复合树脂^[44]。与复合树脂类似,粘接剂也有细胞毒性。不同的商品粘接剂对多种检测细胞都表现出细胞毒性作用^[43, 44]。牙本质能够一定程度上阻挡粘接剂中毒害物质的渗透,但是当牙本质厚度较低时,HEMA、TEGDMA 等小分子、亲水性成分可在数分钟内穿透剩余牙本质,进而引起牙髓反应^[44]。

树脂基材料引起的牙髓反应与剩余牙本质的厚度密切相关。对于较浅或中等的龋洞,复合树脂和粘接剂一般不会引起牙髓反应。对于较深的龋洞,剩余牙本质厚度小,复合树脂及粘接剂可引起牙髓的炎症反应。关于复合树脂能否用于直接盖髓,目前的研究略有争议。一些学者对灵长类动物的研究发现,在穿髓模型中用粘接剂及复合树脂进行直接盖髓不会或仅引起轻度的炎症反应,在无细菌感染的情况下也不影响牙本质桥的形成。然而,一些对犬、羊和大鼠的研究却发现使用树脂基材料直接盖髓会引起轻到中度牙髓炎症反应,并阻碍牙本质桥的形成^[43]。大多数以人为研究对象的结果也发现树脂基材料直接盖髓会引起牙髓炎症反应并阻碍牙本质桥的形成^[44]。虽然目前仍没有关于树脂基材料用于直接盖髓的长期临床实验结果,但是基于大部分研究结果,大部分厂家不推荐将树脂基材料用于直接盖髓。

2.4 树脂单体的细胞毒性

树脂修复体中释放的残余单体可以对口腔中的组织产生不利影响,这主要是由

于牙科单体的细胞毒性。已有许多学者利用多种细胞模型，包括 L929 成纤维细胞，成骨细胞，牙龈成纤维细胞、牙髓、牙周膜和上皮细胞等，研究了树脂单体的细胞毒性。研究发现，同一细胞对不同单体的敏感性不同。这主要是由于单体的化学结构不同。一般来说，单体的疏水性越强，聚合基团越多，细胞毒性越大。此外，不同细胞对同一种单体的敏感性不同^[45, 46]。例如，小鼠来源的细胞对牙科单体的敏感性低于人来源的细胞。尽管这些测试的条件不尽相同，但所有的细胞毒性测试都证实了树脂单体的细胞毒性。多种细胞体外实验的结果证实树脂单体可以特异性地干扰细胞的多种重要功能^[45, 46]。例如，有研究发现 TEGDMA 和 HEMA 可以影响细胞的固有免疫应答，下调脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导的巨噬细胞细胞因子的产生，抑制 CD14 分子等表面抗原的表达^[47]。树脂单体还能够抑制牙髓干细胞的成牙本质功能，影响牙本质的修复和恒牙的发育^[48]。此外，低浓度的 TEGDMA 和 MMA 可以抑制成骨细胞的增殖、成骨分化及矿化功能^[49]。另外，树脂单体还可以引起 DNA 分子的单链和双链断裂，通过相关蛋白激活细胞周期检查点引起细胞周期的阻滞^[50]。

目前 TEGDMA 是在树脂单体生物相容性方面被研究最广泛的树脂单体，这主要是由于渗出的残余单体大部分是 TEGDMA^[51, 52]。TEGDMA 是目前树脂基牙科修复材料中最常用的稀释单体；而且在牙科粘接材料中，TEGDMA 的比例达到 25-50%^[53]。由于其亲脂性，TEGDMA 可以轻易穿透细胞膜进入细胞中^[54]。TEGDMA 可以对多种细胞产生时间依赖性和浓度依赖性的细胞毒性作用，其毒性浓度范围是 0.5-5 mM^[55]。此外，有文献报道，TEGDMA 在体内的代谢产物也可以引起类似的细胞毒性作用^[56]。在低浓度 TEGDMA 可以诱导细胞凋亡（程序性细胞死亡），而在高浓度其细胞毒性以坏死为主^[57]。最新研究证据提示，TEGDMA 还具有引起遗传毒性，且能够干扰细胞的固有免疫应答^[58]。

HEMA 的生物相容性也已被广泛的研究。HEMA 是牙科粘接材料最常见的成分，其含量约占 30-55%。由于其高亲水性，HEMA 可以渗透到牙本质有机基质胶原网络包裹胶原纤维，从而有利于粘接材料的渗透，防止牙本质胶原的降解^[59]。此外，由于 HEMA 具有低分子量和亲水性，它可以扩散穿透剩余牙本质，影响成牙本质细胞活力^[60]。根据 Spagnuolo 等人的研究，从牙科粘接材料中渗出的 HEMA 的浓度可以达到 1.5-8 mmol/L^[61]。与其它双聚合基团的单体相比，HEMA 的细胞毒

性较弱^[62]。根据细胞系的不同和细胞来源的不同，HEMA 的 LC50 在 3.6-10 mmol/L^[55]。近年的研究结果提示，HEMA 能够引起 DNA 单链和双链的破坏^[63]，导致遗传毒性，并能够引起多种细胞发生凋亡。动物实验还发现，低浓度的 HEMA 的长期作用会引起牙髓组织的炎症反应，干扰牙髓成纤维细胞正常分化为成牙本质细胞的过程，影响牙髓组织的稳态和修复^[48]。

在复合树脂中，芳香族树脂单体 Bis-GMA 或 UDMA 的含量可高达 70-75%。因此其细胞毒性也是许多学者关注的重点。尽管这类单体的疏水性限制了它们释放到水环境中发挥毒性作用，但是研究表明，与 HEMA 及 TEGDMA 等仅含一个甲基丙烯酰基团的单体相比，含有两个甲基丙烯酰基团的 Bis-GMA 和 UDMA 对各种细胞的半数致死浓度更低。当 BisGMA 的浓度大于 0.001 mM 而 UDMA 浓度大于 0.05 mM 时，其就会对多种细胞产生时间依赖性和浓度依赖性的细胞毒性作用^[64, 65]。

2.5 树脂单体引起细胞毒性的可能机制

树脂单体作为应激因素可以干扰了细胞内正常的生命活动和信号转导途径。详细了解细胞对于单体的特异性应答机制有助于预测牙科治疗相关的后果和开发具有更好生物相容性的牙科材料。因此，研究各种牙科单体引起细胞毒性作用的机理，并以此为依据寻找缓解牙科单体细胞毒性的策略成为近年来口腔材料领域研究的热点之一。围绕这一问题，许多学者进行了大量的体外细胞学和动物体内研究。目前的研究结果表明，树脂单体诱导的细胞内氧化应激（oxidative stress, OS）是其细胞毒性的重要机理之一^[66, 67]。

2.5.1 细胞内的氧化还原平衡

在生物的代谢过程中，会产生超氧阴离子自由基、羟自由基和过氧化氢等一系列的活性氧（ROS）^[68]。为了抵抗 ROS 对细胞以及组织的损伤，生物发展了完善的抗氧化防御系统^[68, 69]。通过生物的代谢作用，可以将细胞内过量的将 ROS 转变活性较低的物质，从而保护细胞避免受到伤害^[68]。正常情况下，防御系统能够维持细胞内的氧化-还原系统处于一种动态平衡状态。然而，当活性氧大量产生，超越防御系统的保护能力时，或者当过氧化防御系统被破坏，不能发挥正常的保护作用时，

细胞内的氧化还原平衡就会被打破，进而对细胞的正常功能造成不利影响。

2.5.2 抗氧化防御系统的组成

抗氧化防御系统包括非酶类抗氧化剂和抗氧化酶两大组成部分^[70, 71]。

2.5.2.1 非酶类抗氧化剂

谷胱甘肽（glutathione, GSH）是抗氧化防御系统最主要的非酶类抗氧化剂，它广泛分布于机体各器官内，在维持细胞内氧化-还原平衡中起重要作用。GSH 是一种含 γ -酰胺键和巯基的三肽，由半胱氨酸、谷氨酸以及甘氨酸组成^[67, 72]。其组成中的半胱氨酸含有巯基 -SH，能够与 ROS 发生氧化脱氢反应，进而消除 ROS。此外，GSH 还可以作为谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）的底物，将过氧化氢还原成水，同时其自身转变成为氧化型谷胱甘肽（GSSG）。此后，GSSG 在谷胱甘肽还原酶（glutathione reductase, GR）的作用下，再次转变为 GSH，从而使体内 ROS 的清除反应能够持续进行。在正常的氧化-还原平衡中 GSH 和 GSSG 的比例保持在 100: 1^[73]。

除 GSH 外，细胞内的 α -硫辛酸、维生素C、维生素D、维生素E、类胡萝卜素、微量元素硒、铜、锌等小分子物质也是细胞内重要的非酶类抗氧化剂。此外，近年来有学者发现细胞内存在着一类小分子多肽，它们具有强大氧自由基清除能力，并将其命名为“第三类抗氧化系统”^[74]。

2.5.2.2 抗氧化酶

除了非酶抗氧化剂，细胞内的抗氧化酶通过代谢特定的 ROS 可以直接参与到细胞的氧化还原稳态。在 ROS 的第一步代谢中，超氧化物歧化酶（SOD）能催化超氧化物阴离子发生歧化作用，生成过氧化氢和氧气^[75]，在抵御氧自由基导致的细胞损伤中起关键作用。此后，过氧化氢酶（CAT）和谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）等抗氧化酶可以通过催化过氧化氢产生水和氧气来消除过量的 ROS^[76]。此外，GPx 可以催化 GSH 产生 GSSG，从而保持细胞内 GSH 和 GSSG 的比例^[77]。这些酶类通过不同的方式来发挥清除 ROS 的作用，从而维持细胞内氧化-还原的平衡，保护细胞免受氧自由基的攻击。

2.5.3 氧化应激

氧化应激是指机体内氧化作用与抗氧化作用失去平衡，导致 ROS 和活性氮（Reactive nitrogen species, RNS）在细胞内发生过量积聚，从而引起机体内的应激反应^[78]。过量的 ROS 可对细胞内重要的细胞器以及 DNA，蛋白质和脂质等生物大分子造成氧化损伤。有文献报道，ROS 的作用与其浓度有关，纳摩尔水平的 ROS 可以促进细胞增殖，而微摩尔级别的 ROS 会导致细胞程序性死亡，毫摩尔水平的 ROS 则会直接引起细胞坏死。在各种 ROS 中，过氧化氢的危害最大^[79]。过氧化氢能够自由地穿过细胞膜和核膜，对细胞内的物质和结构产生作用。过氧化氢在机体内可转变为羟自由基，而羟自由基可以与 DNA、蛋白质和脂质等发生反应，导致诱发基因突变、蛋白质变性和脂质过氧化等严重后果^[80]。

2.5.4 氧化应激与凋亡相关信号通路

细胞凋亡的过程受到细胞内相关信号通路的严格控制，其激活机制一旦已经开始，细胞会不可避免地发生死亡。细胞凋亡是一种细胞的程序性死亡，一般分为外源性凋亡通路和内源性凋亡通路^[81]。而其中，内源性凋亡通路与细胞的氧化应激状态相关。细胞内过量的 ROS 可以攻击线粒体。而线粒体在细胞内源性凋亡途径中起着关键作用，它是内源型细胞凋亡的控制中心。在细胞氧化应激后，线粒体外膜的通透性改变，导致线粒体膜电位丧失，释放线粒体内细胞色素C到胞浆中，活化含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶（cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase）家族的酶类，进而通过 Caspase 依赖性或非依赖性途径引起细胞发生凋亡。

2.5.5 树脂单体引起细胞毒性与氧化应激

树脂单体的细胞毒性作用与氧化应激有关。有研究发现，HEMA、TEGDMA 等单体处理会导致细胞内 GSH 水平显著下降，而 GSSG 水平却基本不发生改变，同时伴随有 GSH-GSSG 比例的显著下降，以及 ROS 水平的上升^[82]。这一研究结果提示，树脂单体引起的 GSH 水平下降不是 ROS 过量产生引起的继发反应，因为 GSH 对 ROS 的灭活应伴有 GSSG 水平的上升。最新研究发现树脂单体的甲

基丙烯酰基团能够与 GSH 的巯基直接发生麦氏加成反应，生成单体-GSH 复合物，进而直接引起 GSH 的耗竭^[83, 84]。单体-GSH 复合物可以被谷胱甘肽转移酶（GST）催化，最终排出细胞。上述结果提示，单体引起的 GSH 耗竭是由于其与单体的直接发生反应引起。而细胞内 GSH 的耗竭会继发性引起 ROS 发生聚积，产生氧化应激，进而导致细胞发生凋亡和坏死。过量的 ROS 还可与细胞内的蛋白发生反应，通过相关的分子信号通路，干扰正常的细胞生命活动。促分裂素原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases, MAPK）是细胞应对来自细胞内部和外部的刺激的重要信号分子，其作用包括调节炎症反应，调控细胞分化等。有文献报道，牙科单体 HEMA、TEGDMA 等可以改变 MAPK 分子的活性，上调炎症介质释放信号分子 NF- κ B（nuclear factor B），同时释放炎症因子白介素6（interleukin 6, IL-6）、IL-8 及前列腺素E2（prostinE2, PGE2）^[58, 85-87]。此外，牙科单体在较低浓度下可以改变 MAPK 分子的表达，进而抑制成骨细胞的分化和矿化功能^[88]。过量的 ROS 的还可以与细胞内的 DNA 分子发生反应。有文献报道，用牙科单体 HEMA、TEGDMA 等刺激细胞后，细胞内的 ROS 水平迅速升高，进而发生氧化 DNA 损伤，激活与 DNA 修复相关的一系列分子，导致细胞周期阻滞，细胞凋亡和坏死^[89]。

2.6 抗氧化剂对树脂单体细胞毒性的保护作用

树脂单体耗竭细胞内的 GSH，细胞内过量的 ROS 积蓄，导致细胞内氧化-还原的动态平衡被打破，进而引起细胞的氧化应激状态^[67]。而过量的 ROS 一方面通过相关的信号通路影响细胞正常的生理功能，导致细胞的凋亡坏死的发生；另一方面，ROS 可以和细胞内的生物大分子包括 DNA、蛋白质和脂质等发生反应，导致相关分子的变性。基于这些研究结果，为了拮抗牙科单体的细胞毒性作用，许多学者研究了抗氧化剂对牙科单体的细胞毒性作用。研究发现，抗氧化剂如N-乙酰半胱氨酸（NAC）、维生素C和维生素E对牙科单体的细胞毒性具有保护作用^[66, 82]。其中，关于 NAC 保护作用的研究最多也最为深入。目前，对于NAC对牙科单体细胞毒性保护作用机制的认识包括：第一，NAC 分子结构中的巯基可以直接与 ROS 反应；第二，细胞可以利用 NAC 合成 GSH 作用于 ROS；第三，NAC 可以激活 NF- κ B

等信号通路，抑制牙科单体引起的炎症反应，促进细胞增殖^[90]；第四，NAC 是一种亲电物质，可以通过麦氏加成反应，与牙科单体发生反应，生成低毒性的物质，同时降低细胞内单体的浓度，从而保护细胞^[67, 91-93]。

3 Nrf2抗氧化应激信号通路

氧化应激产生的 ROS 直接或间接地损伤细胞内蛋白质、脂质、DNA 等生物大分子，导致许多疾病的发生^[94]。针对过氧化损伤及亲电物质的毒性作用，细胞内存在一套精细的“防御系统”，当细胞暴露于活性氧的刺激时，能调控一系列的保护性蛋白的表达，从而缓解细胞所受的损害。Nrf2 (NF-E2-related factor 2) 通路在细胞这一抗氧化防御系统中发挥着重要的核心作用^[94]。

3.1 Nrf2与Keap1的结构

Nrf2 是 CNC (Cap-‘N’-Collar) 转录因子家族成员^[95]，共含有7 个高度保守的结构域 Neh (Nrf2-ECH homology)^[94]。其中，Neh1 区中有一个C端亮氨酸拉链结构 bZip (basic leucine zipper)，它可以与细胞核内小 Maf (small Maf proteins) 蛋白形成异二聚体，使 Nrf2 能够识别、结合抗氧化反应元件 ARE (Antioxidant response element)，从而启动目标基因转录。Neh2 区是 Nrf2 与胞浆蛋白 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1) 的结合区，其中含有 ETGE 基序、DLG基序两个结合位点，可以和 Keap1 上的双甘氨酸重复区 (double glycine repeat, DGR) 相结合。Neh4 和 Neh5 区可以参与到下游基因转录的启动^[96] (图3)。

Keap1 是 Nrf2 在细胞质中的结合蛋白，并与肌动蛋白结合锚定于胞浆中，含有 5 个结构域，分别为N端结构域 (N-terminal region, NTR)、干预区 (Intervening Region, IVR)、BTB (Broad complex, Tramtrack and Bric-a-brac) 区、双甘氨酸重复区 (DGR) 和C端结构域 (carboxyl-terminal region, CTR)。其中 DGR 区也叫 Kelch 区，是 Keap1 与 Nrf2 的结合区，同时也是与胞浆内肌动蛋白结合的位点；IVR 区富含半胱氨酸，是整个蛋白的功能调节区；BTB 区与看 Keap1 同源二聚有关^[97] (图3)。

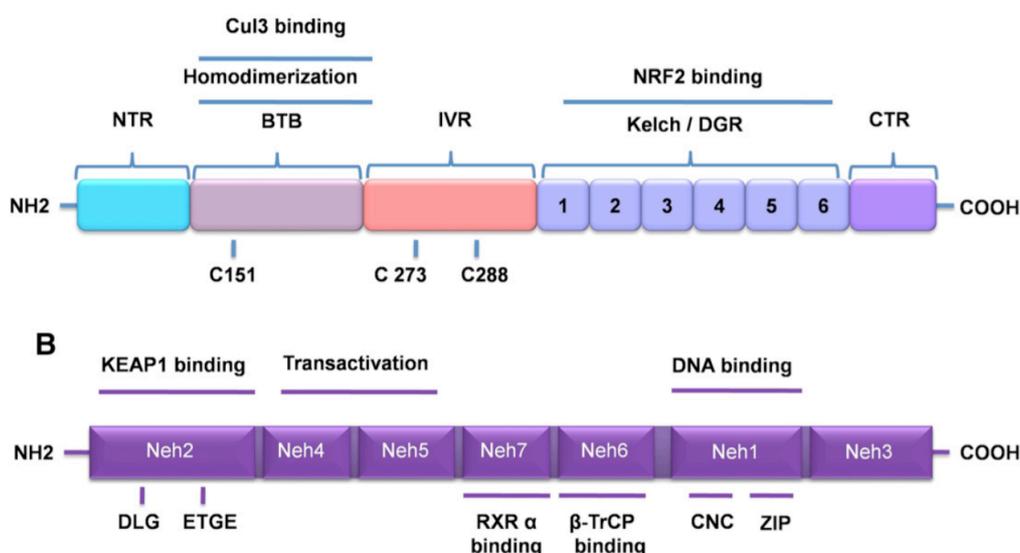


图3 Nrf2和Keap1的结构^[98]

3.2 Nrf2 信号通路的激活机制

在正常条件下，Nrf2 被其胞浆伴侣蛋白 Keap1 所抑制，二者以结合的形式存在于细胞质中；而当氧化应激时，Nrf2 与 Keap1 解偶联，在多种蛋白激酶的磷酸化作用下，Nrf2 与 Keap1 解离，转移到细胞核中，与抗氧化反应元件 ARE (Antioxidant response element) 结合，诱导下游的对氧化损伤具有保护作用的酶类发生转录和表达^[97]。这些酶类包括过氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx)、血红素氧合酶 (heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H:醌氧化还原酶1 (quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (glutamate cysteine ligase, GCL) 等。这些酶类对过氧化损伤具有保护作用，可以促进细胞对 ROS 的灭活和外源性亲电化物的清除，从而缓解这些物质引起的细胞毒性作用 (图4)。此外，许多细胞信号通路参与 Nrf2 系统的调节，MAPK 通路中各种分子包括细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 p38，以及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 都参与 Nrf2-Keap1 激活。研究发现，ERK 和 JNK 能促进 ARE 介导的效应，Nrf2 被 p38 磷酸化则可加强 Keap1/Nrf2 结合，抑制 Nrf2 活性。PKC 可以直接磷酸化

Nrf2 401 位丝氨酸，PI3K 可促进 Nrf2 核转位。MAPK 虽然也可直接磷酸化 Nrf2，但对 Nrf2 的核转位和活性影响较小。

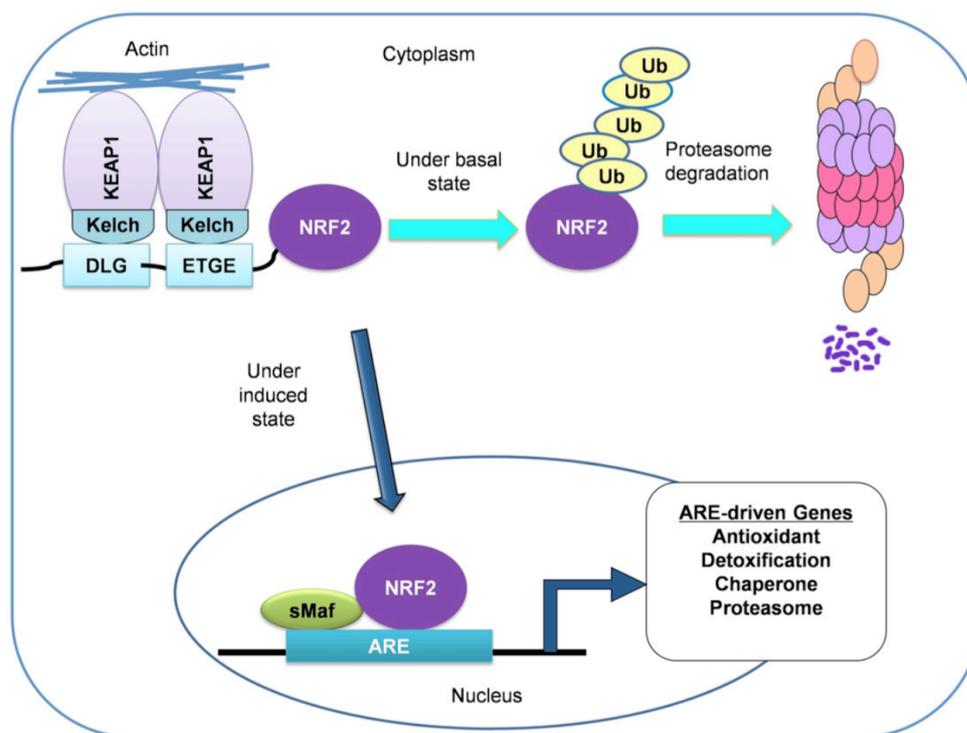


图4 Nrf2信号通路的激活机制^[98]

3.3 Nrf2信号通路与树脂单体细胞毒性

大量的研究发现，众多疾病发生、发展的病理生理过程都与活性氧导致的氧化应激有关。因此，如何有效地缓解细胞氧化应激成为医学研究的热点之一，而 Nrf2 信号通路是机体针对过氧化损伤最重要的机制，因此，通过多种途径内源性调节该通路可为抗氧化治疗开辟新途径^[76, 98-103]。虽然目前没有关于牙科单体对细胞内 Nrf2 通路影响的研究报道，但根据文献回顾树脂单体引起的氧化应激是其细胞毒性的最主要原因，而 Nrf2 信号通路是机体针对过氧化损伤最重要的机制。因此，我们推测 Nrf2 通路在拮抗牙科单体的细胞毒性中具有重要作用，通过人为上调 Nrf2 通路，可能提高细胞对牙科单体的细胞毒性的抵抗力，可能是缓解牙科单体及树脂基牙科材料细胞毒性的新策略。

正 文

第一部分、树脂单体引起细胞毒性的可能机理

树脂基牙科材料修复后，未聚合单体会渗出到口腔中。此外，口腔中各种复杂的环境因素，如唾液、咀嚼、热学、化学、饮食习惯、微生物因素等，会导致树脂修复体发生降解，使降解出的单体释放到口腔中。这些单体的释放都会对口腔组织造成伤害。HEMA、MMA 和 TEGDMA 均为树脂基牙科材料单体，但是其分子结构和用途有所区别。本部分实验拟以 HEMA、MMA 和 TEGDMA 为研究对象，对它们的细胞毒性进行较为系统的评价和比较。近年研究显示，含有丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯基团的牙科单体可以引起细胞内氧化应激，进而导致发生细胞凋亡，而目前关于其引起细胞凋亡的机理尚不明确。鉴于前期有文献报道称线粒体内源性凋亡通路与细胞的氧化应激状态相关，本部分实验还将探讨 ROS 及内源性凋亡通路在树脂单体细胞毒性中的作用。

实验一、树脂单体对细胞增殖及细胞内氧化还原平衡的影响

渗出到口腔中的树脂单体会对口腔组织造成伤害。HEMA、MMA 和 TEGDMA 均为树脂基牙科材料单体，但是其分子结构并不相同。本实验将探讨不同树脂单体对细胞增殖可能的抑制情况以及能否导致细胞内氧化应激的发生。

1 材料

1.1 主要试剂

- α -MEM培养液 (Gibco BRL, 美国)
- 青霉素 (Gibco BRL, 美国)
- 链霉素 (Gibco BRL, 美国)
- 胎牛血清 (四季青, 中国)
- PBS缓冲液 (Sigma, 美国)
- I型胶原酶 (Sigma, 美国)
- 0.25%胰蛋白酶 (Sigma, 美国)
- HEMA (Sigma, 美国)
- MMA (Sigma, 美国)
- TEGDMA (Sigma, 美国)
- NAC (Sigma, 美国)
- CCK-8检测试剂盒 (碧云天, 中国)
- ROS检测试剂盒 (碧云天, 中国)
- BCA蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天, 中国)
- MDA检测试剂盒 (南京建成, 中国)
- 总谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽测定试剂盒 (南京建成, 中国)
- SOD检测试剂盒 (南京建成, 中国)
- GPx检测试剂盒 (碧云天, 中国)
- CAT检测试剂盒 (碧云天, 中国)

1.2 主要仪器

- 超净细胞实验台 (SPEG, 中国)
- 倒置相差显微镜 (Olympus, 日本)
- 图像采集系统 (Olympus, 日本)
- 台式离心机 (湖南湘仪仪器厂, 中国)
- 细胞刮刀 (Thermo, 美国)

- GL20A 低温高速离心机（湖南湘仪仪器厂，中国）
- CO₂恒温细胞培养箱（Thermo，美国）
- 6孔、96孔培养板（Falcon，美国）
- 玻璃粗、细滴管、25/75 cm²玻璃培养瓶（Thermo，美国）
- 玻璃培养皿、10 mL玻璃离心管（Thermo，美国）
- 各种微量移液器（Eppendorf，德国）
- 移液器枪头/Eppendorf 管（Axygen，美国）
- 水平摇床（北京六一厂，中国）
- 全自动酶标仪（BIO-RAD，美国）
- 流式细胞仪（Beckman-Coulter，美国）
- 去离子水过滤仪（Millipore，美国）
- 原代培养工具箱

2 方法

2.1 人牙髓细胞（hDPCs）的原代培养

2.1.1 临床样本采集

本实验中所需牙齿临床样本采集自第四军医大学口腔医院因正畸需要而完整拔除的健康前磨牙，并在样本收集之前均已征得患者同意^[104]。临床问诊时排除患者药物过敏史、全身疾病史及遗传病史，临床口内检查时检查牙齿松动度。拔除牙齿前使用碘酊棉球擦洗牙冠及牙龈消毒，拔除时小心使用拔牙钳，以免损坏牙冠、吸收期牙根或损伤牙髓，尽量完整拔出。牙齿拔出后立即置于装有 4°C 预冷的含胎牛血清的 α -MEM 的离心管中，并用封口膜将管口封好。来自不同患者的牙齿样本分别使用不同的离心管，同一患者的牙齿样本可置于同一离心管内。将采集好的牙齿样本带到细胞学实验室进行后续操作。

2.1.2 消化法原代培养 hDPCs

在超净工作台中用 PBS 冲洗手机的新鲜离体牙 2-3 遍，直至牙根表面无血块或其他异物附着。75% 乙醇对牙齿表面消毒灭菌，并无菌包装袋包裹牙齿样本，敲击暴露髓腔，取出牙髓，PBS 浸泡、洗涤 3-4 遍。用无菌眼科剪将牙髓剪碎至不大于 1mm³ 大小的碎块，将 I 型胶原酶（0.3%）和 dispase 酶（0.4%）等体积混合，置于 37°C、5% CO₂ 孵箱中内消化准备好的牙髓碎块 1-2 h。待消化结束后，加入等体积含 10% 胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）的 α -MEM 培养液终止消化，充分混匀，并用移液器轻轻吹打组织细胞沉淀，800 r/min 离心 5 min，倒弃上清液，

用并含胎牛血清的 α -MEM 重悬，吹打均匀后接种至 6 孔培养板内，置于 37°C、5% CO₂ 孵箱中培养。每 3 天更换 1 次培养液，当原代细胞培养生长至 80-90% 汇合时，使用胰酶消化，进行传代培养。

2.1.3 细胞冻存储备用及解冻

细胞传代培养至 2-3 代时如细胞多于目前实验所需，则将多余细胞冻存储备用。倒弃废液，胰酶消化 3 min 左右，加入 α -MEM 中止消化，吹打后转移至离心管，800 r/min 离心 5 min，使用 4°C 预冷的细胞冻存液（二甲基亚砜：胎牛血清=1:9）重悬细胞，转移至细胞冻存管内，封口膜封口，置于冻存盒内 -80°C 下缓降温度，至少 24 h 后转移至液氮罐中，并记录细胞冻存的信息。待需要解冻细胞时，将细胞冻存管从液氮罐中取出，放入 37°C 恒温水浴中，快速摇晃解冻，在超净实验台内打开冻存管，将液体转移至离心管 800 r/min 离心 5 min，使用新鲜的含 10% 胎牛血清的 α -MEM 重悬，接种至 75 cm² 培养瓶内，之后常规换液培养。

2.2 CCK-8 实验

调整 hDPCs 细胞悬液的浓度为 5×10^3 个/mL，接种于 96 孔培养板，每孔 100 μ L，置于 37°C、5% CO₂ 孵箱中培养约 24 h 使细胞贴壁并达到 80% 融合。弃去培养液后，每孔加入 100 μ L 的单体溶液（HEMA: 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM; MMA: 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM; TEGDMA: 1, 2.5, 5, 7.5, 10 mM），培养 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。继续培养 4 h 后，用酶联免疫标记仪在吸收波长为 450 nm 处测定吸光度值。根据以下公式：相对增殖率 = (OD实验组 - OD空白对照) / (OD阳性对照 - OD空白对照)，计算细胞的相对增殖率，其中空白对照组只含有正常细胞和标准培养液，空白对照组只含有标准培养液。

根据上一实验结果，找到各树脂单体引起细胞存活率发生显著改变的最小浓度，在这一浓度下探讨NAC是否可以减小各种树脂单体的毒性作用。实验分组如表1-1所示：

表 1-1 CCK-8 实验分组

对照组	实验组1	实验组2	实验组3	实验组4	实验组5	实验组6	实验组7
—	10mM NAC	1mM HEMA	5mM MMA	1mM TEGDMA	1mM HEMA +10mM NAC	5mM MMA +10mM NAC	1mM TEGDMA +10mM NAC

各组细胞培养 24 h、48 h 和 72 h 后进行 CCK-8 实验，检测各组细胞存活情况。倒置相差显微镜观察各组细胞形态。

2.3 细胞内 ROS 水平检测

将 hDPCs 细胞悬液以 5×10^4 个/mL 的浓度接种于 6 孔板中，在 37°C、5% CO₂ 的孵箱中孵育 24 h 使细胞贴壁并达到 70-80% 融合。实验分组同实验 2.2.1，培养 6 h 后，按照相关试剂盒说明书检测各组细胞内 ROS 水平。具体方法如下：用无血清 α -MEM 培养液将探针 DCFH-DA 以 1:1000 的比例稀释，配制成 10 μ M 的染色工作液。在细胞孵箱中用染色工作液培养细胞 20 min，消化并收集细胞，用不含胎牛血清的 α -MEM 培养基重悬细胞后用流式细胞仪检测，设置流式细胞仪的参数为激发波长 488 nm，发射波长 525 nm。其中对照组只含有正常细胞和标准培养液。

2.4 各种生化指标检测

2.4.1 丙二醛 (MDA) 检测

细胞样品准备同表 1-1。实验操作步骤如下：

- 1) 样本前处理:
- 2) 弃去细胞培养上清，用细胞刮将细胞刮下，用移液器将细胞转移到塑料离心管中，加提取液 0.5 mL，混匀 2 min，将细胞破碎制成悬液，取样 0.1 mL 于 1.5 mL 离心管中。
- 3) 细胞裂解液的上清采用 BCA 法进行蛋白定量：
 - a) 将 BCA 标准品倍比稀释 (2000、1000、500、250、125、62.5、31.25 及 15.625 μ g/ μ L)；
 - b) 将 BCA 试剂盒中的 A、B 液 (50: 1) 混合配制成 BCA 工作液，在 96 孔板每孔分别加入 BCA 工作液 200 μ L 与标准液 25 μ L 或待测样品，用移液器将其充分混匀；
 - c) 将 96 孔板放置于 37°C、5% CO₂ 孵箱中孵育 30 min；
 - d) 用酶标仪在吸收波长 570 nm 处测定各孔的吸光度值 (A₅₇₀)，同时绘制标准曲线，从而计算出相应的蛋白浓度^[105]。
- 4) MDA 的测定步骤如表 1-2 所示：

表 1-2 MDA 的测定步骤

试剂名称 (μL)	空白管	标准管	测定管
无水乙醇	100	-	-
10 nmol/mL 标准品	-	100	-
测试样品	-	-	100
工作液	1000	1000	1000

5) 盖上盖，旋涡混匀器混匀，95°C 以上水浴 40 min，取出后流水冷却，4000 r/min 离心 10 min，每管吸取 0.25 mL 反应液加入到新的 96 孔板中，置酶标仪中波长 530 nm 处进行扫描，计算时要减去空白管读数。

6) 计算公式：

$$MDA \text{ 含量 } \left(\frac{nmol}{mgprot} \right) = \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10nmol/ml)} \times \frac{\text{样本蛋白浓度}}{(mgprot/ml)}$$

2.4.2 总谷胱甘肽 (T-GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 检测

细胞分组，细胞裂解液制取同实验 2.4.1。实验操作步骤按照细胞内总谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽检测试剂盒说明书说明书进行：

1) 总谷胱甘肽 (T-GSH) 的测定步骤如表 1-3 所示：

表 1-3 T-GSH 操作步骤

试剂名称 (μL)	标准管	测定管
50 μmol/L GSH 标准品	10	-
样本	-	10
试剂一	100	100
试剂二	10	10
混匀后，室温 25°C 下静置 2 min		
试剂三	50	50

加试剂三的同时开始计时，轻轻摇动酶标板使试剂充分混匀，置酶标仪波长 405 nm 处，30 s 时准时读取 A1 值，室温 25°C 下静置 5 min，5 分 30 秒时准时读取 A2

值。

2) 氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 的测定步骤:

a) GSSG 的测定前处理步骤如表 1-4 所示:

表 1-4 GSSG 的测定前处理步骤

试剂名称 (μL)	标准管	测定管
50 $\mu\text{mol/L}$ GSSG 标准品	100	-
样本	-	100
试剂五	2	2
试剂六	5	5

漩涡混匀 1 min, 37°C 下反应 30 min, 然后取样 50 μL 进行测定。

b) GSSG 含量测定步骤如表 1-5 所示:

表 1-5 GSSG 的测定步骤

试剂名称 (μL)	标准管	测定管
标准前处理液	10	-
样本前处理液	-	10
试剂一	100	100
试剂二	10	10
混匀后, 室温 (25°C) 静置 2 分钟		
试剂三	50	50

加试剂三的同时开始计时, 轻轻摇动酶标板使试剂充分混匀, 置酶标仪中波长 405 nm 处, 30 秒时准时读取 A1 值, 室温 25°C 下静置 5 min, 5 分 30 秒时准时读取 A2 值。实验样品蛋白浓度采用 BCA 法进行蛋白定量, 步骤同实验 2.4.1。

3) 计算公式:

$$T-GSH \text{ 含量 } (\mu\text{mol/L}) = \frac{T-GSH \text{ 测定 } \Delta A \text{ 值 } (A_2-A_1)}{T-GSH \text{ 标准 } \Delta A \text{ 值 } (A_2-A_1)} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(50\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

$$GSSG \text{ 含量 } (\mu\text{mol/L}) = \frac{GSSG \text{ 测定 } \Delta A \text{ 值 } (A_2-A_1)}{GSSG \text{ 标准 } \Delta A \text{ 值 } (A_2-A_1)} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(50\mu\text{mol/L})} \times \frac{\text{样本测试前}}{\text{稀释倍数}}$$

$$\text{还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量} = T-GSH \text{ 含量} - 2 \times GSSG \text{ 含量}$$

2.4.3 氧化物歧化酶 (SOD) 检测

细胞分组, 细胞裂解液制取同实验 2.4.1。实验操作步骤如下:

1) SOD 的测定步骤如表 1-6 所示:

表 1-6 SOD 的测定步骤

试剂名称(μL)	对照孔	对照空白孔	测定孔	测定空白孔
待测样本	—	—	20	20
双蒸水	20	20	—	—
酶工作液	20	—	20	—
酶稀释液	—	20	—	20
底物应用液	200	200	200	200

将以上试剂分别加入到 96 孔板中混匀, 在室温 37°C 下孵育 20 min, 450 nm 处酶标仪读数。实验样品蛋白浓度采用 BCA 法进行蛋白定量, 步骤同实验 2.4.1。

2) 计算公式:

$$\text{SOD 抑制率 } (\%) = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{测定}} - A_{\text{测定空白}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}})} \times 100$$

$$\text{SOD 活力 } (\text{U/mgprot}) = \frac{\text{SOD 抑制率 } (\%)}{50\%} \times \frac{\text{反应体系 } (0.24\text{ml})}{\text{稀释倍数}} \div \frac{\text{待测样本蛋白浓度}}{(0.02\text{ml})} \div (\text{mgprot/ml})$$

2.4.4 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 检测

细胞分组, 细胞裂解液制取同实验 2.4.1。实验操作步骤如下:

1) 试剂工作液盒准备: 分别配制 10 mM NADPH 溶液, 84 mM GSH 溶液, GPx 检测工作液以及 15 mM 过氧化物试剂溶液, 使用前所有试剂工作液水浴到 25°C。

2) GPx 的测定步骤如表 1-7 所示:

表 1-7 GPx 的测定步骤

试剂名称 (μL)	空白对照	样品本底对照	样品
谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液	186	180	176
待测样品	—	10	10
GPx 检测工作液	10	10	10
15mM 过氧化物试剂溶液	4	—	4
总体积	200	200	200

将以上试剂分别加入到 96 孔板中混匀, 在 25°C 下, 在 340 nm 处酶标仪连续 3 min 读数(A340), 每隔 30 s 记录 A340 值, 获得 6 个点的数据。测定出来的 A340/min 的最佳值应控制在 0.03 至 0.15 范围内。实验样品蛋白浓度采用 BCA 法进行蛋白定量, 步骤同实验 2.4.1。

3) 计算公式:

a) 对于谷胱甘肽过氧化物酶溶液: $1 \text{ mU/mL} = 1 \text{ nmol NADPH/min/mL} = (\text{A340/min}) / 0.00622$, 即相当于: $[\text{检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] = [\text{A340/min(样品)} - \text{A340/min(空白对照)}] / 0.00622$

注: $[\text{检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力}]$ 的单位为 mU/mL。

b) $[\text{样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] = [\text{检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] \times [\text{稀释倍数}] / [\text{样品中的蛋白浓度}]$

$[\text{样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力}]$ 的单位为: U/mg 蛋白或 mU/mg 蛋白;

$[\text{样品中的蛋白浓度}]$ 的单位为: mg/mL。

c) 计算示例: 样品的蛋白浓度经测定为 0.5 mg/mL, 用样品稀释液稀释 2 倍后, 取 10 微升稀释后的样品参考表 1 进行测定。

如果 $\text{A340/min(样品)} = 0.065$, $\text{A340/min(空白对照)} = 0.003$, 那么 $[\text{检测体系中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] = (0.065 - 0.003) / 0.00622 = 10 \text{ mU/mL}$

$[\text{样品中谷胱甘肽过氧化物酶活力}] = 10 \text{ mU/ml} \times 2 \times 20 / (0.5 \text{ mg/mL}) = 800 \text{ mU/mg(蛋白)}^{[106]}$

2.4.5 过氧化物酶 (CAT) 检测

细胞分组, 细胞裂解液制取同实验 2.4.1。实验操作步骤按照细胞内 CAT 检测试剂盒说明书说明书进行:

标准曲线测定：分别取 0、12.5、25、50 或 75 μL 配制好的 5 mM 过氧化氢溶液至 1.5 mL 塑料离心管中，分别加入过氧化氢酶检测缓冲液至终体积为 100 μL ，混匀，96 孔板每孔加入 4 μL 。加入显色工作液 200 μL 。25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15-40 min 后用酶标仪测定 520 nm 处的吸光度值 (A_{520})^[106]。

样品的测定步骤如表 1-8 所示：

表 1-8 CAT 的测定步骤

试剂名称 (μL)	空白对照	样品
样品体积	0	10
过氧化氢酶检测缓冲液	40	30
250 mM过氧化氢溶液	10	10
总体积	50	50

用移液器充分混匀，25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1-5 min 后，加入反应终止液 450 μL 以终止反应。在 1.5 mL EP 管中加入 10 μL 上述反应体系，再加入 40 μL CAT 检测缓冲液，充分混匀，10 μL 加入到 96 孔板，再加入 200 μL 显色工作液，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 15-40 min，在吸收波长 520 nm 处用酶标仪测定吸光度值 (A_{520})。

计算公式：

- 计算出标准曲线： $A_{520}=k[\text{过氧化氢微摩尔数}]+b$ ，由标准曲线计算出 k 和 b 的值。
- 计算出样品中残余的过氧化氢摩尔数：残余过氧化氢微摩尔数= $(A_{520}-b)/k$
- 过氧化氢酶酶活力单位的定义：1 个酶活力单位 (1 unit) 即在 25 $^{\circ}\text{C}$ ，pH=7.0 的条件下，在 1 min 内可以催化分解 1 μmol 过氧化氢^[107]。
- [样品过氧化氢酶酶活力]=[消耗过氧化氢微摩尔数] \times [稀释倍数]/([反应分钟数] \times [样品体积] \times [蛋白浓度])

[样品过氧化氢酶酶活力]的单位为 units/mg 蛋白

[消耗过氧化氢摩尔数]=[空白对照残余过氧化氢微摩尔数]-[样品残余过氧化氢微摩尔数]

[稀释倍数]=250

[反应分钟数]即为实际的反应分钟数

[样品体积]为表 2 中的 X 微升，以毫升来表示即为 X/1000 毫升。

[蛋白浓度]为取 X 微升样品时，样品中的蛋白浓度，单位为 mg/mL^[105]。

2.5 数据统计分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析，使用 Graphpad Prism 6 软件绘图，数据表现形式为均数±标准差 (mean ± SD)，以 one-way ANOVA 进行分析， $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 树脂单体对 hDPCs 细胞增殖和细胞形态的影响

我们用不同浓度的树脂单体处理 hDPCs，24 h 后 CCK-8 法检测细胞增殖。三种树脂单体对 hDPCs 的体外细胞毒性试验结果如图 1-1 所示，所有检测浓度的单体组均对 hDPCs 的增殖呈现剂量依赖性的抑制作用 ($P < 0.05$)。与对照组相比，当 HEMA 浓度为 1.0 mM，MMA 浓度为 5.0 mM，TEGDMA 的浓度为 1.0 mM 时出现统计学差异。因此，我们选择这些浓度用于后面的实验，以保证不会因细胞过多死亡而影响实验的准确性。

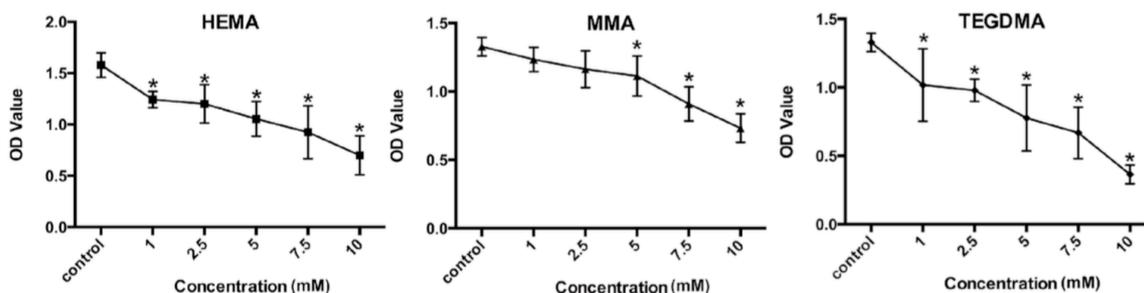


图1-1 树脂单体对 hDPCs 细胞增殖的抑制作用

(*表示与对照组相比有显著性差异， $P < 0.05$ ， $N=3$)

用选定浓度的树脂单体和 NAC 共同处理细胞 24 h、48 h 或 72 h 后，CCK-8 法检测细胞增殖，结果如图 1-2 所示。在所有检测时间点，各种单体处理组的细胞增殖均显著低于对照组 ($P < 0.05$)，此外，单体对细胞增殖的抑制作用呈现时间依赖性，随着处理时间的增加存活细胞比例显著降低。当用 NAC 和单体共同处理细胞时，存活细胞百分比与对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

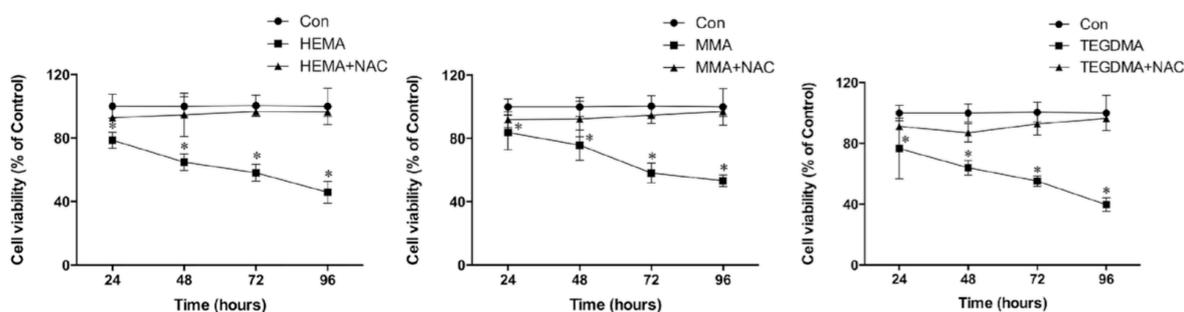


图1-2 NAC 对细胞增殖的保护作用

(*表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, $N=3$)

如图 1-3 所示, 暴露于不同树脂单体 24 h 后对照组细胞密度较高, 呈现出正常的、典型的长梭形形态。单独用 NAC 处理, 细胞密度和形态无明显变化。当用单体处理细胞后, 细胞密度明显降低, 部分细胞变为圆形。用 NAC 和单体共同处理细胞后, 虽然细胞数目仍然少于对照组, 但与单体组相比, 细胞数目显著增加, 且大部分细胞呈现正常的长梭形形态。

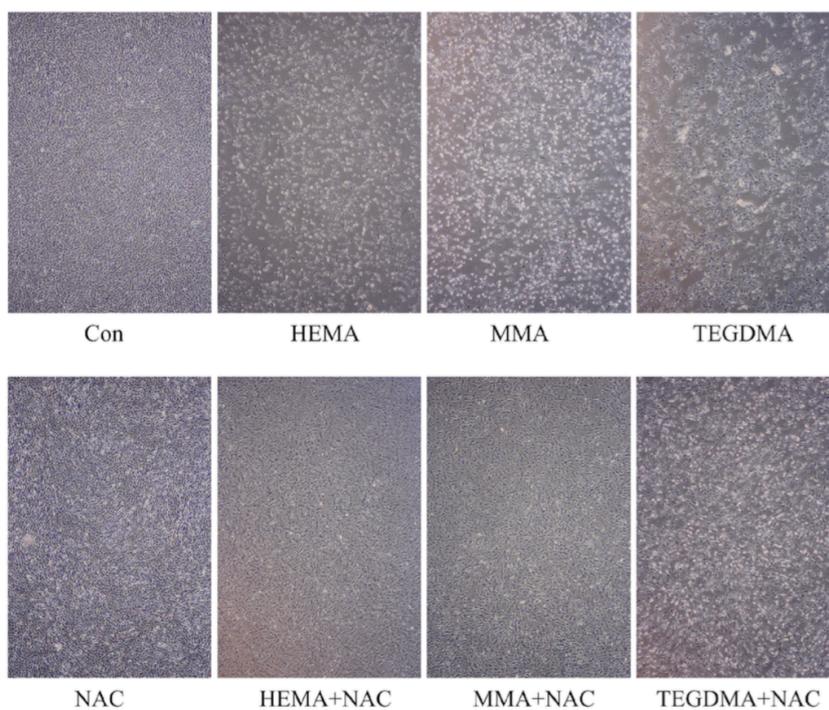


图1-3 细胞暴露树脂单体和 NAC 24 h 后形态的改变

3.2 树脂单体对氧化还原平衡的影响及 NAC 对细胞的保护作用

为了检测树脂单体处理后，细胞内氧化还原平衡的变化，我们首先检测了细胞内的 ROS 水平和 GSH 的含量（图 1-4）。我们发现，与对照组相比，单体处理细胞 6 h 后，细胞内的 ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$)。单独用 NAC 处理细胞对 ROS 水平无显著影响。与单体处理组相比，NAC 与单体共同处理后，ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$)。而用 NAC 与树脂单体共同处理后，总 GSH 含量和 GSH 含量与对照组无显著差异，提示 NAC 可缓解齿科单体引起的 GSH 耗竭。

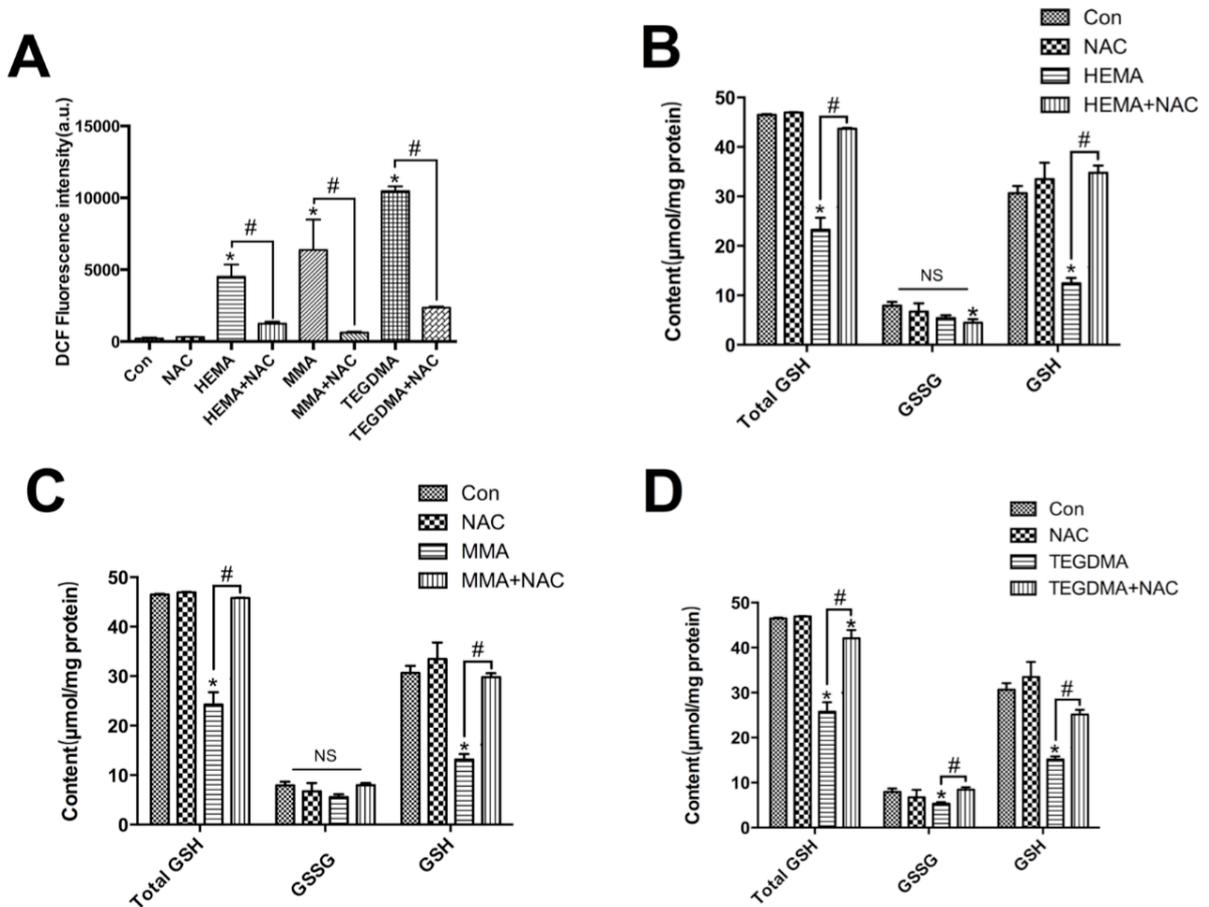


图1-4 树脂单体和NAC对ROS水平(A)和GSH的含量(B-D)的影响
 (*表示与对照组相比有显著性差异，#表示与树脂单体处理组相比有显著性差异， $P < 0.05$, $N = 3$)

如图 1-5 所示暴露于树脂后，MDA 的含量显著升高 ($P < 0.05$)，提示细胞内有较多脂质发生氧化，而 NAC 可以拮抗这一过程。在抗氧化酶活性水平研究中，我们发现，单体处理后，细胞内的主要抗氧化酶的活性都发生了变化。SOD、GPx 活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$)，而 CAT 的活性显著高于对照组 ($P < 0.05$)。NAC 可以拮抗树脂单体对细胞内抗氧化酶活性的影响。

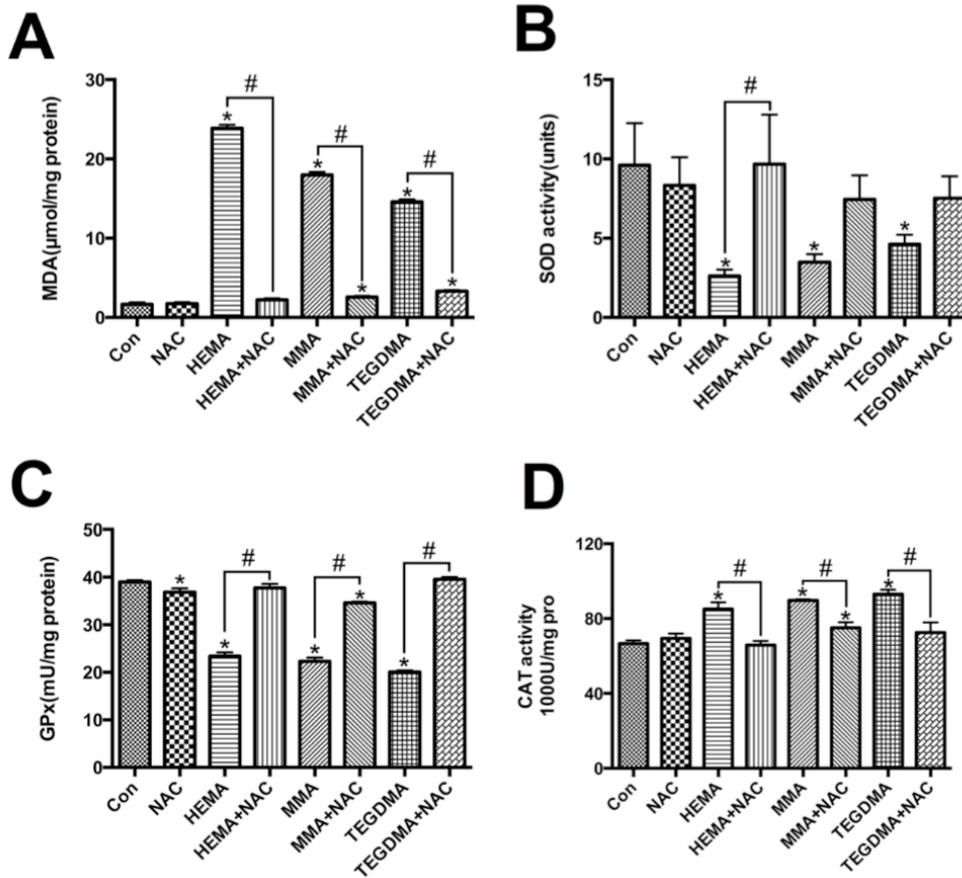


图1-5 树脂单体和 NAC 对 MDA 含量(A)和抗氧化酶的活性(B-D)的影响

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$,

N=3)

4 讨论

在本实验中，通过 CCK-8 细胞增殖实验我们发现，树脂单体对细胞增殖呈现剂量依赖性的抑制作用。同时，不同的单体对细胞增殖的抑制作用也不同，其中 MMA 的毒性最低，其次是 HEMA，毒性最大的是 TEGDMA，这一结果与之前的研究结果类似^[108, 109]。有学者发现，树脂单体的毒性大小，与其化学结构有关。一般来说，单

体的疏水性越强，甲基丙烯酸聚合基团越多，细胞毒性越大。这可能是由于一方面甲基丙烯酸基团可以导致细胞膜溶解，另一方面可以与细胞内的 GSH 直接发生加成反应，导致细胞发生氧化应激^[110, 111]。此外，我们还发现，NAC 可以有效缓解树脂单体对细胞增殖的抑制作用，恢复细胞形态。

本研究结果提示树脂单体的细胞作用毒性与细胞内 ROS 的过量产生和 GSH 的耗竭有关，这与以往学者所提出的氧化应激是树脂单体引起细胞毒性的主要机制这一观点一致^[112, 113]。GSSG 是 GSH 与 ROS 反应的产物^[114]，如果细胞内过量的 ROS 与 GSH 直接反应，那么会导致 GSSG 含量的增加。然而在实验中我们发现，树脂单体可以引起 GSH 含量的降低，但细胞内 GSSG 的含量却未发生显著变化。这提示我们树脂单体所引起的 GSH 含量的降低，并不是由于过量的 ROS 耗竭 GSH 产生的继发性变化，而可能是树脂单体与 GSH 发生化学反应，直接引起细胞内 GSH 的耗竭。事实上，有学者发现，含甲基丙烯酸的牙科单体可以与 GSH 发生麦氏加成反应，生成单体-GSH 复合物，从而导致 GSH 含量的降低^[83, 84, 115]。细胞内正常含量的 ROS 对于生命活动的维持和细胞内的信号转导过程起到重要的作用。正常情况下，为了防御氧化应激对细胞的损伤，细胞内的抗氧化防御系统可以消除过量产生的 ROS，维持细胞内的氧化-还原动态平衡^[70]。但是当细胞内最重要的非酶类抗氧化剂 GSH 被树脂单体所耗竭，抗氧化防御系统瓦解，会继发性引起细胞内 ROS 水平的升高，进而影响细胞的增殖等生理功能。此外，过量的 ROS 可以和细胞内的生物大分子包括 DNA、蛋白质和脂质等发生反应，导致相关分子的变性。MDA 是多不饱和脂肪酸的发生脂质氧化作用的产物，是细胞发生氧化损伤的指标^[116]。我们发现，单体处理后细胞内 MDA 的含量显著增加，提示树脂单体确实可以引起细胞的过氧化损伤。

除了非酶抗氧化剂，细胞内的各种抗氧化酶通过代谢特定的 ROS 直接参与到氧化还原平衡的维持中。本实验中，我们发现，单体处理后，细胞内 CAT 的活性明显升高，而 SOD 和 GPx 的活性明显降低。在功能上，在 ROS 的第一步代谢中，SOD 能催化超氧化物阴离子生成过氧化氢和氧气，此后，GPx 和 CAT 可以催化过氧化氢产生水和氧气，从而消除过量的 ROS^[77, 78]。最近的一项研究发现，过氧化氢是树脂单体处理细胞后细胞内产生的主要 ROS^[89]。GPx 催化过氧化氢的反应需要 GSH 作为底物，而树脂单体会消耗细胞内的 GSH，降低 GPx 的反应底物 GSH 的浓度，进而限制了 GPx 的活性。升高的过氧化氢含量会反馈性引起 CAT 活性的升高，并抑制

了 SOD 活性。NAC 可缓解树脂单体引起的细胞内 SOD、CAT 及 GPx 活性的紊乱，维持细胞的氧化还原平衡状态。NAC 的保护作用可能主要通过一下三方面机制实现：第一，NAC 作为一种具有强效抗氧化作用的小分子物质，能够穿过细胞膜进入细胞内，发挥有效抗氧化作用，直接灭活细胞内过量的 ROS，维持氧化还原平衡；第二，NAC 能够为细胞内 GSH 的合成提供巯基，促进 GSH 的合成，进而补充被树脂单体耗竭的 GSH；第三，NAC 中的巯基可能直接与树脂单体中的甲基丙烯酰基团发生麦氏加成反应，消耗具有毒性作用的甲基丙烯酰基团，进而缓解树脂单体对细胞的毒害作用。

综上所述，我们的研究发现，尽管化学结构不同，不同的树脂单体都具有细胞毒性。而它们的细胞毒性与细胞氧化应激有关。树脂单体可以导致细胞中氧化应激水平升高和抗氧化能力降低，使细胞易于受到过氧化损伤。NAC 可以缓解树脂单体的细胞毒性作用，维持细胞的氧化还原平衡。

实验二、内源性凋亡通路在树脂单体引起的细胞毒性中的作用

当细胞内的氧化还原平衡被打破，细胞处于氧化应激状态时，过量的 ROS 会攻击细胞内 DNA，蛋白质和脂质等生物大分子。其中当 DNA 损伤过于严重而无法被修复时，会导致细胞凋亡的发生。实验一发现树脂单体可以引起细胞内 ROS 水平的上升以及细胞内抗氧化应激系统的改变，但是这些改变是否会引起细胞凋亡的发生目前尚不明确。由于大量文献报道称线粒体内源性凋亡通路与细胞的氧化应激状态相关，因此本实验旨在探索树脂单体是否通过激活内源性凋亡通路导致细胞凋亡，同时探究能否通过添加 NAC 抑制凋亡的发生。

1 材料

1.1 主要试剂

- Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒（碧云天，中国）
- Caspase-3 活性检测试剂盒（碧云天，中国）
- 抗Bcl-2、Bax、p53、cleaved caspase-3、actin抗体（CST，美国）
- RIPA蛋白裂解液（碧云天，中国）
- PMSF蛋白酶抑制剂（碧云天，中国）
- β -巯基乙醇（Sigma，美国）
- 30%丙烯酰胺（碧云天，中国）
- 过硫酸铵（西安化学试剂厂，中国）
- Tris碱（华美，中国）
- PVDF膜（Millipore，美国）
- 预染蛋白Marker（碧云天，中国）
- Tween-20（碧云天，中国）
- ECL 发光试剂盒（碧云天，中国）
- 多聚甲醛（Sigma，美国）
- 苦味酸（Sigma，美国）
- Triton X-100（Sigma，美国）
- BAX抗体（博士德，中国）
- Cytochrome C抗体（碧云天，中国）
- Alexa Fluor 594 donkey-rabbit（Life，美国）

- Alexa Fluor 488 donkey-mouse (Life, 美国)
- DAPI (Sigma, 美国)
- 其余主要试剂同第一部分。

1.2 主要仪器

- 制冰机 (Scotsman, 意大利)
- 紫外分光光度计 (BioTek, 美国)
- 电泳仪, 转膜仪 (BIO-RAD, 美国)
- JS-860A 自动凝胶成像仪 (上海培清, 中国)
- 激光共聚焦扫描显微镜 (Olympus, 日本)
- FLUOVIEW Viewer 图像处理软件 (Olympus, 日本)
- 其余主要仪器同第一部分。

2 方法

2.1 细胞凋亡检测

细胞样品准备同实验一测试 2.4.1。各组细胞处理 24 h 后按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书检测细胞凋亡情况：

- 1) 样本前处理: 弃去细胞培养上清, 用细胞刮将细胞刮下, 加入 α -MEM 培养液, 收集到 1.5 mL 的 EP 管中;
- 2) 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去培养液;
- 3) 弃去上清液, 加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞;
- 4) 分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色液和 10 μ L 碘化丙啶染色液, 用移液器混匀;
- 5) 25°C 室温下避光孵育 20 min, 使用铝箔进行避光, 上流式细胞仪分析。

2.2 Caspase-3 活性检测

细胞样品准备同实验一测试 2.4.1。各组细胞处理 24 h 后按照 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书进行 Caspase-3 活性的检测:

- 1) 将 pNA 标准品用标准品稀释液稀释为 0、10、20、50、100 和 200 μ M, 每个浓度取 100 μ L 用酶标仪测定 A405, 计算标准曲线。
- 2) 样品测量与计算如表 1-9 所示:

表 1-9 Caspase-3 活性的测定步骤

试剂名称 (μL)	空白对照	样品
检测缓冲液	40	40
待测样品	—	50
裂解液	50	—
Ac-DEVD-pNA (2 mM)	10	10
总体积	100	100

37°C 下孵育 60 min, 测定 A405, 将测出的 A405 (样品) 扣除空白对照的 A405 得出的数值代入到标准曲线方程中, 计算出样品 Caspase-3 的活性。实验样品蛋白浓度采用 BCA 法进行蛋白定量, 步骤同实验一 2.4.1。

2.3 免疫印迹实验

细胞样品准备同实验一。各组细胞处理 24 h 后通过 Western blot 检测 Bcl-2、BAX、p53 和 Caspase-3 等凋亡相关分子的表达情况。

2.3.1 总蛋白的提取及蛋白浓度测定

实验分组及细胞处理同实验一测试 2.4.1。将蛋白样品加至 1.5 mL EP 管中, 根据蛋白含量, 加入 5 \times 上样缓冲液及生理盐水至终浓度为 1 \times , 将 EP 管在沸水中煮 5 min 使蛋白变性待用。

2.3.2 蛋白电泳

- 1) 先配制 10% 的分离胶 (表 1-10), 用蒸馏水封口。放置约 30 min 分离胶凝固后, 倒掉蒸馏水, 用滤纸吸干, 灌注 6% 的浓缩胶 (表 1-11), 插入 0.75 mm 的成孔器, 待浓缩胶凝固 20 至 30 min, 拔出成孔器, 上样;
- 2) 加入足量电泳液, 每孔加入 20 μL 准备好的蛋白样品, 留一个泳道加入 marker;
- 3) 组装好电泳仪, 先在 80V 电压下电泳约 25 min 至蛋白跑至分离胶时, 将电压改为 120V。约 120 min 后, 溴酚蓝刚跑到分离胶底部即可终止电泳。

表 1-10 10%的分离胶配方

材料	使用量
去离子水	1.6 mL
30%丙烯酰胺溶液	2 mL
1.5M Tris (pH 8.8)	1 mL
10% SDS	0.05 mL
过硫酸铵溶液	0.05 mL
TEMED	2 μ L

表 1-10 6%的浓缩胶配方

材料	使用量
去离子水	1.4 mL
30%丙烯酰胺溶液	0.33 mL
1.5M Tris (pH 6.8)	0.25 mL
10% SDS	0.02 mL
10% 过硫酸铵溶液	0.02 mL
TEMED	2 μ L

2.3.2 转膜

- 1) 将胶块大小的 PVDF 膜在 100 % 甲醇中震荡 10 s，再用蒸馏水冲洗干净；
- 2) 按照阳极-海绵-滤纸-PVDF 膜-凝胶-滤纸-海绵-阴极的顺序，组装成“三明治”的结构；
- 3) 组装半干转膜仪，加入转膜缓冲液，并加入冰袋降温；
- 4) 恒流模式下 200 mA 转膜约 2 h；
- 5) 5% 的脱脂奶粉的封闭液中待用。

2.3.3 抗体标记及曝光

- 1) 25 $^{\circ}$ C 室温下，用 TBST 缓冲液清洗 3 至 4 次，每次 5 min；
- 2) 根据目的蛋白的不同分子量，裁剪 PVDF 膜；
- 3) 用 TBST 缓冲溶液适量稀释一抗，将配制好一抗工作液及相应 PVDF 膜放到塑料袋中，封口，4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜；
- 4) 次日，取出 PVDF 膜，用 TBST 缓冲液清洗 3 至 4 次，每次 5 min，用含 5% 的脱脂奶粉的封闭液适量稀释二抗，用配制好二抗工作液孵育 PVDF 膜，25 $^{\circ}$ C 室温下摇床孵育 1 h；

- 5) 取出 PVDF 膜，用 TBST 缓冲液清洗 3 至 4 次，每次 5 min;
- 6) 在避光条件下，配制发光工作液（A 液：B 液=1：1）2 mL。用滤纸吸干 PVDF 膜，滴加发光工作液，然后放置在扫描仪工作台上，启动系统，扫描仪采集图像，用 Quantity One 软件半定量分析。

2.4 免疫荧光实验

实验分组及细胞处理同实验一测试 2.4.1。各组细胞处理 24 h 后通过免疫荧光染色检测 BAX 和 Cyto C 在细胞内的表达及分布情况。实验步骤如下：

- 1) 细胞爬片：将盖玻片用浓硫酸过夜浸泡，洗净后再用无水乙醇过夜浸泡，之后高压消毒干燥。在超净实验台内用无菌镊子将盖玻片置于 24 孔培养板孔内，每孔放 1 片。选取第 3-6 代细胞，以 1×10^5 /孔的密度接种，培养 1-2 天，细胞汇合至约 80% 时，按照实验分组对细胞进行处理。24 h 后终止培养，开始免疫荧光染色。吸弃废液，PBS 洗 3 遍，每次 3 min;
- 2) 固定：细胞经 4% 多聚甲醛和 0.19% 苦味酸室温下固定 30 min。PBS 洗 3 次，每次 5 min。
- 3) 通透：0.3% TritonX-100 室温通透 15 min。PBS 洗 3 次，每次 5 min。
- 4) 一抗孵育：用 10% 山羊血清将两种一抗 Bax (rabbit, 1:200) 和 Cyto C (mouse, 1:50) 稀释到工作时的浓度，4°C 过夜。
- 5) 二抗孵育：第二天，吸去一抗，用 PBS 洗 3 次，每次 5 min。滴加二抗工作液（用 2% 山羊血清将两种二抗 Alexa Fluor 594 donkey-rabbit, 1:400 和 Alexa Fluor 488 donkey-mouse, 1:200 稀释到工作时的浓度），37°C 下避光孵育 30 min。
- 6) 复染：吸去二抗，用 PBS 洗 3 次，每次 5 min。滴加 DAPI 染细胞核。置于滴有甘油（丙三醇）的盖玻片上，封片。
- 7) 分析：在激光共聚焦扫描显微镜下以 20× 的放大倍率，用同一曝光度观察不同组别的细胞样本，使用 Olympus FLUOVIEW Viewer 软件采集并处理荧光照片。蓝色代表细胞核，红色荧光代表 BAX 蛋白，绿色荧光代表 Cyto C 蛋白。

2.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析，使用 GraphPad Prism 6 软件绘图，数据表现形式为均数±标准差 (mean ± SD)，以 one-way ANOVA 进行分析， $P <$

0.05 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 树脂单体导致细胞凋亡及 NAC 对细胞的保护作用

不同浓度的树脂单体和 NAC 共同处理细胞 24 h 后, Annexin V-FITC/PI 双标法检测各组细胞凋亡情况。如图 1-6 所示:暴露于树脂单体后,活细胞的百分比呈剂量依赖性的减少 ($P > 0.05$),早期凋亡和晚期凋亡/坏死细胞的百分比升高 ($P > 0.05$)。单独用 NAC 处理细胞对细胞存活情况无显著影响。与树脂单体单独处理组相比, NAC 与单体共同处理细胞时可显著提高存活细胞的百分比 ($P > 0.05$),同时降低早期凋亡和晚期凋亡/坏死细胞的比例 ($P > 0.05$)。

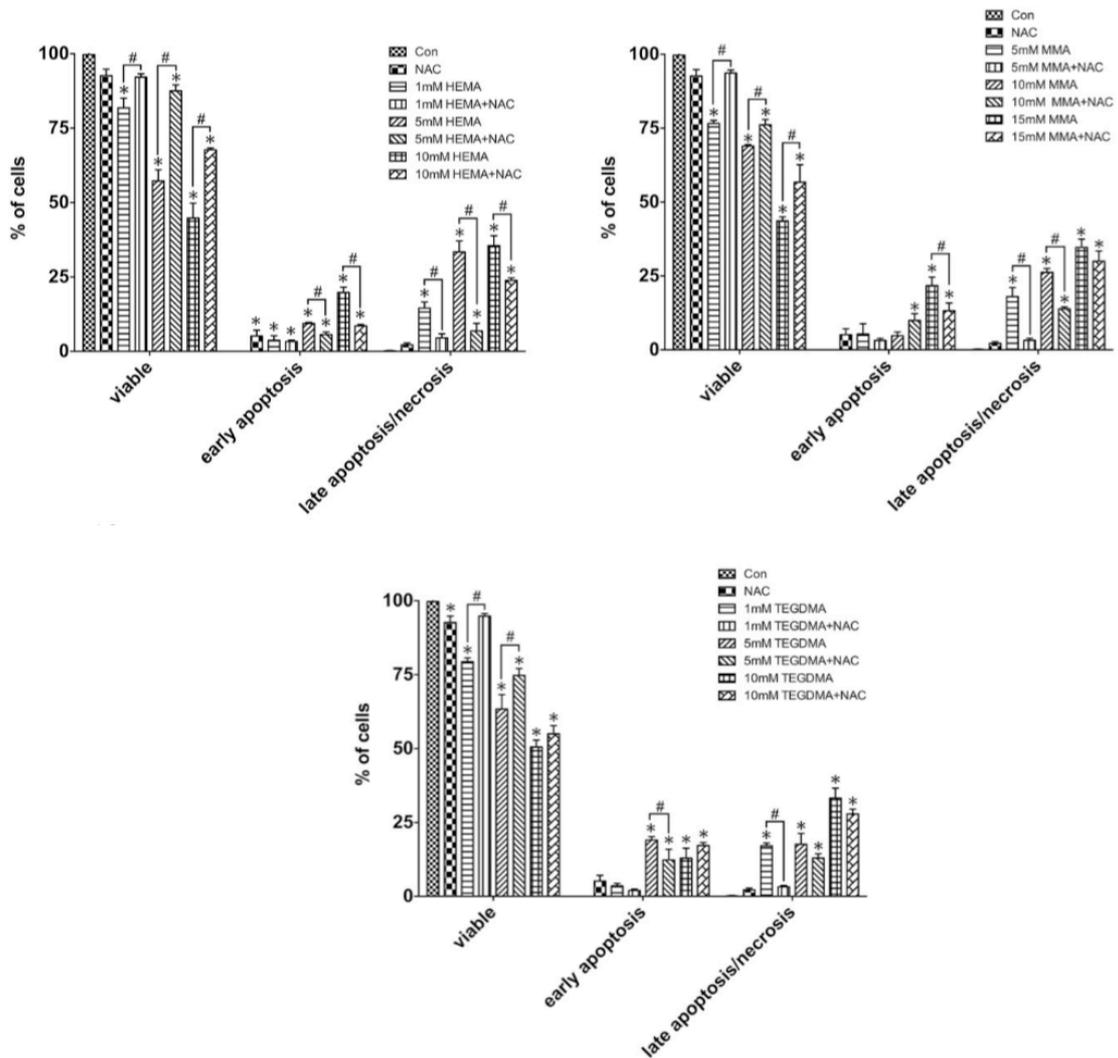


图1-6 树脂单体和 NAC 对细胞凋亡和坏死的影响

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, $N=3$)

Caspase-3 在细胞凋亡的过程中起着重要的作用^[117, 118]。我们发现, 单体处理细胞 24 h 后, 细胞内的 Caspase-3 活性显著升高, 具有统计学意义($P < 0.05$; 图 1-7); 而 NAC 可以抑制 Caspase-3 的激活 ($P < 0.05$)。

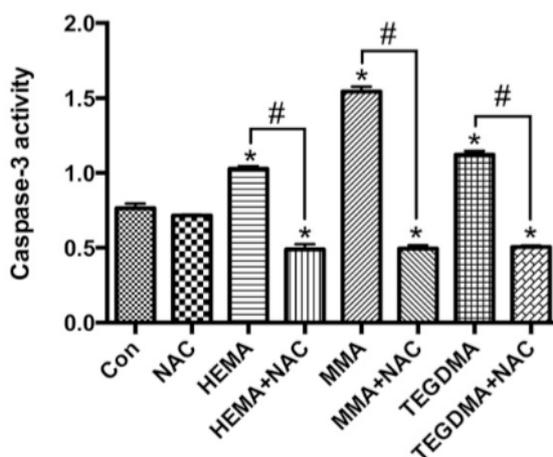


图1-7 树脂单体和 NAC 对细胞 Caspase-3 活性的影响

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, $N=3$)

3.2 树脂单体导致细胞发生内源性凋亡

Bcl-2 蛋白家族在内源性凋亡通路中起着重要作用, 其中 Bcl-2 和 Bax 分别具有抑制凋亡和促进凋亡的作用^[119], 而 p53 是内源性凋亡通路一个关键的调控分子^[120]。Western blot 实验发现, 单体处理后, 细胞内 Bcl-2 的表达水平下调 ($P < 0.05$; 图1-8), 而 Bax, p53 和激活型 Caspase-3 的表达上调 ($P < 0.05$)。而用 NAC 与单体共同处理细胞可以拮抗单体的上述作用。

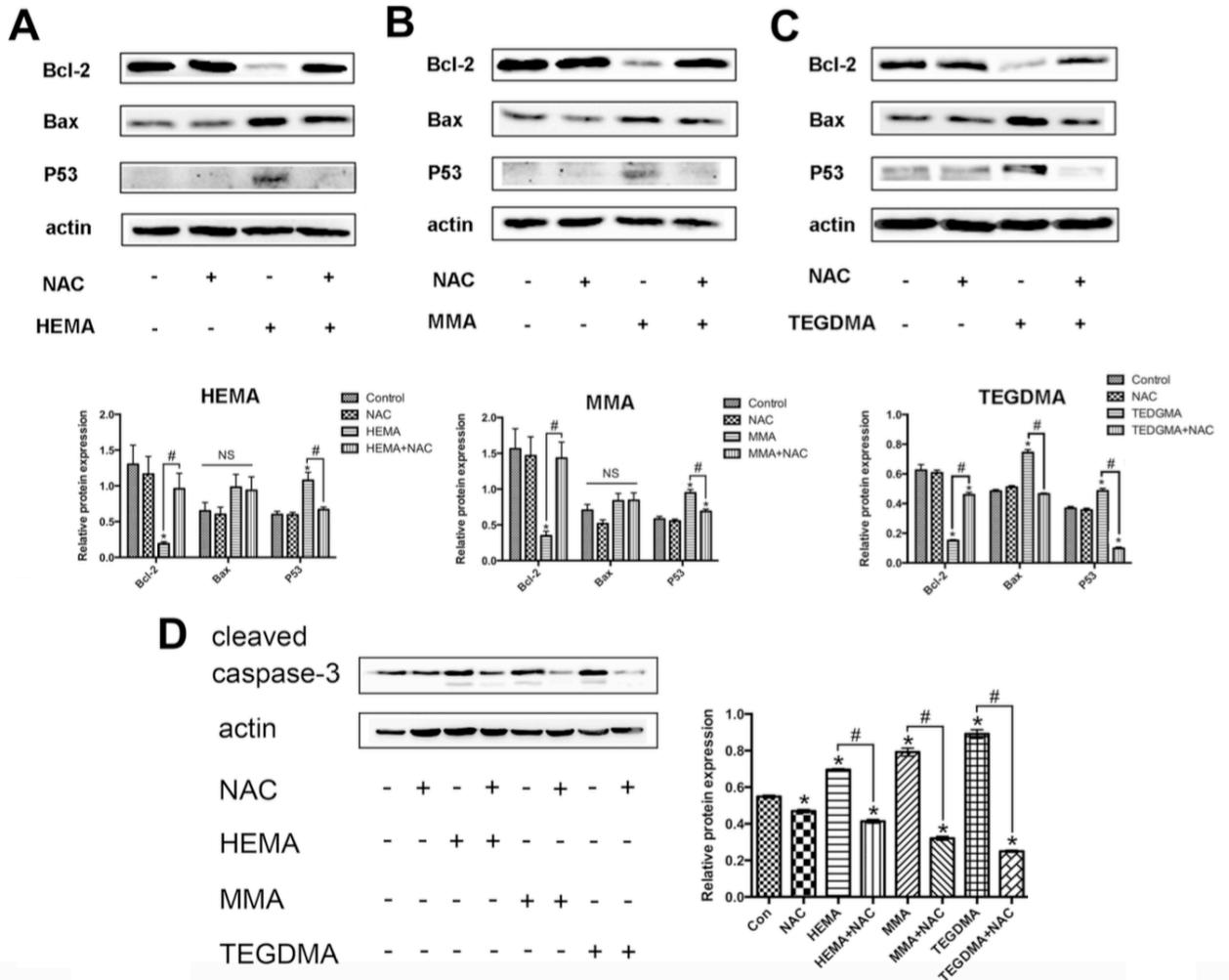


图1-8 树脂单体和 NAC 对细胞内源性凋亡通路调控分子表达的影响

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$,

N=3)

我们用细胞免疫荧光检测 Bax 和 Cyto C 蛋白表达及分布情况。如图 1-9 所示, 在对照组里, 点状的 Bax 的绿色荧光出现在细胞质中, 而红色的 Cyto C 出现在线粒体里。单体处理后, Bax 的绿色荧光转移到线粒体上, 而 Cyto C 的红色荧光弥漫地分布在细胞质中。NAC 可以抑制这两种蛋白的移位。

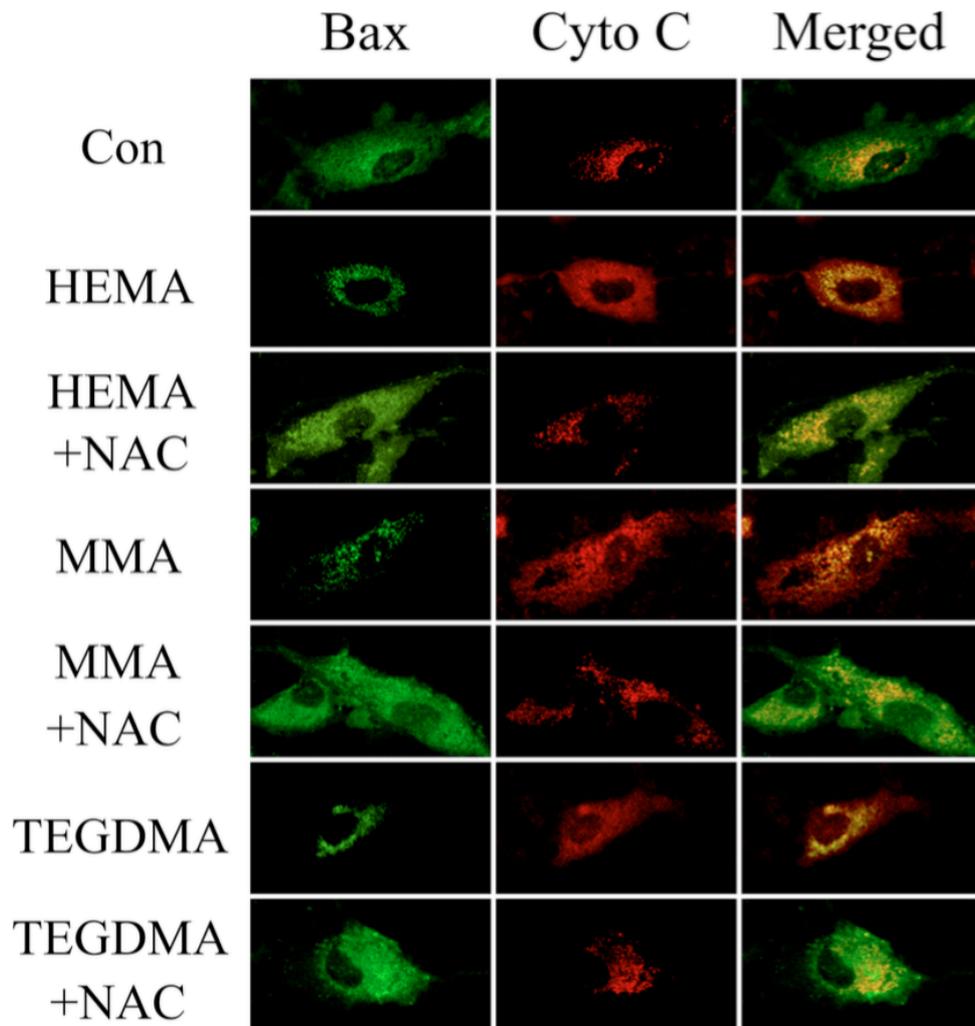


图1-9 树脂单体和NAC对细胞Bax和Cyto C蛋白表达及分布情况的影响

4 讨论

本实验中，我们发现，树脂单体剂量依赖性的减少存活细胞的百分比，同时增加早期凋亡和晚期凋亡 / 坏死细胞的百分比。此外，树脂单体增强细胞内 Caspase-3 的活性。这些结果都与之前文献的结果相一致^[121]。然而，尽管目前公认牙科单体可以引起细胞凋亡，但具体的途径尚未完全知晓。细胞凋亡是指为维持内环境的稳态，细胞自主的有序性死亡。细胞凋亡是一个复杂的过程，其主要表现包括细胞皱缩，染色质浓缩和染色体DNA的降解^[122]。单体引起的过量 ROS 可以攻击 DNA 分子，导致 DNA 双链破坏，进而激活 p53 蛋白。因此，我们猜想单体引起的细胞凋亡可能与 p53 蛋白相关。Western blot 的结果发现牙科单体处理后 p53 的表达显著增

高，这证实了我们的猜想。p53 在内源性凋亡通路中起着重要的作用，它通过转录依赖和转录非依赖的机制调节 Bcl-2 家族的蛋白^[123]。我们发现单体下调了抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达，而上调了促凋亡蛋白 Bax 的表达。同时，下游的 Caspase-3 活性增强，激活型 Caspase-3 的表达上调。Bcl-2 家族的抑凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 在内源性凋亡中起着重要的作用。细胞接受凋亡信号后，Bcl-2 家族蛋白改变其定位和表达，引起线粒体功能障碍，Cyto C 释放和 Caspase 家族成员的激活性，并最终导致细胞发生凋亡^[124]。事实上，细胞免疫荧光检测发现，单体使 Bax 从胞浆转移到线粒体，而 Cyto C 从线粒体转移到胞浆。综上所述，我们的研究发现，牙科单体导致细胞发生内源性凋亡，而导致这一现象的根源是 ROS 的过量产生。

实验三、树脂单体对线粒体结构和功能的影响

在实验二中，我们发现，树脂单体产生的过量 ROS 能够引起细胞发生内源性凋亡。线粒体是内源性细胞凋亡的控制中心。那么，树脂单体处理细胞是否会引起线粒体的结构和功能发生变化？对于这一问题，目前仍没有确切的答案。因此，在本实验旨在以 HEMA、MMA 和 TEGDMA 为代表，探讨树脂单体对线粒体结构和功能的影响。

1 材料

1.1 主要试剂

- Mito-Cyto Buffer (普利莱, 中国)
- 细胞色素C ELISA试剂盒 (西唐, 中国)
- ATP检测试剂盒 (碧云天, 中国)
- 线粒体膜电位检测试剂盒(碧云天, 中国)
- 其余主要试剂同实验一和实验二。

1.2 主要仪器

- 透射电镜 JEOL JEM-1230 及成像系统 (JEOL, 日本)
- 其余主要仪器同实验一和实验二。

2 方法

2.1 ATP 水平检测

细胞分组，胞裂解液制取同实验一测试 2.4.1。按照分组处理细胞，24 h 后按照 ATP 检测试剂盒说明书中步骤评价细胞内 ATP 水平:

- 1) 绘制测定标准曲线: 在冰浴上, 把 ATP 标准溶液用 ATP 检测裂解液稀释成 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 和 10 $\mu\text{mol/L}$;
- 2) 配制 ATP 检测工作液: 在冰浴上, 按照 1:9 的比例用 ATP 检测试剂稀释液稀释

ATP 检测试剂;

3) 测定样品 ATP 浓度:

- a) 加 100 μL ATP 检测工作液到检测孔内。室温下, 放置 3-5 min;
- b) 在检测孔内加 20 μL 样品或标准品, 迅速混匀,
- c) 根据标准曲线计算出样品中 ATP 的浓度, 根据测定样品中的蛋白浓度将 ATP 的浓度换算成 nmol/mg 蛋白的形式。

2.2 透射电镜观察

按照细验一测试 2.4.1 的分组情况对细胞进行相应处理, 24 h 后常规制备透射电镜样本, 观察细胞内线粒体的超微形态

- 1) 样品准备与固定: 细胞处理 24 h 后, 弃掉细胞培养液, 用 PBS 清洗后, 胰酶消化, 终止后 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再用 PBS 清洗 1 遍, 加入 1% 锇酸固定, 4°C 固定 2-3 h;
- 2) 样品脱水: 4°C 下 50% 的酒精处理样本 15-20 min; 弃掉 50% 的酒精, 再用 70% 的酒精处理 15-20 min; 弃掉 70% 的酒精, 再用 90% 的酒精处理 15-20 min; 弃掉 90% 的酒精, 再用 90% 乙醇和 90% 丙酮的混合液 (1:1) 处理 15-20 min; 再用 90% 的丙酮处理 15-20 min; 最后在室温 25°C 下, 用 100% 丙酮处理 3 次, 每次 15-20 min。
- 3) 样品包埋: 弃掉脱水液, 用 100% 丙酮和包埋液的混合液 (2:1) 在室温 25°C 下处理样品 3-4 h; 再用 100% 丙酮和包埋液的混合液 (1:2) 在室温 25°C 过夜; 最后用 100% 的包埋液在 37°C 下处理样品 2-3 h;
- 4) 样品固化, 切片与染色: 37°C 下, 样品在烘箱内过夜; 次日, 在 45°C 烘箱内干燥 12 h, 在 60°C 烘箱内干燥 48 h。用超薄切片机将样品切片, 设定切片厚度为 70 nm。用 3% 醋酸铀和枸橼酸铅的混合液对样品染色。
- 5) 用透射电镜观察并照相。

2.3 胞浆细胞色素 C 检测

按照实验一 2.4.1 的分组情况对细胞进行相应处理, 24 h 后利用 ELISA 试剂盒检测细胞内 Cyto C 水平。具体操作步骤如下:

- 1) 细胞处理 24 h 后, 弃掉培养液, PBS 清洗后, 胰酶消化, 终止后 800 r/min 离

- 心 5 min, 弃上清, 再用 PBS 清洗1遍, 加入 Mito-Cyto Buffer, 处理 5 min 后, 800 r/min 离心 5 min, 收集上清 (细胞质) 后再次 4°C 下 1200 r/min 离心 10 min 待用。
- 2) 配制标准浓度: 将标准品用稀释液稀释成以下浓度5000、2500、1250、625、312.5、156.25、78.125、0 pg/mL, 每个浓度取 0.5 mL 加入到 1.5 mL EP 管中;
 - 3) 分别配制洗涤液工作液, 生物素化抗体工作液, 酶结合物工作液和发光底物工作液。
 - 4) 加样, 在酶标板中分别设定空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ L, 其余孔分别加入标准品或待测样品 100 μ L, 轻轻晃动混匀。用膜覆盖酶标板, 在 37°C 下孵育 90 min;
 - 5) 弃去孔内液体, 每孔中加入生物素化抗体工作液 100 μ L, 再次用膜覆盖酶标板, 在 37°C 下孵育1 h;
 - 6) 弃去孔内液体, 甩干, 用洗涤液工作液洗板 3-5 次, 每次浸泡 1-2 min, 用吸水纸吸干孔内液体;
 - 7) 每孔中加入酶结合物工作液, 用膜覆盖酶标板, 在 37°C 下孵育 30 min;
 - 8) 弃去孔内液体, 甩干, 用洗涤液工作液洗板 3-5 次, 方法同步骤 6;
 - 9) 每孔中加入发光底物工作液 100 μ L, 用膜覆盖酶标板, 在 37°C 下避光孵育 5 min;
 - 10) 立即用化学发光免疫分析仪测定各孔的化学发光值。

2.4 线粒体膜电位检测

按照实验一 2.4.1 的分组情况对细胞进行相应处理, 24 h 后按照线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 说明书检测各组线粒体膜电位情况。具体操作步骤如下:

- 1) 取适量 JC-1 (200 \times), 按照试剂盒说明书配制 JC-1 染色工作液。
- 2) 弃去细胞培养上清, 用细胞刮将细胞刮下, 将其收集到 1.5 mL 的 EP 管中, 1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清;
- 1) 37°C 细胞培养箱中用 JC-1 染色工作液孵育细胞 20 min;
- 2) 孵育结束后, 1000 r/min, 离心 5 min, 加入适量 JC-1 染色缓冲液 (1 \times) 重悬细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 上流式细胞仪分析。

2.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 6 软件绘图, 数据表现形式为均数 \pm 标准差 (mean \pm SD), 以 one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 树脂单体对线粒体结构的影响

TEM 观察结果如图 1-10 所示显示, 对照组和 NAC 处理组的细胞形态正常, 线粒体内外膜完整, 线粒体嵴连续。单体处理后, 部分细胞出现核边聚, 核染色体固缩等细胞凋亡的标志。同时, 线粒体内外膜和线粒体嵴的完整性被破坏。用 NAC 与树脂单体共同处理组尽管仍有少量细胞的线粒体嵴的形态一场, 但线粒体内外膜完整性得到保存。

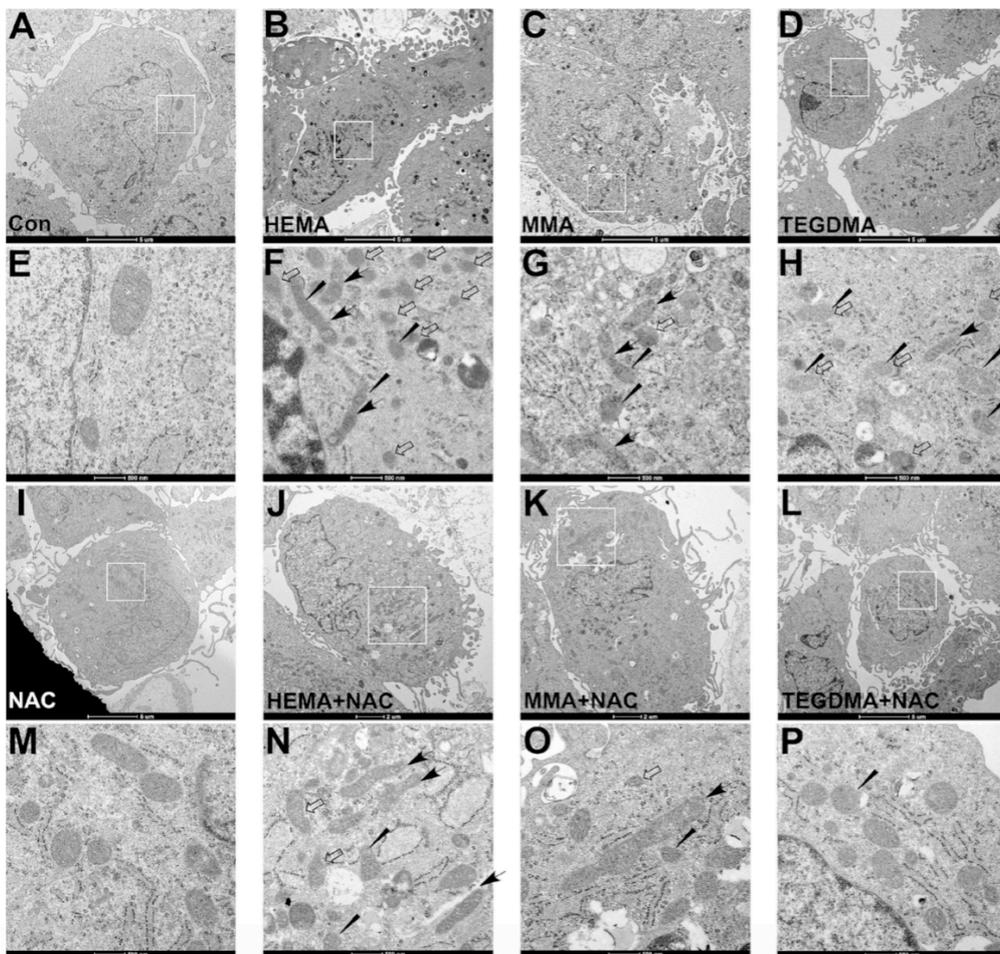


图1-10 树脂单体和 NAC 对细胞线粒体形态的影响

3.2 树脂单体对线粒体功能的影响

我们发现，暴露于单体 24 h 后，细胞内的 ATP 水平明显低于对照组，且具有统计学差异 ($P < 0.05$; 图 1-11A)。而 NAC 共处理可以恢复 ATP 水平。线粒体膜电位的丧失是内源性凋亡通路的重要生物指标。如图所示，单体处理细胞 24 h 后，与对照组相比，线粒体膜电位丧失的细胞比例显著增高 ($P < 0.05$; 图 1-11B)，同时胞浆中 Cyto C 的水平也显著增高 ($P < 0.05$; 图 1-11C)。用 NAC 共处理后，可以部分恢复升高的线粒体膜电位丧失的细胞比例同时减少胞浆中 Cyto C 的水平。同时线粒体膜结构的破坏还会导致蛋白的表达及分布情况发生改变。在实验二中我们发现，单体处理后，原本表达在细胞质中的 Bax 转移到线粒体上，而 Cyto C 从线粒体转移到细胞质。

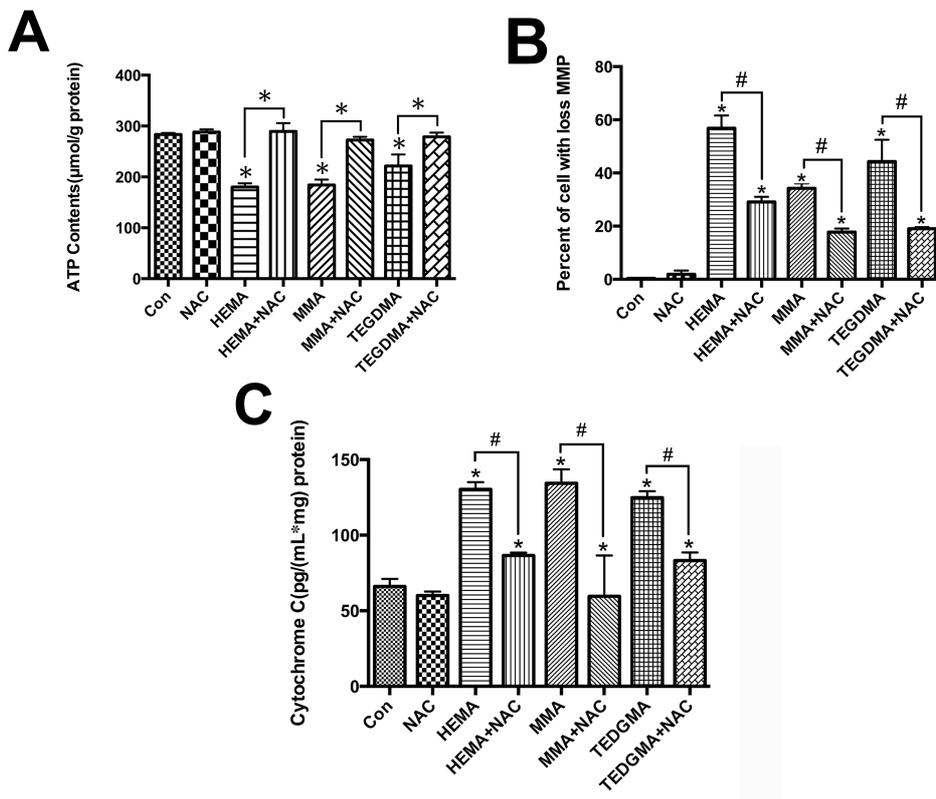


图1-11 树脂单体和 NAC 对线粒体功能的影响

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$,

N=3)

4 讨论

在实验一及实验二中，我们发现树脂单体能够引起细胞内氧化还原平衡的破坏，进而导致细胞发生内源性凋亡。鉴于线粒体是细胞内源性凋亡的控制中心，我们猜想，树脂单体可能对线粒体的形态和功能也会造成损害。我们首先通过透射电镜观察树脂单体处理后细胞和线粒体的形态，发现单体可以导致线粒体内外膜和线粒体嵴的破坏。这一结果与之前学者的研究结果相一致。Lefevre等发现树脂单体TEGDMA可以导致线粒体的损伤^[125]。线粒体是真核生物进行有氧代谢，产生ATP的主要场所^[126]。线粒体结构的破坏不可避免的会影响到它的功能。我们发现树脂单体处理后，细胞内ATP水平明显降低，线粒体参与能量代谢的功能受到抑制。线粒体内外膜结构的破坏会导致线粒体膜电位丧失。通透性升高。这一过程受到内源性凋亡途径Bcl-2家族蛋白的调控。促凋亡亚家族成员Bax表达的升高会引起细胞内Bcl-2与Bax比例的失衡，同时Bax重新分布，有细胞浆内的弥散分布状态转变为在线粒体外膜的集中分布，进而进一步增加线粒体外膜的通透性。与Bax相反，生理状态下Cyto C分布于线粒体内外膜间的膜间隙中，而当细胞发生内源性凋亡、线粒体外膜通透性升高时，Cyto C会从线粒体膜间隙释放到胞浆，进而激活Caspase家族的蛋白，通过Caspase依赖性或非依赖性途径引起细胞最终发生死亡。NAC可能通过中和ROS、补充GSH及减少活性甲基丙烯酰基团等机理拮抗树脂单体对线粒体结构和功能的破坏，进而保护细胞。本实验证实树脂单体引起细胞发生内源性凋亡的同时，会导致线粒体结构和功能的破坏。

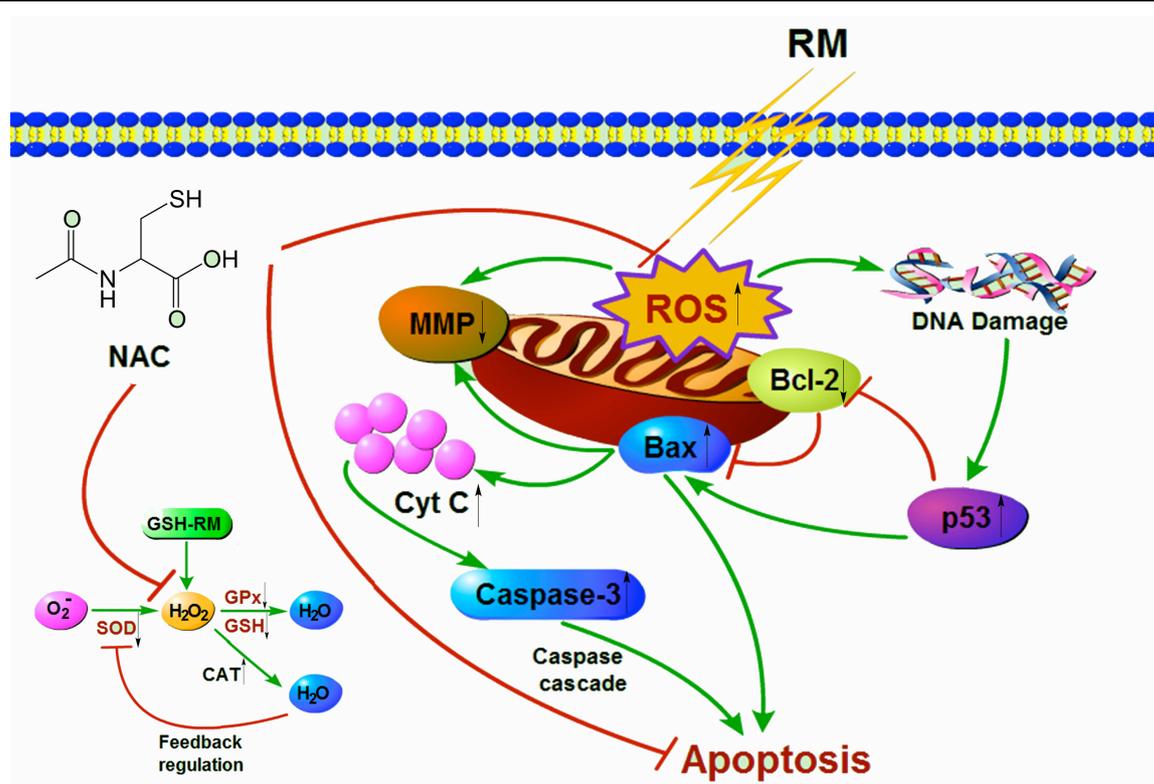


图 1-12 树脂单体导致细胞氧化应激和细胞凋亡以及 NAC 对细胞的保护作用 (RM: 树脂单体; GSH-RM: 树脂单体和谷胱甘肽的反应产物)

如图 1-12 所示，结合实验一和实验二的结果，我们发现，牙科单体的细胞毒性与细胞氧化应激有关，牙科单体可以导致细胞中氧化应激水平升高和抗氧化能力降低，导致线粒体的结构和功能受到影响，进而激活了牙科单体内源性凋亡通路，导致细胞凋亡的发生。而抗氧化剂 NAC 可以通过消除牙科单体产生的过量 ROS，抑制牙科单体引起的细胞氧化应激和内源性凋亡以及其对线粒体结构和功能的破坏，从而保护细胞。

第二部分、添加 NAC 对 PMMA 牙科树脂 生物相容性及机械性能的影响

自凝树脂是牙科临床常用的生物医学材料。它由两部分组成的：粉剂和液剂。其中粉剂又叫牙托粉，其主要成分是聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）；液剂又叫牙托水，其主要成分甲基丙烯酸甲酯单体（MMA）。临床应用时，将二者按照商品说明书上的比例混合均匀，通过内部的化学反应在室温下能够固化。自凝树脂主要用于制作暂时冠桥、暂时冠桥正畸活动矫正器以及个别托盘等。

然而，有研究发现，在佩戴临时冠直接将自凝树脂放置在基牙上时，释放出来树脂单体可通过牙本质小管刺激牙髓，导致牙齿敏感、牙痛等症状^[127-129]。材料的生物相容性，是其应用于临床最基本的前提条件。生物医学材料不仅需要满足临床所需要的物理机械性能，还要保证对人体无害。因此，提高材料的生物相容性，是保证其临床广发应用的前提。

上一部分中在细胞水平证实树脂单体的细胞毒性与 ROS 的过量产生有关，而 NAC 可以拮抗牙科单体的细胞毒性，保护细胞。那么在临床常用的 PMMA 树脂中添加 NAC 是否能够降低材料的细胞毒性？又是否会影响材料体本身的机械性能？本部分将对这两个问题进行回答。

实验四、添加 NAC 对 PMMA 牙科树脂生物相容性的影响

本实验将不同比例的 NAC 加入 PMMA 自凝树脂中，旨在探讨 NAC 对 PMMA 自凝树脂生物相容性的影响。

1 材料

1.1 主要试剂

- 自凝PMMA树脂（GC，日本）
- 其余主要仪器同第一部分。

1.2 主要仪器

- 高效液相色谱仪（Shimadzu，日本）
- 扫描电子显微镜（Hitachi，日本）
- 其余主要仪器同第一部分。

2 方法

2.1 实验树脂的制备

- 1) 将 NAC 用去离子水溶解，配制成 1.0 mol/L 的标准溶液，用 HEPES 缓冲液，将 NAC 标准液的 pH 调整为 7.2。
- 2) 在室温 25°C 下，按厂商提供的粉液比（1.0 g: 0.5 mL），先将牙托水倒入 12 孔板，再将牙托粉缓慢倒入盛有牙托水的 12 孔板中，边倒边轻轻震荡，使粉充分浸入牙托水中，用调拌刀混合均匀。分别树脂中加入 0、13.8、27.6、55.2 和 82.8 μL 的 NAC 标准液，配制成含 0、0.15、0.3、0.6、0.9 wt.%NAC 的实验树脂。
- 3) 在室温 25°C 下，固化 30 min 后，用去离子水冲洗。

2.2 浸提液的制取

向含有树脂试件的孔穴中加入适量不含胎牛血清的 α -MEM 培养液，根据 ISO

10993-12:2007 标准,使树脂样品的表面积与加入 α -MEM 培养液的比为 $1.25 \text{ cm}^2/\text{mL}$ 。在 37°C 下, $5\% \text{ CO}_2$ 的条件下孵育。24 h 后, 吸取培养液, 过滤除菌, 加入 10% 的胎牛血清后待用。

2.3 高效液相色谱仪 (HPLC) 检测

- 1) 将 NAC 用去离子水溶解, 配制成 2 mg/mL 的标准溶液。将标准溶液用去离子水稀释成五个浓度梯度, 分别为 1、0.8、0.6、0.4、0.2 mg/mL ;
- 2) 首先利用高效液相色谱仪对 NAC 梯度标准溶液进行检测, 绘制 NAC 浓度与峰面积的标准曲线。然后对含 0.9 wt.% NAC 的实验树脂浸提液 (不含胎牛血清) 进行检测。流动相为甲醇+0.1 M 高氯酸钠+2%磷酸, 流速 0.7 min/mL 进样体积为 $20 \mu\text{L}$, 柱子型号 Inertsustain C18 ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250 \text{ mm}$), 柱子保持 50°C ;
- 3) 根据标准曲线计算 0.9 wt.% NAC 的实验树脂浸提液中 NAC 的含量。

2.4 细胞增殖实验

人牙髓细胞的原代培养方法同实验一。在 96 孔培养板接种细胞, 细胞悬液浓度为 5×10^3 个/mL, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 培养约 24 h 使细胞贴壁并达到 80% 融合后, 弃去培养液, 用含 0、0.15、0.3、0.6 和 0.9 wt. % NAC 的实验树脂浸提液 (含胎牛血清) $100 \mu\text{L}$ 培养细胞 24 h。CCK-8 检测细胞增殖情况, 实验步骤同实验一。根据实验 2.3 的结果, 我们计算出含 0.9 wt.% NAC 的实验树脂浸提液中 NAC 的含量约为 0.54 mM。为了观察这一浓度的 NAC 本身是否对细胞有毒性作用, 我们配制了 0.54 mM 的 NAC 溶液, 用其培养细胞 24 h 后对细胞增殖情况进行检测。

2.5 细胞粘附实验

- 1) 利用模具制作直径 10 mm, 厚 2 mm 的树脂片。去离子水清洗, 环氧乙烷灭菌备用;
- 2) 实验树脂片置于 6 孔板中, 将 hDPCs 以 5×10^3 个/mL 的浓度接于树脂片上, 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的条件下培养;
- 3) 24 h 后, PBS 轻轻冲洗, 然后用 2.5 %戊二醛固定 24 h, 乙醇梯度脱水 (50%、75%、85%、95%和 100%);
- 4) 由第四军医大学电镜中心实验室制样, 并用扫描电子显微镜拍照^[104]。

2.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析,使用 GraphPad Prism 6 软件绘图,数据表现形式为均数 \pm 标准差 (mean \pm SD),以 one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 高效液相色谱仪定量释放的 NAC

图2-1分别是NAC标准溶液 (0.1 mg/mL) 和含有 0.9 wt.% NAC 的实验树脂的浸提液的代表性高效液相色谱仪结果。我们通过曲线的所对应的保留时间来识别 NAC 峰。根据标准溶液检测结果绘制 NAC 峰面积 (A) 与浓度 (c) 的标准曲线: $A = a 27053c + 48133$ 。根据标准曲线我们计算出含有 0.9 wt.% NAC 树脂浸提液中 NAC 的浓度为 0.54 ± 0.02 mM。

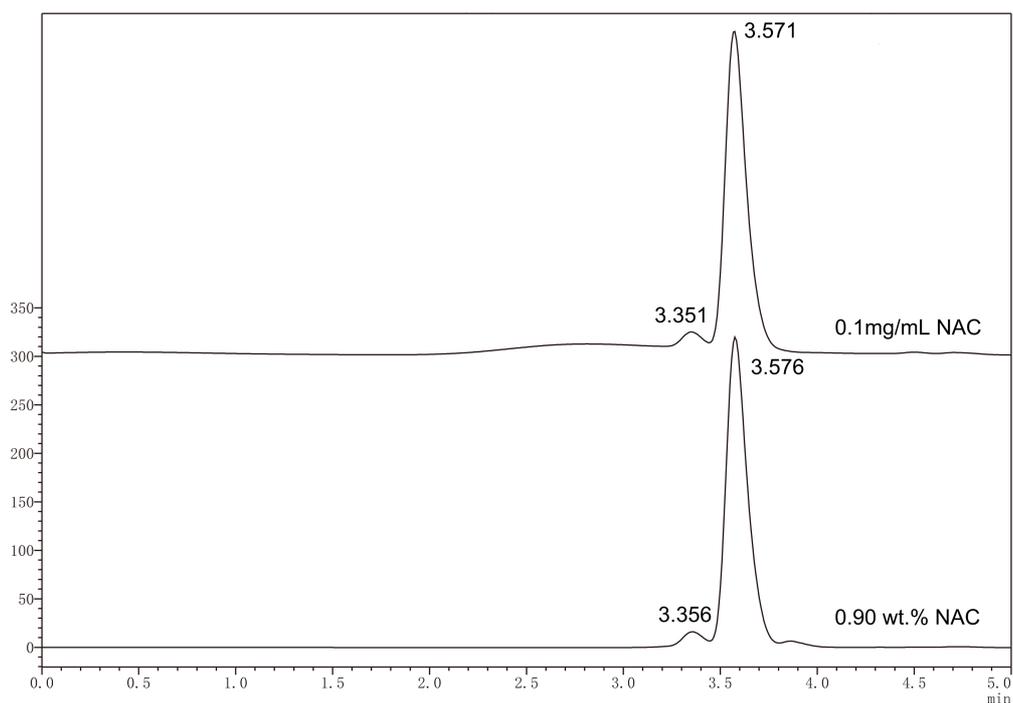


图2-1 高效液相色谱仪

3.2 细胞增殖实验

CCK-8 实验结果显示, 在第 3 天和第 7 天, PMMA 树脂浸提液组的存活细胞比例显著低于对照组, 并且具有统计学差异 ($P > 0.05$)。加入 NAC 的实验 PMMA 树脂的浸提液处理细胞后, 存活细胞比例显著高于对照 PMMA 树脂, 且 NAC 添加比例越高, 细胞存活比例越高。在第 7 天, 含 0.15 wt.% NAC 的实验树脂浸提液组的细胞增殖率为 77%, 是对照 PMMA 树脂组的 10 倍 ($P > 0.05$; 图 2-2A)。含 0.9 wt.% NAC 的 PMMA 树脂浸提液组的细胞增殖率最高, 分别在第 3 天和第 7 天达到 95.6% 和 97.6%。而单独用 0.54 mM NAC 对细胞的细胞增殖无明显影响 ($P > 0.05$; 图 2-2B)。

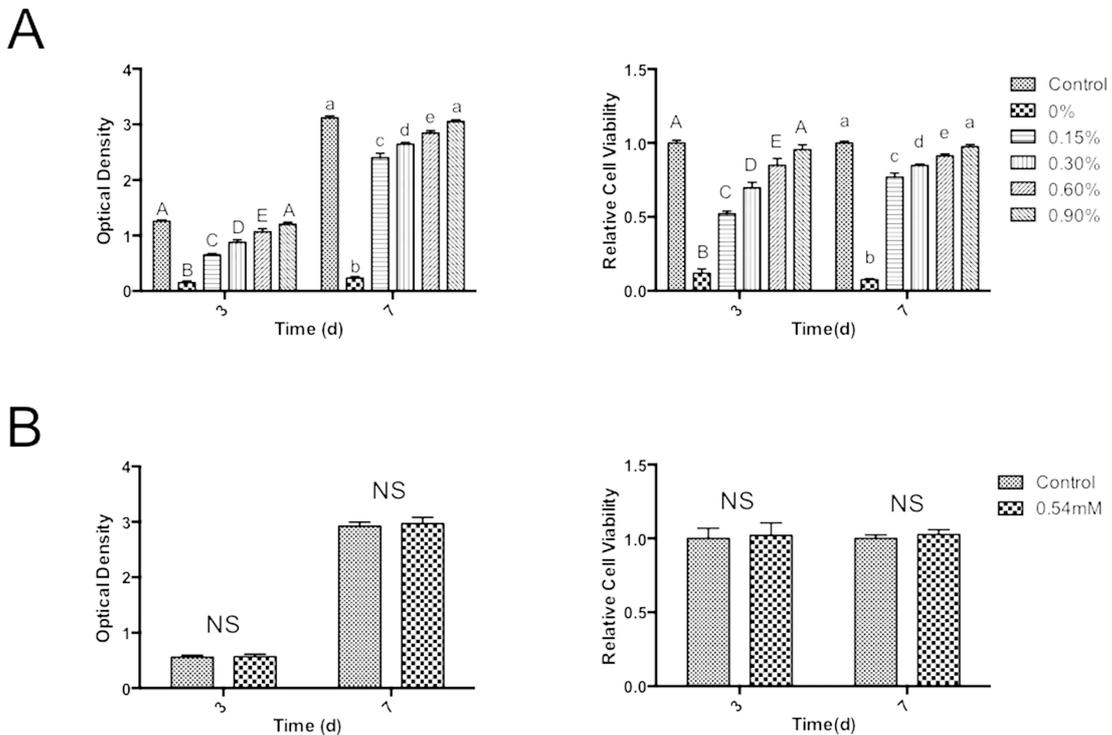


图2-2 PMMA 树脂浸提液对 hDPCs 细胞增殖的抑制作用以及 NAC 对细胞的保护作用 (不同的字母代表各组之间的差异有统计学意义, $P < 0.05$, $N=3$; NS 代表无明显统计学统计学意义)

3.3 细胞粘附实验

图2-3显示的是人牙髓细胞在培养1天时试样表面粘附的情况。在对照 PMMA 树脂组和含 0.15 wt.% NAC 的 PMMA 树脂组, 细胞生长不良, 呈圆形。当 NAC

在 PMMA 树脂中的添加量大于等于 0.3 wt.% 时, 细胞能够在实验树脂表面良好生长, 并呈现出典型的长梭形或多角形的形态。实验 PMMA 树脂中添加的 NAC 越多, 粘附的细胞数目越多。在含 0.9 wt.% NAC 的 PMMA 树脂组中, 细胞几乎覆盖满试件的表面。

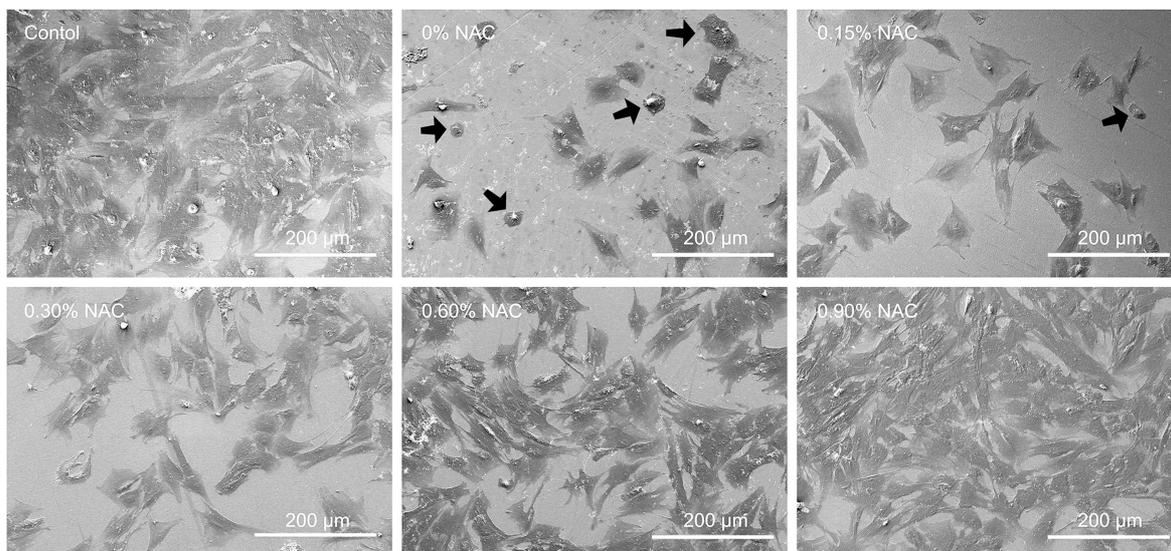


图2-3 hDPCs 在 PMMA 树脂试件表面粘附情况

4 讨论

生物学材料应用于临床最基本的前提条件, 应是对人体无害, 因而探讨提高生物材料生物相容性的策略是十分必要的。

CCK-8 细胞增殖实验结果显示, 对照 PMMA 树脂浸提液会导致细胞的大量死亡。在第 3 天和第 7 天, PMMA 树脂浸提液组的存活细胞比例分别为 12% 和 7.6%, 这提示我们 PMMA 树脂具有较强的细胞毒性。这一结果与许多学者的研究结果相一致^[130-134]。在实际情况下, 单体的聚合度并不能达到 100%^[135, 136], 而这些未聚合的残余单体会大量释放到口腔中, 成为单体细胞毒性的最要来源。根据我们第一部分的实验结果, MMA 等树脂单体可以导致细胞氧化应激, 进而通过相关信号通路导致细胞死亡。同时我们发现, 在 NAC 可以缓解树脂单体的细胞毒性作用。在本实验中, 我们将 NAC 添加到临床常用的 PMMA 自凝树脂中, 探讨 NAC 对其细胞毒性的影响。研究发现, 在 PMMA 树脂中加入 NAC 也可以显著降低自凝 PMMA 树脂的细胞毒性。这一研究结果与 Wael 等已发表的发现一致, 即添加 NAC

可显著改善细胞在树脂表面的及存活情况^[130]。为了进一步验证 NAC 对 PMMA 树脂细胞毒性的保护作用，我们用扫描电镜观察了细胞在试件表面的粘附情况。与细胞增殖实验结果类似，我们发现细胞在含 NAC 的 PMMA 树脂试件上的生长积黏附情况显著好于对照组，且 NAC 含量越高，实验树脂表面年付的细胞密度越高，形态越正常，在含 0.9 wt.% NAC 的实验 PMMA 树脂试件表面，细胞几乎完全覆盖试件。

我们利用高效液相色谱仪检测了含NAC的实验树脂浸提液中 NAC 的含量，发现添加了 0.9 wt.% NAC 的山岩树脂浸提液中NAC的浓度为 0.54 mM。根据这一结果，我们用 0.54 mM NAC 单独培养细胞，发现这一浓度的 NAC 本身对细胞的增殖无明显影响。这一结果提示我们，从实验 PMMA树脂中释放出的 NAC 本身并不会促进细胞的增殖，其是通过拮抗 MMA 等树脂单体的细胞毒性进而改善细胞在实验树脂表面的黏附及增殖情况的。

以上实验结果提示在自凝 PMMA 树脂中加入 NAC 可有效提高其生物相容性。

实验五、添加 NAC 对 PMMA 牙科树脂机械性能的影响

有学者发现，将无机物或有机物作为添加物加入自凝树脂中，可以赋予树脂更加优异的性能，但添加物的加入将会影响到原有树脂的机械性能。本实验旨在探讨 NAC 对 PMMA 牙科自凝树脂机械性能的影响。

1 材料

1.1 主要试剂

- 同实验四。

1.2 主要仪器

- 分析天平 (METTLER TOLEDO, 美国)
- 恒温水浴箱 (长安科学仪器厂, 中国)
- 电子数显卡尺 (桂林广陆, 中国)
- 干燥箱 (上海市实验仪器总厂, 中国)
- 电子万能实验机 (Shimadzu, 日本)
- 显微硬度仪 (泰明, 中国)
- 三维非接触式光学表面轮廓仪 (Nanovea, 美国)
- 不锈钢模具
- 其余主要仪器同实验四。

2 方法

2.1 双键转化率测定

实验分组同实验四，在室温 25°C 下，分别测定固化 0 min、5 min、10 min、20 min、30 min、1 h、4 h 和 24 h 后，实验 PMMA 树脂的双键转化率。测试采用衰减全反射-傅立叶红外光谱仪 (ATR-FTIR)，其仪器参数为：扫描次数为 32，分辨率为 6 cm⁻¹，

扫描范围是 4000-600 cm^{-1} 。测试时，将材料放置在 ATR 的测试头上并完全覆盖，扫描其红外光谱。每组制作试件 3 个。双键转化率（DC）的计算根据材料固化前后脂肪族 C=C 双键的峰值（位于 1638 cm^{-1} ， Abs_{ana} ）与芳香族 C=C 双键的峰值（位于 1608 cm^{-1} ， Abs_{ref} ）的比值来计算：

$$\text{DC}(\%) = \left[1 - \frac{(\text{Abs}_{\text{ana}}/\text{Abs}_{\text{ref}})_{\text{cured}}}{(\text{Abs}_{\text{ana}}/\text{Abs}_{\text{ref}})_{\text{uncured}}} \right] \times 100\%$$

2.2 挠曲强度(Flexual Strength, FS)

根据 ISO 4049:2009 标准，采用不锈钢模具，每组制作 12 个试件，试件的尺寸为 2 mm×2 mm×25 mm。实验分组同实验四。在室温 25°C 下，固化 24 h 后用 600 目水砂纸打磨试件各面，制成标准长方体。测量试件尺寸宽 W 和高 H (mm)，利用电子万能试验机上进行测试（压头半径 2.0 mm，跨距 L 为 20 mm，测试速度 1 mm/min），记录破坏力 P，试件的挠曲强度根据以下公式计算：

$$\text{FS} = \frac{3PL}{2wh^2}$$

2.3 扫描电镜观察

收集测试 2.2 中试件折断面干燥喷金后，用扫描电镜观测，实验方法同实验四 2.5。

2.4 表面硬度

每组随机选择 5 个试件，上下表面在流水冷却下依次用 100# 至 2000# 金刚砂砂纸打磨。去离子水清洗试件后利用显微硬度仪上测试维氏硬度值（Vickers test），载荷 25 g、载荷时间 25 s。

2.5 表面粗糙度

每组随机选择 3 个试件，上下表面在流水冷却下依次 100# 至 2000# 金刚砂砂纸打磨。去离子水清洗试件后利用三维非接触式光学轮廓仪扫描检测试件表面粗糙度。扫描区域为 2 mm×2 mm。

2.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析，使用 GraphPad Prism 6 软件绘

图, 数据表现形式为均数±标准差 (mean ± SD), 以 one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 添加 NAC 对 PMMA 树脂双键转化率的影响

我们采用衰减全反射-傅立叶红外光谱仪 (ATR-FTIR) 检测了添加不同比例的 NAC 的 PMMA 树脂的双键转化率。结果如表2-1所示, 在树脂固化的前10 min 里, 双键转化率显著增加。在 10 min 时, 各组的转化率在 41.0% 到 58.8% 之间。含 NAC 的 PMMA 树脂的转化率明显低于未加入 NAC 的对照 PMMA 树脂 ($P < 0.05$)。在 10 min 以后, 树脂的双键转化率增加速率较慢。在 24 h 时, 含0.15 wt% NAC 的 PMMA 树脂的转化率达到 75.2%, 与不含 NAC 的对照 PMMA 树脂无显著差异 ($P > 0.05$), 而含更高比例NAC的实验PMMA树脂的转化率均明显低于不含 NAC 的对照 PMMA 树脂 ($P < 0.05$)。

表 2-1 添加不同比例的 NAC 的 PMMA 树脂转化率 (不同的字母代表各组之间的差异有统计学意义, $P < 0.05$, $N=3$, mean ± SD)

NAC (wt%)	Degree of conversion (%)						
	5 min	10 min	20 min	30 min	1 h	4 h	24 h
0.00	33.5±1.2 ^A	61.0±0.1 ^A	64.9±0.6 ^A	67.8±0.2 ^A	71.5±0.6 ^A	72.8±0.8 ^A	76.5±0.2 ^A
0.15	27.5±0.9 ^B	58.9±0.1 ^{A,B}	62.1±0.4 ^B	65.2±0.3 ^B	69.0±0.8 ^B	70.8±0.8 ^{A,B}	75.2±0.23 ^{A,B}
0.30	27.1±0.3 ^B	58.3±1.1 ^{A,B,C}	61.6±0.1 ^{B,C}	65.6±0.5 ^{B,C}	68.7±0.4 ^{B,C}	70.2±1.4 ^{B,C}	74.2±0.7 ^{B,C}
0.60	26.4±1.0 ^B	56.3±1.5 ^{B,C,D}	61.6±0.3 ^{B,C}	64.9±0.4 ^{B,C}	68.6±0.3 ^{B,C}	69.3±0.3 ^{B,C}	73.9±0.8 ^{B,C}
0.90	22.7±0.5 ^C	55.0±1.5 ^D	60.0±0.4 ^D	63.4±0.2 ^D	65.8±0.1 ^D	64.9±0.3 ^D	72.1±0.6 ^D

3.2 添加 NAC 对 PMMA 树脂挠曲强度, 表面硬度和表面粗糙度的影响

实验结果如图2-4所示, NAC 的添加对 PMMA 树脂的挠曲强度, 表面硬度和表面粗糙度都有影响 ($P < 0.05$)。随着 NAC 添加量的增加, PMMA 树脂的机械强度逐渐降低。含 0.15 wt.% NAC 的 PMMA 树脂的挠曲强度 (91.0 ± 6.2 MPa) 与对照 PMMA 树脂 (95.9 ± 5.8 MPa) 无明显差异 ($P > 0.05$), 而含更高比例 NAC 的实验 PMMA 树脂的挠曲强度明显低于对照组 ($P < 0.05$), 其中含 0.9 wt.% NAC 的

PMMA 树脂的挠曲强度最低 (72.8 MPa, 图2-4A)。如图2-4B所示, 表面硬度和挠曲强度呈相似的趋势。含 0.15 wt.% NAC 的实验 PMMA 树脂的表面硬度与对照组无明显差异 ($P > 0.05$), 而含 NAC 比例更高的施压 PMMA 树脂的表面硬度则明显低于对照组 ($P < 0.05$)。如图2-4C所示, 含 0.15 wt.% 和 0.3 wt.% NAC 的 PMMA 树脂的表面粗糙度分别为 $0.60 \mu\text{m}$ 和 $0.86 \mu\text{m}$, 与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。但当添加量达到 0.6 wt.% 时, 树脂的表面粗糙度出现了明显升高 ($P < 0.05$)。挠曲强度测试试件折断面的扫描电镜观察如图 2-4D 所示, 对照组及含 0.15 wt.% NAC 的实验 PMMA 树脂的断面相对平滑。然而, 含 0.3 wt.% 或更比例 NAC 的实验 PMMA 树脂的断面可见大量的气泡存在。

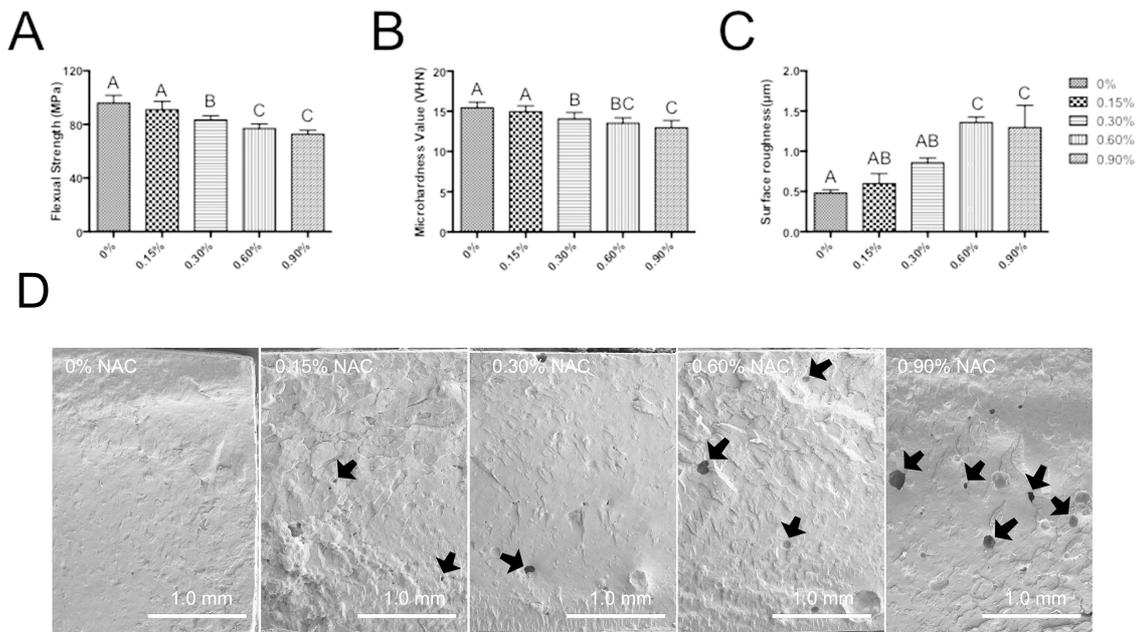


图2-4 添加NAC对 PMMA 树脂机械性能的影响 (不同的字母代表各组之间的差异有统计学意义, $P < 0.05$)

4 讨论

除了良好的生物相容性, 生物医学材料还需要满足临床所需要的物理机械性能, 这是保证其临床广发应用的前提^[93, 137-140]。实验四已证明, 添加 NAC 可以拮抗 PMMA 树脂的细胞毒性。然而添加物有可能影响到树脂本身的机械性能。本实验通过检测不同比例 NAC 的实验 PMMA 树脂的双键转化率、挠曲强度、表面硬度

和表面粗糙度，探讨 NAC 对 PMMA 树脂机械性能的影响。双键转化率的结果显示，PMMA 树脂的聚合呈现时间相关性。在树脂固化的前 10 min 里，双键转化率显著增加，并达到较高的水平。这与之前学者的研究结果一致^[141, 142]。在本实验中，我们发现在 10 min 时，未添对照组的转化率最高，而随着 NAC 添加量的增高，树脂的转化率逐渐降低。而在接下来的 10 min 到 24 h 这段时间内，树脂的双键转化率速率较慢。在 24 h 时，所有树脂的转化率都超过 70%。其中，含 0.15 wt.% NAC 的实验 PMMA 树脂的转化率与对照组无显著差异。含更高比例 NAC 的实验 PMMA 树脂的双键转化率显著低于对照组。造成树脂转化率下降的原因可能是 NAC 无法与 PMMA 树脂发生聚合。

虽然双键转化率并非决定牙科材料的机械性能的唯一因素，但较低的转化率通常与材料较差的机械性能相关。在本实验中，我们发现添加 NAC 会显著降低树脂的挠曲强度和表面硬度。观察测试试件折断面我们发现，添加过多的 NAC 会导致树脂中出现较多的气泡。这些气泡可能是未聚合的 MMA 单体或 NAC 释放后残余的。这些气泡的存在导致树脂试件挠曲强度和表面硬度的下降。同时，当气泡存在于树脂试件的外表面时，也会导致表面粗糙度的增加。尽管添加过多的 NAC 会影响 PMMA 树脂的挠曲强度，表面硬度和表面粗糙度，但 NAC 的添加比例相对较低时，其对树脂的机械性能的影响较小。比如含 0.15 wt% 和 0.3 w% NAC 的 PMMA 树脂的挠曲强度分别是 91.0 MPa 和 83.3 MPa，均高于 ISO 关于自凝牙科修复材料的标准（80 MPa）。尽管 ISO 关于材料的表面硬度无明确的标准，但我们发现，含 0.15 w% NAC 的 PMMA 树脂的表面硬度与对照组无明显差异。此外含 0.15 w% NAC 的 PMMA 树脂的表面粗糙度为 0.60 μm 。根据文献的报道表面粗糙度低于 0.75 μm 就可以被认为是光滑表面，可以用来作为牙科修复材料^[143, 144]。

总而言之，虽然加入过多的 NAC 会影响 PMMA 树脂的机械性能，但限制 NAC 的添加量在 0.15 w% 既可以提高树脂的生物相容性，同时不显著影响其机械性能。

第三部分、Nrf2 信号通路在缓解牙科单体细胞毒性的作用研究

在第一部分，我们在细胞水平证实尽管不同的树脂单体的化学结构不同，但它们的细胞毒性都与 ROS 的过量产生有关，NAC 可以拮抗树脂单体的细胞毒性。

以往关于树脂单体细胞毒性作用机制的研究，多集中于其所引起的细胞内 ROS 的过量产生以及细胞的过氧化损伤，而很少有学者关注细胞暴露于树脂单体后，其自我防御系统的变化。氧化应激是众多疾病发生的病理生理基础。Nrf2 信号通路是机体针对过氧化损伤最重要的机制^[145]。目前关于 Nrf2 信号通路与树脂单体的细胞毒性关系的研究较少，但大量研究显示，Nrf2 信号通路在多种氧化应激相关疾病的发生和发展之中发挥关键作用。因此，本部分实验的目的是探讨 Nrf2 通路对树脂单体细胞毒性的影响，并以此为基础为改善树脂基牙科修复材料治疗效果提供理论及实验依据。

实验六、干预 Nrf2 信号通路对牙科单体的细胞毒性及氧化应激的影响

在第一部分中我们证实细胞暴露于树脂单体后，主要的抗氧化酶 SOD，GPx 和 CAT 的活性都发生了相应的改变，而它们都是由 Nrf2 信号通路调控的。这提示我们，细胞暴露于树脂单体后，出于自我保护机制其抗氧化防御系统可能被激活，通过促进一系列抗氧化酶的表达。本实验的目的是探讨通过药物上调 Nrf2 信号通路的表达后单体毒性以及抗氧化系统的变化。

1 材料

1.1 主要试剂

- 特丁基对苯二酚 (tBHQ) (Sigma, 美国)
- 其余试剂同第一部分

1.2 主要仪器

- 同第一部分

2 方法

2.1 CCK-8 实验

将浓度为 5×10^3 个/mL 的 hDPCs 接种于 96 孔培养板接种细胞，每孔 100 μ L，培养约 24 h 使细胞贴壁并达到 80% 融合。实验分组如表3-1所示：

表 3-1 CCK-8 实验分组

对照组	实验组 1	实验组 2
—	1 mM HEMA	1 mM HEMA +10 μ M tBHQ

弃去培养液后，每孔加入 100 μ L 相应的细胞培养液培养细胞 24 h。CCK-8检测细胞增殖情况，实验步骤同实验一。

2.2 细胞内 ROS 水平检测

用胰酶常规消化 hDPCs, 以 5×10^4 个/mL 的悬液浓度接种于 6 孔培养板细胞, 每孔 1.5 mL, 培养约 24 h 使细胞贴壁并达到 80% 融合。实验分组同实验六测试 2.1, 实验方法同第一部分实验一测试 2.3。

2.3 细胞凋亡检测

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1, 实验方法同第一部分实验二 2.1。

2.4 各种生化指标检测

2.4.1 还原型氧化型谷胱甘肽 (GSH) 检测

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1, 实验方法同第一部分实验一测试 2.4.2。

2.4.2 氧化物歧化酶 (SOD) 检测

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1, 实验方法同第一部分实验一测试 2.4.3。

2.4.3 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 检测

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1, 实验方法同第一部分实验一测试 2.4.4。

2.4.4 过氧化物酶 (CAT) 检测

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1, 实验方法同第一部分实验一测试 2.4.5。

2.5 数据统计分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 6 软件绘图, 数据表现形式为均数 \pm 标准差 (mean \pm SD), 以 one-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

我们采用 Nrf2 信号通路的激活剂 tBHQ 和树脂单体共同处理细胞 24 h 后 CCK-8 法检测细胞增殖。结果如图3-1所示, 树脂单体 HEMA 对 hDPCs 的增殖具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 而 tBHQ 对树脂单体的细胞毒性有明显的拮抗作用。

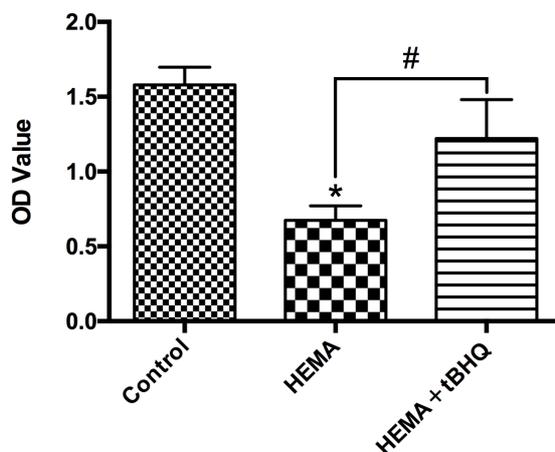


图3-1 tBHQ对树脂单体细胞毒性有明显的拮抗作用

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, N=3)

为明确细胞中氧化应激水平和抗氧化防御系统情况, 我们分别检测了细胞内 ROS 水平, GSH 含量以及抗氧化酶 SOD、GPx 和 CAT 的活性。实验结果如图3-2和3-3所示, 使用 tBHQ 和树脂单体共同培养细胞, 会使升高的 ROS 水平和 CAT 活性降低, 同时使 GSH 的含量以及 SOD 和 GPx 的活性基本恢复到对照组的水平。

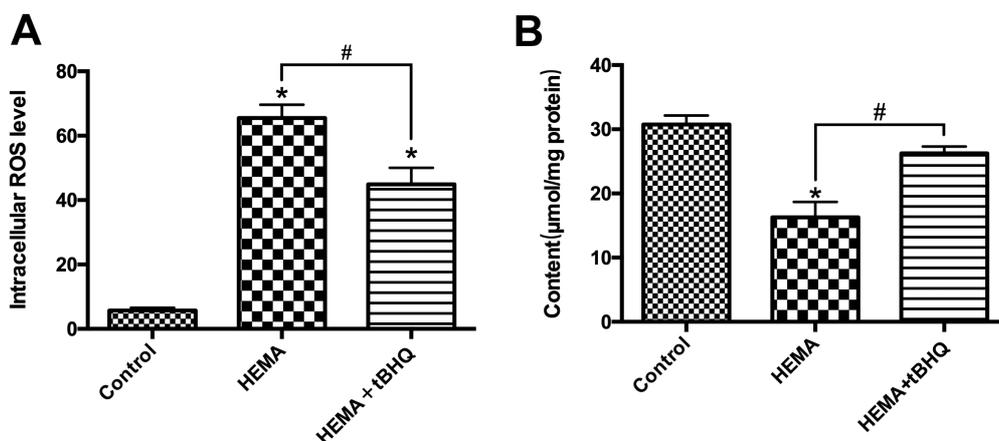


图3-2 暴露于tBHQ和树脂单体的细胞内ROS水平 (A) 和GSH含量 (B)

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$,

N=3)

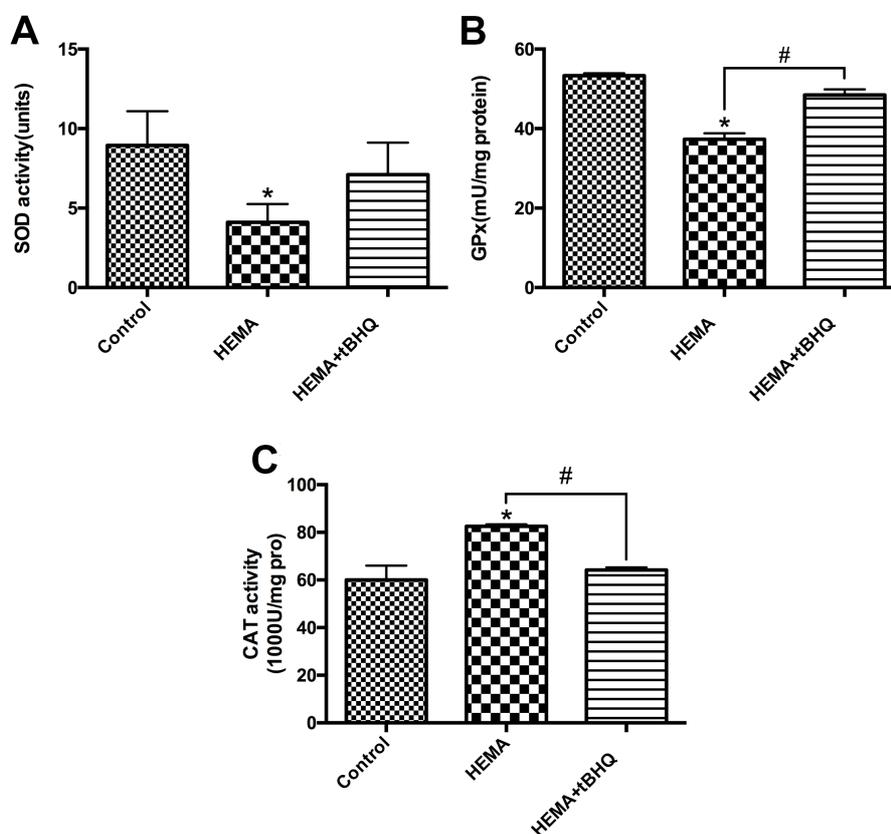


图3-3 暴露于tBHQ和树脂单体的细胞内抗氧化酶的活性 (A. SOD; B.GPx; C.CAT)

(*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P<0.05$,

N=3)

4 讨论

通过第一部分实验我们发现, 树脂单体可以导致细胞内发生氧化应激, 并引起 GPx、CAT 和 SOD 等一系列抗氧化酶的活性发生变化。抗氧化酶 SOD、GPx 和 CAT 都是由 Nrf2 信号通路调控的^[146]。Nrf2 信号通路在细胞的抗氧化系统中发挥着重要的核心作用。当细胞发生氧化应激时, Keap1 与 Nrf2 发生解偶联, 在多种蛋白激酶的磷酸化作用下, Nrf2 进入细胞核中与下游靶基因中的 ARE 发生结合, 诱导下游的 GCL、SOD、CAT、GPx、HO-1、NQO1、GST 等一系列对过氧化损伤

和亲电物质毒性具有保护作用的酶类发生转录和表达，促进细胞对ROS的灭活和外源性亲电化合物的清除，缓解这些物质引起的细胞毒性作用。

本实验为了探讨 Nrf2 信号通路的表达改变后，单体对抗氧化系统的影响，我们采用 Nrf2 信号通的激活剂 tBHQ 上调干预 Nrf2 信号通路的表达，检测牙科单体处理细胞后细胞中氧化应激水平和抗氧化防御系统情况。我们发现，上调 Nrf2 的表达可增加细胞的抗氧化能力，有效减轻牙科单体引起的细胞损伤。其机制可能是 Nrf2 的高表达增强了下游抗氧化酶 SOD、GPx 和 CAT 的活性，催化过量产生的 ROS 转化为其它对细胞无害的产物。事实上，大量的研究发现通过段激活 Nrf2 信号通路，可以在多种细胞、组织或器官中发挥重要的保护作用^[148-150]。

综上所述，我们的研究首次发现，通过药物上调 Nrf2 信号通路的表达可以缓解牙科单体的毒性作用，这为提高牙科树脂材料的生物相容性提供了新的策略。

实验七、上调 Nrf2 信号通路对牙科单体引起的内源性凋亡的影响

根据第三部分实验六，我们发现，通过药物上调 Nrf2 信号通路的表达可以保护细胞，缓解树脂单体引起的氧化应激。细胞内过量的 ROS 可以和细胞内的生物大分子包括 DNA、蛋白质和脂质等发生反应，导致相关分子的变性，进而导致细胞凋亡的发生。本实验的目的是探讨通过药物上调 Nrf2 信号通路能否缓解树脂单体引起的细胞内源性凋亡。

1 材料

1.1 主要试剂

- Total RNA Extractor (Trizol) (生工, 中国)
- 异丙醇 (富宇, 中国)
- M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (生工, 中国)
- Green-2-go MasterMix PCR 试剂盒 (生工, 中国)
- 其余主要试剂同第一部分。

1.2 主要仪器

- 去离子水过滤仪 (9Millipore, 美国)
- 高速离心机 (Eppendorf, 德国)
- 制冰机 (Scotsman, 意大利)
- 紫外分光光度计 (BioTek, 美国)
- CFX-96 实时定量 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国)
- 其余主要仪器同第一部分。

2 方法

2.1 RT-PCR

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1。各组细胞处理 24 h 后进行

RT-PCR 实验, 检测内源性凋亡相关分子的转录情况。

2.1.1 总 RNA 提取

- 1) 将细胞接种至 6 孔培养板内培养, 细胞汇合至 90% 以上时提取总 RNA;
- 2) 吸弃废液, PBS 轻轻洗涤 2 遍;
- 3) 每孔加入 1 mL Trizol, 摇匀, 盖上培养板盖子, 室温25°C下消化 5-6 min;
- 4) 使用移液枪吹打, 将细胞裂解物从孔底吹打至也体内, 将全部液体转移至 1.5 mL 无 RNA 酶 EP 管中;
- 5) 每管内加入 0.2 mL 氯仿, 盖上 EP 管, 用手剧烈震荡 15 s, 室温下静置 5 min, 可见分层;
- 6) 使用高速离心机, 4°C、12000 g/min 离心15 min, 可见 RNA、DNA、蛋白质三层分层;
- 7) 小心收集上层 RNA, 移至另一 1.5 mL 无酶 EP 管中, 收集时若混入中间层 DNA 或下层蛋白质则弃置;
- 8) 加入与收集的 RNA 等体积的异丙醇, 盖上盖子混匀后, -20°C 下静置 1 h;
- 9) 4°C、12000 g/min 离心10 min, 管底一侧可见 RNA 沉淀;
- 10) 倒弃上清, 每管加入 500 μ L 4°C预冷的 DEPC 水配制的 75%乙醇, 食指轻弹管底使RNA沉淀悬浮, 洗涤沉淀;
- 11) 4°C、12000 g/min 离心 5 min, 管底一侧可见 RNA 沉淀;
- 12) 吸弃上清, 将沉淀暴露在空气中干燥 5°C 7 min, 直至可见沉淀边缘趋于透明即可;
- 13) 加入 30 μ L DEPC 水, 置于56°C恒温水浴中溶解约 10 min, 取 4 μ L 使用分光光度计测定RNA浓度、纯度, 其余置于冰浴备用或置于 -80°C 保存。

2.1.2 总 RNA 浓度、纯度测定

提取的细胞总 RNA 及本底 DEPC 水置于冰浴, 使用无 RNA 酶移液枪头移液, 每个样品测定 2 次 \times 2 μ L, 本底为 4 次 \times 2 μ L。使用 BioTek Gen5 软件操作紫外分光光度计自动测定样品, 软件批处理功能自动将记录、处理结果并生成 Excel 表格。本实验中认为 260/280 值处于 1.8 至 2.0 间为正常, RNA 浓度取 2 次重复测量的平均值。

2.1.3 反转录

采用生工 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录，步骤如下：

- 1) 在冰浴的无 RNA 酶 0.2mL EP 管中加入不多于 5 μg 总 RNA、随机六合引物 (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL ，并用 RNase Free H₂O 定容至 12 μL ；
- 2) 混匀后离心 3-5 s，65°C 恒温水浴中反应 5 min，取出后冰浴 30 s，再离心 3 至 5 s；
- 3) 试管置于冰浴，加入 5 \times Reaction Buffer 4 μL 、RNase Inhibitor (20 U/ μL) 1 μL 、dNTP Mix (10 mmol/L) 2 μL 、M-MuLVRT (200 U/ μL) 1 μL ，混匀后离心 3-5 s，反应体系共 20 μL ；
- 4) 使用PCR仪按以下程序进行反转录反应：25°C 10 min、42°C 30-60 min、70°C 10 min；
- 5) 反应产物置于冰浴备用，或置于 -20°C 保存。

2.1.4 实时定量 PCR (RT-PCR)

引物序列如表3-2所示：

表 3-2 引物序列

Gene	Primer sequence
<i>NRF2</i>	Forward: 5'-CTTGGCCTCAGTGATTCTGAAGTG-3'
	Reverse: 5'-CCTGAGATGGTGACAAGGGTTGTA-3'
<i>BCL-2</i>	Forward: 5'-CCTGTGGATGACTGAGTACCTGAAC-3'
	Reverse: 5'-CAGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGA-3'
<i>BAX</i>	Forward: 5'-CAGGATGCGTCCACCAAGAA-3'
	Reverse: 5'-GCAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC-3'
<i>CASPASE-3</i>	Forward: 5'-GGAGCAGCTTTGTGTGTGTGATTC-3'
	Reverse: 5'-TCCATCCTTTGACTCTGCTCATGG-3'
<i>ACTIN</i>	Forward: 5'-AGGGTGTGATGGTGGGAA-3'
	Reverse: 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGA-3'

采用生 Green-2-go MasterMix PCR 试剂盒进行实时定量 PCR 实验，反应体系为 20 μL ，包括以下试剂：

Green-2-go MasterMix 10 μL 、上游引物 0.2-0.4 μL (100-200 nM)、下游引物0.2至0.4 μL (100至200 nM)、模板cDNA \leq 500ng (根据cDNA浓度可变)、RNase-Free H₂O (补至20 μL)。

反应条件为：酶激活，95°C、3 min，1个循环；变性，95°C、3 s，退火、延伸，60°C、20 s，两者共40个循环。

2.2 细胞凋亡检测

细胞样品准备和实验分组同实验六测试 2.1，实验方法同第一部分实验一测试 2.1。

2.3 Caspase-3 活性检测

实验分组同实验六测试 2.1。实验方法同第一部分实验二 2.2。

2.4 线粒体膜电位检测

实验分组同实验六测试 2.1。实验方法同第一部分实验二 2.2。

2.4 胞浆细胞色素 C 检测

实验分组同实验六测试 2.1。实验方法同第一部分实验二 2.2。

2.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对实验结果进行统计学分析，使用 GraphPad Prism 6 软件绘图，数据表现形式为均数 \pm 标准差 (mean \pm SD)，以 one-way ANOVA 进行分析， $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

3 结果

如图3-3所示，使用 tBHQ 和树脂单体 HEMA 共同培养细胞，会使下降的活细胞的比例显著上升 ($P < 0.05$)，同时显著减少晚期凋亡的细胞比例 ($P < 0.05$)

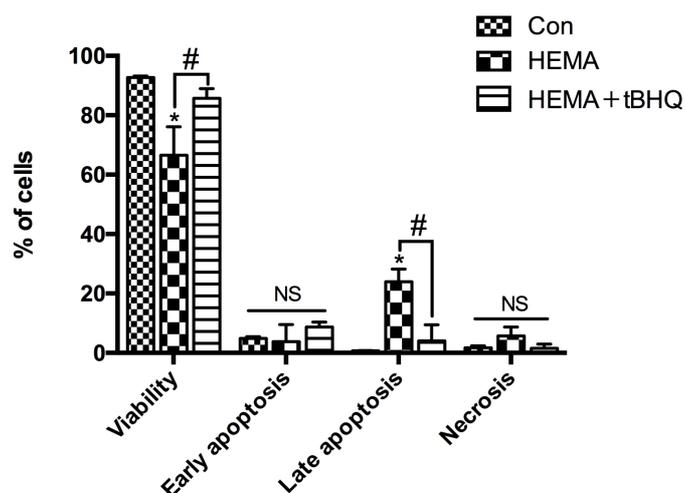


图3-3 暴露于tBHQ和树脂单体的细胞凋亡和坏死 (*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, $N = 3$)

RT-PCR 实验结果如图3-4所示, tBHQ 会使下降的 *BCL-2* 基因 mRNA 的水平基本恢复到对照组的水平 ($P > 0.05$)。同时使增高的 *BAX* 和 *CASPASE-3* 基因 mRNA 的水平下降, 此外 tBHQ 可以显著使 *NRF2* 基因表达水平上升 ($P < 0.05$)。

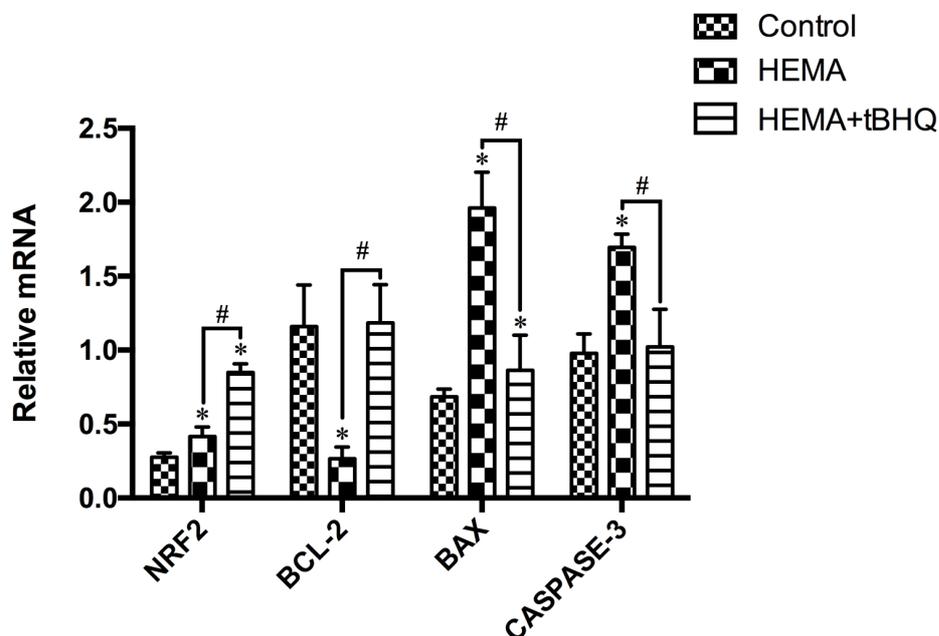


图3-4 暴露于tBHQ和树脂单体的细胞内相关基因的表达 (*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, $N = 3$)

如图3-5所示,我们还发现牙科单体处理细胞后会导致 Caspase-3 的活性, MMP 丧失细胞所占的百分比以及胞浆中 Cyto C 的含量增高 ($P < 0.05$), 而tBHQ会使拮抗牙科单体导致的变化 ($P < 0.05$)。

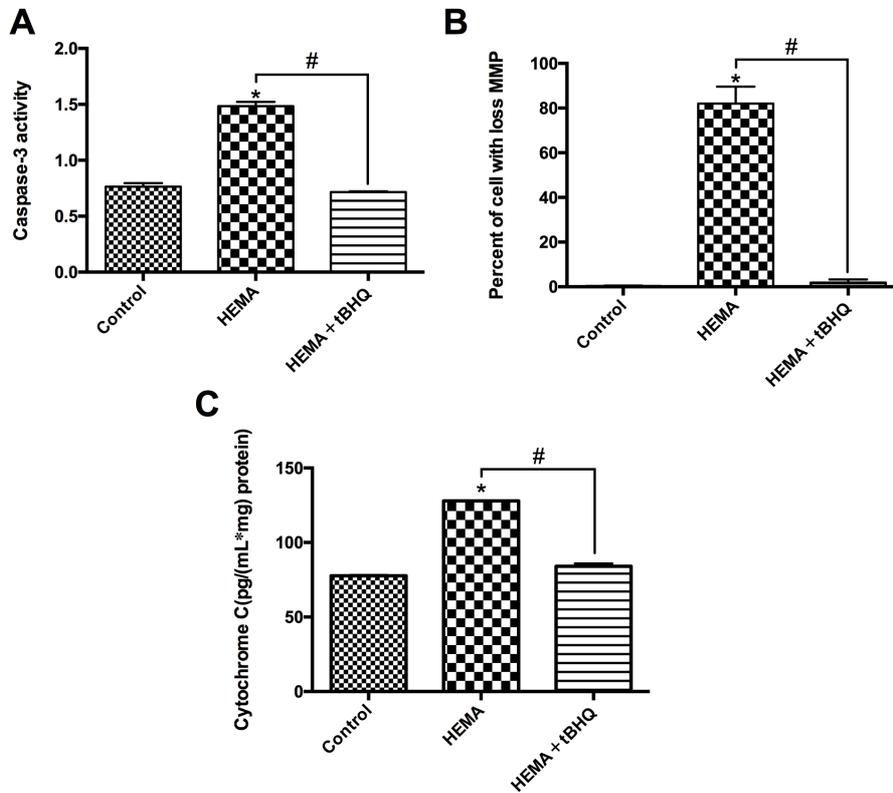


图3-4 暴露于tBHQ和树脂单体的细胞内Caspase-3 的活性 (A) MMP 丧失细胞所占比例 (B) 以及胞浆中 Cyto C 的含量 (C) (*表示与对照组相比有显著性差异, #表示与树脂单体处理组相比有显著性差异, $P < 0.05$, $N = 3$)

4 讨论

实验六发现,上调 Nrf2 的表达可增加细胞的抗氧化能力,使过量产生的 ROS 发生转化为对细胞无害的物质,有效减轻牙科单体引起的细胞损伤。根据第一部分的实验,我们发现牙科单体在细胞内产生的过量 ROS 会导致内源性凋亡。本实验的目的是探讨通过上调 Nrf2 信号通路的表达对牙科单体引起的细胞内源性凋亡的影响。我们发现, Nrf2 信号通的激活剂 tBHQ 处理细胞后,活细胞的比例显著上升而晚期凋亡的细胞显著减少。同时, RT-PCR 实验结果显示, tBHQ 可以显著使 *NRF2* 基因表达水平上升,同时提高了具有抑制凋亡作用的 *BCL-2* 基因的表达,降低了具有促进凋亡的 *BAX* 基因以及下游 *CASPASE-3* 基因的表达,同时降低了Caspase-3

的活性, MMP 丧失细胞所占的百分比以及胞浆中 Cyto C 的含量, 从而抑制细胞内源性凋亡的发生。

综上所述, 我们的研究首次发现, 通过人为手段上调 Nrf2 信号通路的表达可以抑制牙科单体导致的细胞内源性凋亡。

小 结

树脂基材料是目前口腔临床工作中最常用、最重要的一类材料。已有许多学者证实，常用的牙科单体都具有细胞毒性，而单体诱导的细胞内氧化应激是其细胞毒性的重要机理之一。

Nrf2 信号通路是细胞对抗氧化损伤的主要通路。细胞的氧化应激可激活该通路，使 Nrf2 与胞浆伴侣蛋白 Keap1 解偶联，在多种蛋白激酶的磷酸化作用下，Nrf2 进入细胞核中与抗氧化反应元件 ARE 的 DNA 序列结合，诱导下游的抗氧化酶转录和表达，发挥强大的抗氧化作用，促进对细胞内的 ROS 灭活，恢复体内氧化-抗氧化平衡，缓解这些物质引起的细胞毒性作用。

本课题首先以常用的牙科单体 HEMA、MMA 和 TEGDMA 为研究对象，比较了它们的细胞毒性，同时在细胞水平探索其细胞毒性的可能机制，在此基础上，初步探讨了添加抗氧化剂或人为干预 Nrf2 信号通路表达对单体毒性可能的拮抗作用，得到以下结论：

1. 牙科单体的细胞毒性与细胞氧化应激有关，牙科单体可以导致细胞中氧化应激水平升高和抗氧化能力降低，导致线粒体的结构和功能受到影响，进而激活了牙科单体内源性凋亡通路，导致细胞凋亡的发生。

2. 抗氧化剂 NAC 可以通过消除牙科单体产生的过量 ROS，抑制牙科单体引起的细胞氧化应激和内源性凋亡以及其对线粒体结构和功能的破坏，从而保护细胞。

3. 添加 NAC 可以拮抗 PMMA 树脂的细胞毒性。虽然加入过多的 NAC 会影响 PMMA 树脂的机械性能，但限制 NAC 的添加量在 0.15 wt.% 既可以提高树脂的生物相容性，同时不显著影响其机械性能，从而提供一种有效的提高 PMMA 树脂生物相容性的方法。

4. 通过药物上调 Nrf2 信号通路可以抑制牙科单体导致的细胞内源性凋亡。

本研究发现，在细胞水平牙科单体可以引起细胞内氧化应激，进而激活内源性凋亡通路，导致细胞凋亡，利用抗氧化剂 NAC 可以拮抗牙科单体的细胞毒性。在 PMMA 树脂中限制 NAC 的添加量提高树脂的生物相容性，同时不显著影响其机械性能。Nrf2

信号通路可作为一个新的分子靶点用以提高牙科树脂材料的生物相容性。

参考文献

- [1] Jandt KD, Sigusch BW. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater.* 2009;25:1001-6.
- [2] Cramer NB, Stansbury JW, Bowman CN. Recent advances and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res.* 2011;90:402-16.
- [3] Ferracane JL. Resin composite--state of the art. *Dent Mater.* 2011;27:29-38.
- [4] Bowen RL. Dental filling material comprising vinyl silane treated fused silica and a binder consisting of the reaction product of bis phenol and glycidyl acrylate. US; 1962.
- [5] Ferracane JL. Current trends in dental composites. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6:302-18.
- [6] Atai M, Nekoomanesh M, Hashemi SA, Amani S. Physical and mechanical properties of an experimental dental composite based on a new monomer. *Dent Mater.* 2004; 20:663-8.
- [7] Sideridou I, Achilias DS, Spyroudi C, Karabela M. Water sorption characteristics of light-cured dental resins and composites based on Bis-EMA/PCDMA. *Biomaterials.* 2004;25:367-76.
- [8] Sideridou I, Achilias DS, Spyroudi C, Karabela M. Water sorption characteristics of light-cured dental resins and composites based on Bis-EMA/PCDMA. *Biomaterials.* 2004;25:367-76.
- [9] Dee KC, Rueger DC, Andersen TT, Bizios R. Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface: a model in vitro study. *Biomaterials.* 1996;17:209-15.
- [10] Puleo DA, Kissling RA, Sheu MS. A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. *Biomaterials.* 2002;23:480-.
- [11] Lai JH, Douglas AEJB. Organosilicon dental composite restoratives based on 1,3-bis[(p-acryloxymethyl) phenethyl] tetramethyldisiloxane. *Dent Mater.* 2004;20:570-8.
- [12] Hui L, Stansbury JW, Jun N, Berchtold KA, Bowman CN. Development of highly

- reactive mono-(meth)acrylates as reactive diluents for dimethacrylate-based dental resin systems. *Biomaterials*. 2005;26:1329-36.
- [13] Floyd CJ, Dickens SH. Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. *Dent Mater*. 2006;22:1143-9.
- [14] Jaarda MJ, Wang RF, Lang BR. A regression analysis of filler particle content to predict composite wear. *J Prosthet Dent*. 1997;77:57-67.
- [15] 王蓉, 贾安琦, 张文云. 复合树脂中无机填料的研究进展. *国际口腔医学杂志*. 2006;33:369-72.
- [16] 袁慎坡, 林红, 徐永祥. 国内口腔修复用复合树脂无机填料的研究进展. *现代口腔医学杂志*. 2012:130-2.
- [17] Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB, Rueggeberg FA, Messer RL. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater*. 2004;20:150-7.
- [18] 周学刚. 多尺度多维度填料协同增强增韧光固化树脂基口腔材料的制备及性能研究: 北京化工大学; 2014.
- [19] Condon JR, Ferracane JL. In vitro wear of composite with varied cure, filler level, and filler treatment. *J Dent Res*. 1997;76:1405-11.
- [20] Beatty MW, Swartz ML, Moore BK, Phillips RW, Roberts TA. Effect of microfiller fraction and silane treatment on resin composite properties. *J Biomed Mater Res*. 1998;40:12-23.
- [21] 牛丽娜. 四针状氧化锌晶须填料对复合树脂抗菌及理化性能影响的研究: 第四军医大学; 2009.
- [22] Tay FR, Pashley DH. Dental adhesives of the future. *J Adhes Dent*. 2002;4:91-103.
- [23] Van Landuyt K, Van Meerbeek B. The chemical composition of dental adhesives: *Coxmoor*; 2009.
- [24] PhD UKD, PhD SKD. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J*. 1999;44:25-30.
- [25] Munksgaard EC. Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci*. 2005;113:166-9.
- [26] Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *J Dent Res*. 1988;67:1295-9.

- [27] Drummond JL. Degradation, fatigue, and failure of resin dental composite materials. *J Dent Res.* 2008;87:710-9.
- [28] Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17:103-14.
- [29] Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA, Lopes LP, et al. Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater.* 2010;26:e171-80.
- [30] Andreas F, Martin R, Dieter M. Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:301.e16–.e22.
- [31] Kawahara T, Nomura Y, Tanaka N, Teshima W, Okazaki M, Shintani H. Leachability of plasticizer and residual monomer from commercial temporary restorative resins. *J Dent.* 2004;32:277-83.
- [32] Willershausen B, ., Callaway A, ., Ernst CP, Stender E, . The influence of oral bacteria on the surfaces of resin-based dental restorative materials--an in vitro study. *Int Dent J.* 1999;49:231-9.
- [33] Graham BS, Jones DW, Sutow EJ. An in vivo and in vitro study of the loss of plasticizer from soft polymer-gel materials. *J Dent Res.* 1991;70:870-3.
- [34] Minami H, Suzuki S, Minesaki Y, Kurashige H, Tanaka T. In vitro evaluation of the influence of repairing condition of denture base resin on the bonding of autopolymerizing resins. *J Prosthet Dent.* 2004;91:164-70.
- [35] Jepson NJ, McGill JT, McCabe JF. Influence of dietary simulating solvents on the viscoelasticity of temporary soft lining materials. *J Prosthet Dent.* 2000;83:25-31.
- [36] Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R. Biocompatibility of Resin-based Dent Materials. *Mater.* 2009;2:514-48.
- [37] Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res.* 2007;86:115-24.
- [38] Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Occupational allergic contact dermatitis caused by acrylic tri-cure glass ionomer. *Contact Dermatitis.* 1997;37:49-50.
- [39] Vilaplana J, Romaguera C. Contact dermatitis and adverse oral mucous membrane reactions related to the use of dental prostheses. *Contact Dermatitis.* 1994;30:80–4.
- [40] Ulf Ö, Harriet A, Stig K, Birgitta M, Lars B. Prevalence of self-reported hand eczema

- and skin symptoms associated with dental materials among Swedish dentists. *Eur J Oral Sci.* 1999;107:496-505.
- [41] Kaga M, Ito Y, Okabe T, Oguchi H, Ota M. [Quantitative evaluation by measuring affected area for cytotoxicity of dental materials]. *Shika Zairyo Kikai.* 1990;9:591-9.
- [42] Schmalz G. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:696-706.
- [43] Goon AT, Isaksson M, Zimerson E, Goh CL, Bruze M. Contact allergy to (meth)acrylates in the dental series in southern Sweden: simultaneous positive patch test reaction patterns and possible screening allergens. *Contact Dermatitis.* 2006;55:219-26.
- [44] Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent Mater.* 2003;19:25-31.
- [45] Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res.* 1991;70:1450-5.
- [46] Geurtsen W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:333-55.
- [47] Alexander E, Tolga H, Jirakant L, Karl-Anton H, Claudia B, Carola B, et al. Inhibition of cytokine and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials.* 2009;30:1665-74.
- [48] About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC. Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *Engineering.* 1984;04:169-.
- [49] Galler KM, Schweikl H, Hiller KA, Cavender AC, Bolay C, D'Souza RN, et al. TEGDMA reduces mineralization in dental pulp cells. *J Dent Res.* 2011;90:257-62.
- [50] Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res.* 2006;85:870-7.
- [51] Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006;22:211-22.
- [52] Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent.* 1998;26:137-45.
- [53] Peutzfeldt A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci.*

- 1997;105:97-116.
- [54] Geurtsen W, Leyhausen G. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res*. 2001;80:2046-50.
- [55] Athina B, Triantafillos P, Pavlos G. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*. 2009;10:3861-99.
- [56] Emmler J, Seiss M, Kreppel H, Reichl FX, Hickel R, Kehe K. Cytotoxicity of the dental composite component TEGDMA and selected metabolic by-products in human pulmonary cells. *Dent Mater*. 2008;24:1670-5.
- [57] Dong HL, Lee LYK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater*. 2006;22:1086-92.
- [58] Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci*. 2000;108:442-8.
- [59] De MJ, Van LK, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res*. 2005;84:118-32.
- [60] Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent*. 1996;24:125-8.
- [61] Spagnuolo G, D'Anto V, Cosentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of N-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials*. 2006;27:1803-9.
- [62] Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:474-80.
- [63] Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Tobias K, Matthias F, Reinhard H, et al. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent*. 2004;32:229-34.
- [64] EL K, JD E, AG G, BM J, WV W, S B, et al. Biocompatibility of hydroxylated metabolites of BISGMA and BFDGE. *J Dent Res*. 2003;82:367-71.
- [65] Heil TL, Volkmann KR, Wataha JC, Lockwood PE. Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for in vitro biocompatibility testing of dental

- material components. *J Oral Rehabil.* 2002;29:401-7.
- [66] Stephanie K, Gianrico S, Gottfried S, Helmut S. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials.* 2013;34:4555-63.
- [67] 马赛. 两种常用季铵盐型抗菌单体抗菌性能、细胞毒性的比较研究及其细胞毒性机理初探: 第四军医大学; 2012.
- [68] 黄东明. 脑梗死急性期氧自由基清除剂治疗的疗效及风险分析: 广西医科大学; 2009.
- [69] Halliwell B, . Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 2009;31:261-72.
- [70] Dunyaporn T, Weiqin L, Ogasawara MA, Rivera-Del Valle N, Peng H. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:1343-74.
- [71] 王连生, 许红, 王洋, 王常安, 李晋南, 赵志刚, et al. 维生素 K₃ 对西伯利亚鲟生长和抗氧化功能的影响. *大连海洋大学学报.* 2015.
- [72] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30:42-59.
- [73] Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291:G1-7.
- [74] Yang H, Wang X, Liu X, Wu J, Liu C, Gong W, et al. Antioxidant peptidomics reveals novel skin antioxidant system. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8:571-83.
- [75] 张森. 柚皮苷对 D-半乳糖诱导骨髓间充质干细胞衰老的保护作用: 广西医科大学; 2014.
- [76] 李航. Nrf2-ARE 信号通路对 I 型糖尿病小鼠肾脏氧化应激的影响及其作用机制的研究: 河北医科大学; 2010.
- [77] Anne-Frances M. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 2012;586:585-95.
- [78] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2014;55:728-49.
- [79] Boh EE. Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases. *Clin Dermatol.* 1996;14:343-52.
- [80] Chikako N, Yukari H, Shinya T. Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:561-70.

- [81] Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. Targeting mitochondria. *Acc Chem Res.* 2008;41:87-97.
- [82] Walther UI, Siagian, II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol.* 2004;49:125-31.
- [83] Nocca G, Ragno R, Carbone V, Martorana GE, Rossetti DV, Gambarini G, et al. Identification of glutathione-methacrylates adducts in gingival fibroblasts and erythrocytes by HPLC-MS and capillary electrophoresis. *Dent Mater.* 2011;27:e87-98.
- [84] Samuelsen JT, Kopperud HM, Holme JA, Dragland IS, Christensen T, Dahl JE. Role of thiol-complex formation in 2-hydroxyethyl- methacrylate-induced toxicity in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96:395-401.
- [85] Stephanie K, Christine P, Karl-Anton H, Eva-Maria F, Claudia B, Gianrico S, et al. Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials.* 2010;31:2964-75.
- [86] Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater.* 2007;23:34-9.
- [87] Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H, et al. NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res.* 2004;83:837-42.
- [88] Kim NR, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC. Effects of N-acetylcysteine on TEGDMA- and HEMA-induced suppression of osteogenic differentiation of human osteosarcoma MG63 cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;98:300-7.
- [89] Helmut S, Christine P, Carola B, Karl-Anton H, Wolfgang B, Stephanie K. 2-Hydroxyethyl methacrylate-induced apoptosis through the ATM- and p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway. *Biomaterials.* 2014;35:2890–904.
- [90] Avina P, Cacalano NA, Hume WR, Anahid J. N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:1394-408.
- [91] Yamada M, Ogawa T. Chemodynamics underlying N-acetyl cysteine-mediated bone cement monomer detoxification. *Acta Biomater.* 2009;5:2963-73.
- [92] Nocca G, D'Anto V, Desiderio C, Rossetti DV, Valletta R, Baquala AM, et al. N-acetyl

- cysteine directed detoxification of 2-hydroxyethyl methacrylate by adduct formation. *Biomaterials*. 2010;31:2508-16.
- [93] Lujan-Climent M, Martinez-Gomis J, Palau S, Ayuso-Montero R, Salsench J, Peraire M. Influence of static and dynamic occlusal characteristics and muscle force on masticatory performance in dentate adults. *Eur J Oral Sci*. 2008;116:229-36.
- [94] 秦曼. 芪黄保肾颗粒对肾衰竭幼鼠 TGF- β -1/ROS/MAPK 信号通路的影响: 黑龙江中医药大学; 2015.
- [95] Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem*. 1999;274:26071-8.
- [96] 王霞. 核因子 E2 相关因子 2 基因多态性与氧化应激及 2 型糖尿病易感性的关联研究: 华中科技大学; 2013.
- [97] 周珊珊. Nrf2 与 MT 的协同作用在保护慢性间歇性低氧所致心脏损伤中的作用: 吉林大学; 2015.
- [98] Namani A, Li Y, Wang XJ, Tang X. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1875-85.
- [99] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:340-6.
- [100] Li J, Jiao Y, Guo Z, Ji C, Wang Z. Comparison of osteoarticular allograft reconstruction with and without the Sauve-Kapandji procedure following tumour resection in distal radius. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68:995-1002.
- [101] Linders J, Janssen C, Testai E, Vighi M, Dekant W, Munth J, et al. Opinion on environmental risks and indirect health effects of mercury from dental amalgam. *Regul Toxicol Pharm*. 2015;72:85-6.
- [102] Martinez VD, Vucic EA, Thu KL, Pikor LA, Lam S, Lam WL. Disruption of KEAP1/CUL3/RBX1 E3-ubiquitin ligase complex components by multiple genetic mechanisms: Association with poor prognosis in head and neck cancer. *Head and Neck*. 2015;37:727-34.
- [103] Moon EJ, Giaccia A. Dual roles of NRF2 in tumor prevention and progression: Possible implications in cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;79:292-9.
- [104] 孙佳琦. 纤维内硅化胶原促人牙髓干细胞成骨分化的研究: 第四军医大学; 2014.

- [105] 坚哲. Nrf2-ARE 信号通路在白癜风氧化应激发病中的作用和机制研究: 第四军医大学; 2013.
- [106] 闵凌峰, 陈琼. 香烟烟雾提取物诱导肺腺癌 A549 细胞相关分子改变的比较蛋白组学研究. 中华医学会呼吸病学年会 2011.
- [107] 许鑫. 耐辐射球菌核酸解旋酶的初步研究: 浙江大学; 2013.
- [108] Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001;80:1615-20.
- [109] Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 1997;37:517-24.
- [110] Fujisawa S, Kadoma Y, Masuhara E. A calorimetric study of the interaction of synthetic phospholipid liposomes with vinyl monomers, acrylates and methacrylates. *Plant Pathol.* 2008;57:387-.
- [111] Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *J Dent Res.* 1988;67:1438-41.
- [112] Engelmann J, Janke V, Volk J, Leyhausen G, von Neuhoff N, Schlegelberger B, et al. Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials.* 2004;25:4573-80.
- [113] Volk J, Engelmann J, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of three resin monomers on the cellular glutathione concentration of cultured human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2006;22:499-505.
- [114] Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:749-62.
- [115] Gianrico S, Claudia D, Virginia R, Massimo A, Diana Valeria R, Vincenzo DA, et al. In vitro cellular detoxification of triethylene glycol dimethacrylate by adduct formation with N-acetylcysteine. *Dent Mater.* 2013;29:e153-e60.
- [116] Ping Y, Xiao-Qing H, Lei P, Ai-Ping L, Xin-Ru W, Jian-Wei Z, et al. The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HELFL) cellular proliferation model. *J Toxicol Env Heal A.* 2007;70:976-83.
- [117] Ramp U, Caliskan E, Mahotka C, Krieg A, Heikaus S, Gabbert HE, et al. Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and γ -radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. *Brit J Cancer.* 2003;88:1800-7.

- [118] Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, et al. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res.* 2003;283:156-66.
- [119] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009;122:437-41.
- [120] Slee EA, O'Connor DX. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene.* 2004;23:2809-18.
- [121] Krifka S, Seidenader C, Hiller KA, Schmalz G, Schweikl H. Oxidative stress and cytotoxicity generated by dental composites in human pulp cells. *Clin Oral Invest.* 2012;16:215-24.
- [122] Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000;5:415-8.
- [123] Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74:609-19.
- [124] Jong-Hwan K, Young-Whan C, Cheol P, Cheng-Yun J, Jin LY, Jung PD, et al. Apoptosis induction of human leukemia U937 cells by gomisin N, a dibenzocyclooctadiene lignan, isolated from *Schizandra chinensis* Baill. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:807-13.
- [125] Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials.* 2005;26:5130-7.
- [126] Allgood PC, Maxwell AJ, Hudson S, Offman J, Hutchison G, Beattie C, et al. A randomised trial of the effect of postal reminders on attendance for breast screening. *Br J Cancer.* 2016;114:171-6.
- [127] Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent.* 2003;90:190-3.
- [128] de Andrade Lima Chaves C, Machado AL, Vergani CE, de Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. *J Prosthet Dent.* 2012;107:114-27.
- [129] Noda M, Wataha JC, Kaga M, Lockwood PE, Volkmann KR, Sano H. Components of dentinal adhesives modulate heat shock protein 72 expression in heat-stressed THP-1 human monocytes at sublethal concentrations. *J Dent Res.* 2002;81:265-9.

- [130] Wael A, Masahiro Y, Norinaga K, Takahiro O. N-Acetyl cysteine prevents suppression of oral fibroblast function on poly(methylmethacrylate) resin. *Acta Biomater.* 2009;5:391-8.
- [131] Kojima N, Yamada M, Paranjpe A, Tsukimura N, Kubo K, Jewett A, et al. Restored viability and function of dental pulp cells on poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin supplemented with N-acetyl cysteine (NAC). *Dent Mater.* 2008;24:1686-93.
- [132] Naoki T, Masahiro Y, Hideki A, Norio H, Fumihiko Y, Masaichi CIL, et al. N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly(methyl methacrylate) bone cement. *Biomaterials.* 2009;30:3378-89.
- [133] Yamada M, Kojima N, Att W, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. N-Acetyl cysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental resin extract. *Redox Rep.* 2009;14:13-22.
- [134] Yamada M, Kojima N, Paranjpe A, Att W, Aita H, Jewett A, et al. N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. *J Dent Res.* 2008;87:372-7.
- [135] Hilde Molvig K, Inger Sjøvik K, Hanne W. Identification and quantification of leachable substances from polymer-based orthodontic base-plate materials. *Eur J Orthodont.* 2011;33:26-31.
- [136] Miletic V, Santini A, Trkulja I. Quantification of monomer elution and carbon-carbon double bonds in dental adhesive systems using HPLC and micro-Raman spectroscopy. *J Dent.* 2009;37:177-84.
- [137] Balkenhol M, Mautner MC, Ferger P, Wostmann B. Mechanical properties of provisional crown and bridge materials: chemical-curing versus dual-curing systems. *J Dent.* 2008;36:15-20.
- [138] Ferracane JL, Greener EH. The effect of resin formulation on the degree of conversion and mechanical properties of dental restorative resins. *J Biomed Mater Res.* 1986;20:121-31.
- [139] Lovell LG, Berchtold KA, Elliott JE, Lu H, Bowman CN. Understanding the kinetics and network formation of dimethacrylate dental resins. *Polym Advan Technol.* 2001;12:335-45.
- [140] van der Bilt A, Tekamp A, van der Glas H, Abbink J. Bite force and electromyography during maximum unilateral and bilateral clenching. *Eur J Oral Sci.* 2008;116:217-22.

- [141] Ferracane JL. Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins. *Dentl Mater.* 1985;1:11-4.
- [142] Markus B, Paul F, Meike Christina M, Bernd WS. Provisional crown and fixed partial denture materials: mechanical properties and degree of conversion. *Dent Mater.* 2007;23:1574-83.
- [143] Busscher HJ, Pelt AWJV, Boer PD, Jong HPD, Arends J. The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids. *Colloid Surface A.* 1984;9:319-31.
- [144] Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol.* 1990;17:138-44.
- [145] 唐乾利. 强精煎治疗少弱精子症的临床疗效及其抗氧化与调控能量代谢的机理研究: 湖南中医药大学; 2013.
- [146] de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, Hoozemans J, et al. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med.* 2008;45:1375-83.
- [147] 李航, 段惠军. Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白. *中国药理学通报.* 2011;27:300-3.
- [148] Tanaka A, Hamada N, Fujita Y, Itoh T, Nozawa Y, Iinuma M, et al. A novel kavalactone derivative protects against H₂O₂-induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. *Bioorg Med Chem.* 2010;18:3133-9.
- [149] Tusi SK, Ansari N, Amini M, Amirabad AD, Shafiee A, Khodaghali F. Tusi SK, Ansari N, Amini M et al. Attenuation of NF-kappaB and activation of Nrf2 signaling by 1,2,4-triazine derivatives, protects neuron-like PC12 cells against apoptosis. *Apoptosis* 15:738-751. *Apoptosis.* 2010;15:738-51.
- [150] Beyer TA, Auf dem Keller U, Braun S, Schafer M, Werner S. Roles and mechanisms of action of the Nrf2 transcription factor in skin morphogenesis, wound repair and skin cancer. *Cell Death Differ.* 2007;14:1250-4.

个人简历和研究成果

个人简历：

焦阳，男，汉族，1989年8月生于黑龙江省双城市，中共党员，第四军医大学2008级口腔医学八年制本硕博连读学员。曾担任 *Journal of Dentistry*, *Journal of Fluorescence*, *Medical Science Monitor* 等SCI杂志审稿人。参与申请国家自然科学基金面上项目一项，中华口腔医学会牙科粘接技术临床研究项目一项。

SCI 文章发表情况 (*通讯作者)：

1. **Jiao Y**, Zhu B, Chen J, Duan X*. Fluorescent sensing of fluoride in cellular system. *Theranostics*. 2015;5:173-87.(IF=8.022)
2. **Jiao Y**, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Sun J, Chen J*. Methacryloxyethyl Cetyl Ammonium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis in Human Dental Pulp Cells via Generation of Oxidative Stress. *Int J Biol Sci* 2016;12(5):580-593. (IF=4.509)
3. **Jiao Y**, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Liu Q, Liu Y, Song Q, Yu F, Yu H, Liu H, Huang L, Chen J*. N-Acetyl Cysteine Depletes Reactive Oxygen Species and Prevents Dental Monomer-Induced Intrinsic Mitochondrial Apoptosis In Vitro in Human Dental Pulp Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147858. (IF=3.234)
4. **Jiao Y**, Ma S, Li J, Shan L, Wang Y, Tian M, Yang Y, Sun J, Ban J, Chen J*. N-Acetyl Cysteine (NAC)-Directed Detoxification of Methacryloxyethyl Cetyl Ammonium Chloride (DMAE-CB). *PLoS ONE*. 2015;10(8): e0135815. (IF=3.234)
5. **Jiao Y**, Ma S, Li J, Shan L, Yang Y, Li M, Chen J*. The influences of N-acetyl cysteine (NAC) on the cytotoxicity and mechanical properties of Poly-methylmethacrylate (PMMA)-based dental resin. *PeerJ*. 2015;3:e868. (IF=2.111)
6. **Jiao Y**, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Chen J*. Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Cytotoxic Effects Caused by Dental Monomers: A Hypothesis. *Med Sci Monit*.

- 2015;21:3197-202. (IF=1.433)
7. **Jiao Y**, Zhou M, Yang Y, Zhou J, Duan X*. Cherubism misdiagnosed as giant cell tumor: a case report and review of literature. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(3):4656-4663. (IF=1.277)
 8. Liu Q, **Jiao Y**, Zhang W, Li S, Chen F, Ding Y*. In vitro cell behaviors of bone mesenchymal stem cells derived from normal and postmenopausal osteoporosis rats. *Int J Mol Med*. (已接收, 共一, IF=2.088)
 9. Liu Q, **Jiao Y**, Zhao Y, Wang Y, Li J, Ma S, Tian M, Ding Y, Chen J*. Tea consumption reduces the risk of oral cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(2):2688-2697. (共同第一作者, IF=1.277)
 10. Li J*, **Jiao Y**, Guo Z, Ji Ch, Wang Z. Comparison of osteoarticular allograft reconstruction with and without the Sauve-Kapandji procedure following tumour resection in distal radius. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015;68,995-1002. (IF=1.421)
 11. Sun X, Ban J, Sha X, Wang W, **Jiao Y**, Wang W, Yang Y, Wei J, Shen L, Chen J*. Effect of Er,Cr:YSGG Laser at Different Output Powers on the Micromorphology and the Bond Property of Non-Cariou Sclerotic Dentin to Resin Composites. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142311. (IF=3.234)
 12. Wang Y, Liu Z, Yao B, Dou C, Xu M, Xue Y, Ding L, Jia Y, Zhang H, Li Q, Tu K, **Jiao Y**, Liu Q, Guo C*. Long non-coding RNA TUSC7 acts a molecular sponge for miR-10a and suppresses EMT in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 Mar 22. [Epub ahead of print] (IF=3.611)

中文核心期刊文章发表情况:

1. **焦阳**, 马赛, 王辉, 李芳, 陈吉华. 季铵盐抗菌单体在粘结剂中应用的研究进展[J].牙体牙髓牙周病杂志. 2014,24(10):606~610.
2. **焦阳**, 段小红. 氟离子检测方法研究进展[J]. 药物生物技术. 2014,21(2):180~184.
3. 张思佳, 段小红, **焦阳**, 周密. 细胞内 pH 值测定方法的研究进展[J].现代医学生物进展. 2014,14(21):4164~4167.

4. 宋倩, 王辉, 冯春雷, 刘莹, **焦阳**, 陈吉华. 咬合纸指导调牙合可靠性的定量研究[J]. 牙体牙髓牙周病杂. 2016,(26)2:86~95.
5. 刘莹, 张凌, 王富, 宋倩, **焦阳**, 陈吉华. 纤维桩粘结相关影响因素的研究进展. 牙体牙髓牙周病杂志[J]. 牙体牙髓牙周病杂. 2016, (26)3:180~190.
6. 张思佳, 李刚, 王宗宇, 李泽彬, 常铁玲, 孙轶群, **焦阳**, 张立书, 孟娜, 张虹云等. 大学生口腔医疗需要自我评价与现况检查的比较[J]. 现代预防医学. 2013,40 (19):3642~3648.
7. 常铁玲, 张思佳, 李刚, **焦阳**, 沈鹏, 张虹云等. 中国独生子女与非独生子女口腔医疗需求调查相关比较[J]. 实用预防医学. 2013.(20)7:863~864.

获得专利:

1. 一种医用垃圾箱. ZL 2015 2 0391534.1, **第一发明人**, 实用新型专利, 2015.11.11.
2. 弧形可调式口腔撑开器. ZL 2011 2 0316585.X, **第三发明人**, 实用新型专利, 2012.05.09.

会议论文:

1. **焦阳**. “工欲善其事, 必先利其器” ——一例巨颌症病例报道. 第四军医大学口腔医院 2015 年度学术年会. 陕西西安, 2016.01.25. (口头汇报)
2. **焦阳**, 马赛, 陈吉华. N-乙酰半胱氨酸通过消除活性氧来阻止牙科单体引起的线粒体内源性凋亡. 第九次全国口腔修复学学术会议. 北京, 2016.01.10-01.11. (壁报展示)
3. 马赛, **焦阳**, 陈吉华. N-乙酰半胱氨酸对 PMMA 牙科树脂细胞毒性及机械性能的影响. 第九次全国口腔修复学学术会议. 北京, 2016.01.10-01.11. (会议论文, 壁报展示)
4. **Jiao Y**, Ma S, Sun J, Ban J, Chen J. N-acetyl cysteine (NAC)-directed Detoxification of Methacryloxyethyl cetyl ammonium chloride (DMAE-CB). The First Biennial Meeting of the Adhesive Dentistry of the International Academy for Adhesive Dentistry (IAAD), Orlando, USA. 2015.09.11-09.12. (壁报展示)

致 谢

八年时光匆匆而逝。轻轻回首，多少唏嘘感慨，都只能附于时光来缅怀。

首先谨我以最诚挚的敬意感谢我的导师陈吉华教授。三年的博士学习期间，给予我无微不至的关怀和帮助，在导师的支持、鼓励及督促下，我通过博士阶段的学习与研究培养了严谨的科研思维，掌握了基本的科研方法。导师渊博的知识，严谨的治学态度，诲人不倦的高尚师德，精益求精的工作作风，勇于开拓的研精神也为我树立了榜样，是我今后不断努力的方向。

特别感谢我的辅导老师马赛讲师在我课题研究中给予的无私帮助和悉心指导。她从实验设计到文章的修改及毕业论文的撰写都给予了我细心的指导。

特别感谢 Georgia University 的 Franklin R Tay 教授，感谢您对我“授之以鱼，更授之以渔”。

特别感谢口腔生物教研室的段小红主任带我步入了科学的大门，放飞我的科学研究梦想。

衷心感谢陈吉华教授课题组的每一位老师和同学，在我学习成长的道路上的鼓励和帮助。

感谢修复科各位老师在我课程学习、实验研究及临床工作中给予的巨大支持！向你们表示最衷心的感谢！

衷心感谢我的亲人、朋友在我学习和生活中的支持与理解！

最后，再次向所有关心、和支持我的老师、朋友致以最诚挚的谢意！