

中文摘要

载二甲双胍碳点壳聚糖/丝素蛋白缓释微球盖髓效果的实验研究

背景与目的:

年轻恒牙因其特殊的解剖形态及组织结构,如髓角高、矿化程度较差、根尖孔粗大等,发生龋病或外伤时极易引起牙髓病变或根尖周病变,缩短牙齿寿命,最终可能导致牙齿丧失。为促进牙根继续发育、保留患牙牙髓功能、延长牙齿口内存留时间,临床上常采用活髓保存技术。由于现有盖髓剂仍有不足之处,因此新型盖髓材料的开发在活髓保存中至关重要。碳点生物相容性良好,是一种具有荧光特性、可促进成骨/成牙的纳米材料,在活髓保存方向具有潜在的价值。本课题组前期实现了二甲双胍碳点(Metformin carbon dots, MCDs)的合成并发现其体外促进成牙效果良好;现旨在用天然来源、成本低廉的壳聚糖和丝素蛋白制备具有相对理想的载药量、包封率以及体外释放效果的缓释系统,并通过体外培养人牙髓细胞检测缓释微球的细胞相容性,通过建立大鼠牙髓损伤模型研究缓释微球在生物体内对修复性牙本质形成的影响及牙髓炎症的抑制作用,评估该缓释微球的盖髓效果,探讨其在活髓保存术中临床应用的前景。

方法:

1、采用乳化交联法制备载二甲双胍碳点的壳聚糖/丝素蛋白微球(Metformin carbon dots-loaded chitosan/silk fibroin protein microspheres, MCDs-CS/SF-MPs),测量其载药量、包封率及体外释放效果。

2、提取人牙髓细胞,并传代培养。

3、通过CCK8技术检测MCDs-CS/SF-MPs对牙髓细胞增殖的影响,通过活死细胞染色法检测其对牙髓细胞存活的影响。

4、建立大鼠第一磨牙牙髓损伤模型,用MCDs、壳聚糖/丝素蛋白微球、MCDs-CS/SF-MPs、氢氧化钙(Dycal)分别盖髓,对照组未给药。于盖髓14天及28天后处死大鼠并制作组织学切片,利用苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色

检测不同组大鼠第一磨牙修复性牙本质生成情况及牙髓炎症进展程度,利用免疫组织化学染色检测成牙相关蛋白 DMP-1 的表达情况。

结果:

1、成功合成 MCDs-CS/SF-MPs, 扫描电镜结果显示缓释微球基本呈球形, 大小较均匀, 直径约为 $2.08\pm 0.455\ \mu\text{m}$ 。微球中 MCDs 的负载量为 17.5%, 包封率为 87.5%, 体外释放实验显示微球释放可达 30 天, 并有继续释放趋势。

2、原代培养的人牙髓细胞不规则围绕在组织块周围, 呈放射状; 传代后细胞呈长梭形, “旋涡状”或者束状排列。

3、CCK8 结果显示: 低浓度的 MCDs-CS/SF-MPs 对人牙髓细胞的增殖表现出促进作用, 高浓度微球对细胞增殖则表现出抑制作用。

4、活死染色结果显示: 低浓度的 MCDs-CS/SF-MPs 对人牙髓细胞的存活无明显影响, 高浓度的微球导致人牙髓细胞中死细胞比例升高。

5、HE 结果显示: 盖髓 14 天后, MCDs-CS/SF-MPs 组修复性牙本质形成情况优于其他各组 ($p<0.05$); 盖髓 28 天后, MCDs-CS/SF-MPs 组修复性牙本质形成情况与 Dycal 组无明显差异 ($p>0.05$), 但优于其余各组 ($p<0.05$)。盖髓 14 天及 28 天后, MCDs-CS/SF-MPs 与 Dycal 组大鼠髓腔内炎症坏死面积百分比小于对照组 ($p<0.05$), 两者抑制髓腔内炎症效果无明显差异 ($p>0.05$)。

6、免疫组织化学染色结果显示: 盖髓 14 天及 28 天后, MCDs-CS/SF-MPs 组 DMP-1 的阳性表达较对照组更强。

结论:

1、MCDs-CS/SF-MPs 具有高载药量、包封率及优良的体外缓释效果。

2、MCDs-CS/SF-MPs 具有良好的细胞相容性。

3、MCDs-CS/SF-MPs 通过增强成牙相关蛋白 DMP-1 的表达促进牙本质矿化; MCDs-CS/SF-MPs 可促进修复性牙本质的早期形成, 效果优于 Dycal; 同时 MCDs-CS/SF-MPs 具有抑制髓腔内炎症进展的效果, 盖髓效果优良。

关键词:

碳点, 壳聚糖, 丝素蛋白, 盖髓剂, 修复性牙本质

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别： 硕士 博士

学科专业： 口腔医学

论文题目： 载二甲双胍碳点壳聚糖/丝素蛋白缓释微球盖髓效果的实验研究

作者签名： 胡珂

指导教师签名： 李毅

2023年5月29日

ABSTRACT

Experimental study on pulp capping effect of Metformin Carbon Dots Loaded CS/SF Sustained Release Microspheres

Background and objective:

Due to the special anatomical morphology and organizational structure of young permanent teeth, such as high pulp Angle, poor mineralization degree, thick apical foramina, etc, caries or trauma are very easy to cause pulp lesions or periapical lesions, which may shorten the life span of teeth and eventually lead to tooth loss. The technique of living pulp preservation is frequently employed in clinical practice to encourage the continuing development of the root, preserve the pulp function of the damaged tooth, and extend the time that the tooth is retained. The creation of novel pulp capping materials is crucial for the preservation of living pulp because there are still certain flaws in the currently available pulp capping agents. A type of nanomaterial called carbon point has strong biocompatibility, has fluorescent features, can stimulate the growth of new teeth and bones, and may be useful for preserving live tissue. Our research group has successfully synthesized metformin carbon dots(MCDs) and discovered that it effectively enhances odontoblast development in vitro. This study aims to create a sustained-release system with relatively ideal drug loading rate, encapsulation rate, and in vitro release effect using naturally occurring, inexpensive chitosan and silk fibroin protein, and to test the cytocompatibility of sustained-release microspheres by cultivating human dental pulp cells in vitro, as well as to study the impact of sustained-release microspheres on restorative dentin formation and the inhibitory effect on pulpitis by establishing to discuss the potential for therapeutic use of the microspheres in the preservation of living pulp and to assess the pulp capping impact of sustained-release microspheres.

Methods:

1. By using an emulsification crosslinking technique, metformin carbon dots-loaded chitosan/silk fibroin protein microspheres(MCDs-CS/SF-MPs) were created. Their drug loading rate, encapsulation rate, and in vitro release impact were all assessed.
2. Extracted and subcultured human dental pulp cells were used.
3. The effect of MCDs-CS/SF-MPs on the proliferation of dental pulp cells was examined using CCK8, and the survival of dental pulp cells was determined using Live/Dead assay.
4. The first molar pulp damage model in rats was constructed. The following materials were utilized to pulp the capping: MCDs, chitosan/fibroin microspheres, MCDs-CS/SF-MPs, and calcium hydroxide (Dycal). No drug was administered to the Control group. Rats were killed, and histological sections were prepared at 14 and 28 days following pulp coating. In the first molar of rats in various groups, prosthodontic dentin production and pulpitis progression were detected using hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression of the odontogen-related protein DMP-1 was detected using immunohistochemistry staining.

Results:

1. The MCDs-CS/SF-MPs were successfully created. The microspheres had a diameter of about $2.08 \pm 0.455 \mu\text{m}$, were substantially spherical in shape, according to scanning electron microscopy. The encapsulation rate was 87.5 %, and the loading capacity of MCDs in microspheres was 17.5 %. The microspheres could be released for 30 days, according to in vitro studies, and the release pattern persisted.
2. The primary hDPCs were irregularly radiated around the tissue mass. After passage, the hDPCs were long fusiform and arranged in a "vortex" or bundle.
3. According to CCK8 data, low concentrations of MCDs-CS/SF-MPs encouraged the proliferation of human dental pulp cells, whereas large concentrations of microspheres inhibited this growth.
4. According to the Live/Dead assay results, MCDs-CS/SF-MPs did not significantly affect the life of human dental pulp cells at low concentrations, but high

concentrations of microspheres increased the proportion of dead human dental pulp cells.

5. According to the HE results, the MCDs-CS/SF-MPs group had better repair dentin development after pulp capping for 14 days than the other groups ($p < 0.05$). After 28 days after pulp capping, the MCDs-CS/SF-MPs group's level of restorative dentin production was better than other groups ($p < 0.05$), but not substantially different from Dycal ($p > 0.05$). The percentage of necrotic area in the medullary cavity was lower in the MCDs-CS/SF-MPs and Dycal groups after 14 and 28 days of pulp capping than in the control group ($p < 0.05$), but there was no discernible difference between the two groups in terms of inhibiting intramedullary cavity inflammation ($p > 0.05$).

6. At 14 and 28 days after pulp capping, immunohistochemical staining revealed that the positive expression of DMP-1 in the MCDs-CS/SF-MPs group was stronger than that in the control group.

Conclusion:

1. High loading and encapsulation rates as well as a great in vitro sustained release effect are all characteristics of MCDs-CS/SF-MPs.

2. The biocompatibility of MCDs-CS/SF-MPs is good.

3. DMP-1 expression can be increased and dentin mineralization promoted by MCDs-CS/SF-MPs. MCDs-CS/SF-MPs had a better effect than Dycal at promoting the early production of restorative dentin. The development of intramedullary inflammation can be slowed down by MCDs-CS/SF-MPs. The pulp capping effect is good.

Key words:

carbon dots, chitosan, silk fibroin, pulp capping agent, restorative dentin

目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 碳点的生物学特性	1
1.2 二甲双胍的生物学特性	2
1.3 二甲双胍碳点的生物学特性	3
1.4 药物载体的选择	4
1.4.1 壳聚糖	4
1.4.2 丝素蛋白	5
1.5 本实验研究内容	6
第 2 章 材料与amp;方法	7
2.1 实验材料	7
2.1.1 实验材料与试剂	7
2.1.2 实验设备	8
2.2 实验方法	9
2.2.1 MCDs-CS/SF-MPs 的制备及体外释放	9
2.2.1.1 MCDs-CS/SF-MPs 的制备	9
2.2.1.2 MCDs-CS/SF-MPs 的体外释放	10
2.2.2 人牙髓细胞的提取与培养	10
2.2.3 MCDs-CS/SF-MPs 对 hDPCs 增殖和存活的影响.....	11
2.2.3.1 CCK8 检测	11
2.2.3.2 活/死细胞染色	11

2.2.4 牙髓损伤模型的建立	12
2.2.5 组织学切片制作	13
2.2.6 组织学观察	14
2.2.6.1 HE 染色	14
2.2.6.2 免疫组织化学染色	15
2.2.7 数据分析	16
第 3 章 结果.....	17
3.1 MCDs-CS/SF-MPs 的体外释放.....	17
3.2 人牙髓细胞的形态观察	18
3.3 CCK8 检测细胞增殖情况	18
3.4 活死染色检测细胞存活情况	19
3.5 HE 染色结果	21
3.6 免疫组织化学染色结果	24
第 4 章 讨论.....	26
4.1 MCDs-CS/SF-MPs 的合成和体外释放.....	26
4.2 MCDs-CS/SF-MPs 的细胞相容性	26
4.3 大鼠牙髓损伤模型的建立	27
4.4 HE 染色结果分析	28
4.5 免疫组织化学染色结果分析	30
4.6 总结.....	31
第 5 章 结论.....	32

参考文献.....	33
作者简介及科研成果	40
致谢.....	41

中英文缩写表

缩略词	英文全称	中文全称
CDs	Carbon dots	碳点
Met	Metformin	二甲双胍
MCDs	Metformin carbon dots	二甲双胍碳点
DPSCs	Dental stem cells	牙髓干细胞
DPCs	Dental cells	牙髓细胞
SHEDs	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth	脱落乳牙干细胞
BMSCs	Bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
CS	Chitosan	壳聚糖
SF	Silk fibroin	丝素蛋白
GP	Genipin	京尼平
CS/SF-MPs	Chitosan/silk fibroin protein microspheres	壳聚糖丝素蛋白微球
MCDs-CS/SF-MPs	Metformin carbon dots-loaded chitosan/silk fibroin protein microspheres	载二甲双胍碳点壳聚糖丝素蛋白微球
AMPK	Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase	单磷酸腺苷活化蛋白激酶
ERK	Extracellular regulated protein kinases	细胞外调节蛋白激酶
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
DMP	Dentin matrix proteins	牙本质基质蛋白
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
HE	Hematoxylin-eosin	苏木精-伊红

第 1 章 绪论

牙髓作为牙体结构重要组成成分之一，具有众多不可替代的功能，如：形成牙本质、感觉、营养、防御、修复等，在牙体结构长期保存和行使牙体组织功能中发挥重要意义^[1]。牙髓组织在龋病及牙外伤等口腔常见疾病影响下易发生不可逆性牙髓损伤^[2]。年轻恒牙由于牙体硬组织矿化程度较差、牙本质小管粗大、髓腔接近牙体表面、髓腔大髓角高等原因，龋病发生后进展快速，短期内易波及牙髓和根尖周组织，进而导致牙根停止发育，影响牙齿寿命^[3]。传统的治疗方法是通过根管治疗将感染的牙髓、牙本质及毒性分解产物彻底清除，并对根管进行扩大、清理、冲洗和消毒等一些列操作，最终用充填材料封闭整个根管系统。年轻恒牙由于根尖孔未闭合不能形成有效的封闭，且根管治疗后失去牙髓营养的牙体组织变得脆弱，承受咬合力时易发生折断；无髓牙将丧失冷热等部分感觉；根管治疗后容易因牙冠微渗漏引起根尖周疾病等^[4,5]。所以，目前对于年轻恒牙牙髓损伤的治疗方法主要采用活髓保存术，通过运用盖髓材料刺激牙髓形成修复性牙本质，保留健康的牙髓并维持其活性，继续发挥正常生理功能，促进牙根发育和根尖孔形成，提高牙体保存率^[2]。

由此可知，盖髓材料在活髓保存治疗中至关重要^[6]。目前，普遍认为理想盖髓剂应具备以下性能^[7]：1、具有良好的生物相容性，对牙髓无毒无刺激；2、诱导牙髓细胞分化、形成修复性牙本质；3、具有抗菌能力和渗透作用，能为牙本质桥的形成提供无菌环境；4、药效持久稳定，成本较低，使用方便。随着对活髓保存治疗研究的深入，寻求一种具有低创伤、高成功率的新型盖髓制剂已成为当下牙科医疗的热门研究之一。

1.1 碳点的生物学特性

碳点（Carbon dots, CDs）是一种表面富含官能团的零维碳基纳米材料，粒径一般小于 20 nm，具有优异的光学性质、良好的生物相容性以及低毒性，易于功能化修饰，已在众多领域得到了广泛的应用^[8,9]。CDs 在促进细胞成骨领域，展

现出众多优良特性,如:清除自由基、促进细胞的增殖和粘附、调节成骨相关基因的表达及增强矿物质沉积等。Lu 等人^[10]以间苯三酚和苯酚为原料,通过水热法合成富含羟基的生物相容性碳点,具有强荧光、高稳定性和低细胞毒性的同时还可以清除自由基,减少细胞培养中活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的数量,抑制氧化应激损伤和细胞衰老,促进细胞生长和存活。CDs 的球形结构提高了表面积与体积的比值,从而增加了与细胞的接触面积,改善了细胞与营养物质之间的相互作用,达到促进细胞粘附和增殖的目的^[11]。Gogoi 等^[12]合成的碳点改性羟基磷灰石纳米杂化物对 MG 63 成骨细胞的细胞增殖和碱性磷酸酶活性明显优于其他组,证明 CDs 的加入促进了细胞的增值及成骨相关基因的表达。Lu 等^[13]制造了一种新型 CDs 掺杂壳聚糖/纳米羟基磷灰石支架,体外实验证明掺入 CDs 后该支架上调了大鼠骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)中成骨相关基因的 mRNA 表达水平,以及碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)表达水平,促进成骨细胞生长和骨基质矿化,增强骨基质合成。

牙髓中的干细胞与 BMSCs 是来源相似的间充质干细胞系,生物学性能具有相似性。CDs 作用于牙髓干细胞(Dental pulp stem cells, DPSCs)或可产生相似的效果,目前已有研究证明 CDs 具有诱导 DPSCs 牙源性分化的能力。Liu 等^[14]以抗坏血酸和聚乙烯亚胺为原料制备的 CDs 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路、激活自噬,诱导 DPSCs 的细胞外基质分泌,从而提高 DPSCs 的成牙分化能力。因此,碳点可能成为一种具有促进牙髓修复与牙本质再生潜力的活髓保存剂。

1.2 二甲双胍的生物学特性

近年来研究表明,降糖药物二甲双胍(Metformin, Met)同样具有成牙潜力。Wang 等^[15]将 Met 掺入树脂中探究对 DPSCs 牙源性分化及矿物质合成的影响,发现含 Met 树脂上的 DPSCs 的牙源性分化相关基因的表达远高于对照树脂组;ALP 和茜素红染色结果显示实验组矿物质沉积更多,证明 Met 可促进 DPSCs 牙源性分化并促进矿物质沉积。Qin 等^[16]的研究同样证明 Met 可刺激牙源性分化相关基因的表达,促进碱性磷酸酶活性,增强的矿化结核形成;探究其促进 DPSCs 向

成牙本质细胞分化作用的机制发现, Met 提高了 DPSCs 中磷酸化 AMPK 的表达水平, 提示 Met 促进细胞牙源性分化与 AMPK 信号通路的激活相关。

1.3 二甲双胍碳点的生物学特性

以二甲双胍和柠檬酸为原材料合成的二甲双胍碳点(Metformin carbon dots, MCDs), 不仅具备 CDs 的理化性质, 同时保留了 Met 促进 DPSCs 向成骨/成牙本质细胞分化的特性, 有望作为一种潜在的促进牙髓组织修复再生的活髓保存制剂。Ren^[17]等在探究 MCDs 对炎症状态下的 BMSCs 成骨潜能的影响时, 利用脂多糖体外模拟炎症微环境, 加入不同浓度的 MCDs 处理炎症环境中及正常环境中的 BMSCs, 相较于未加入 MCDs 组, 含 MCDs 组的 BMSCs 中碱性磷酸酶活性更高、钙沉积结节形成更多、成骨基因和蛋白质的表达更强, 证明 MCDs 在炎症状态及正常状态下均可促进 BMSCs 的成骨分化; 进一步对其作用机制进行研究, 发现经 MCDs 处理后 BMSCs 的 ERK 和 AMPK 信号通路分子水平均明显升高, 说明 MCDs 在增强 BMSCs 的成骨分化过程中激活了 ERK 和 AMPK 信号通路。本课题组前期实验结果表明, MCDs 可上调成牙相关基因(DSPP、DMP-1、RUNX2、SP7)和蛋白质(DSPP、DMP1)的表达; 探究其作用机制发现: 向 DPSCs 中加入自噬抑制剂处理, 成牙相关基因及蛋白质的表达明显下降, 说明 DPSCs 成牙分化与自噬途径相关; 通过蛋白质印迹(Western bolt, WB)检测及透射电子显微镜观察发现, MCDs 处理的 DPSCs 自噬相关蛋白分泌增高、自噬体增多, 说明 MCDs 增强 DPSCs 的牙源性分化与自噬激活相关^[18]。

由此, 我们考虑将 MCDs 运用到活髓保存制剂的相关研究中以期达到牙髓损伤修复、牙本质再生及矿化的目的。为将来引入纳米材料应用于组织工程和再生医学等新兴领域提供前期基础。

1.4 药物载体的选择

1.4.1 壳聚糖

壳聚糖 (Chitosan, CS) 是天然大分子中含量最丰富的多糖之一, 存在于节肢动物的外骨骼或真菌和酵母的细胞壁中, 是由 D-氨基葡萄糖和 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖通过 β - (1,4) -糖苷键组成的共聚物^[19]。壳聚糖具有良好的生物特性, 如: 生物相容性、生物降解性、广谱抗菌活性、促进伤口愈合的能力、止血作用等, 已被广泛应用于抗菌剂、药物递送、伤口敷料、组织工程等领域^[20]。现有研究提示: 壳聚糖制备的药物载体具有靶向性和缓释控释特性, 常用的载体形式包括微球、微/纳米颗粒、微胶囊、药片、薄膜、凝胶等^[21, 22], 其药物控制释放的机制为^[23]: (1) 吸附在载体表面附近的药物接触到释放介质时, 通过扩散进入介质; (2) 介质渗透进入壳聚糖导致基体溶胀, 壳聚糖转变为凝胶态基体, 然后药物从溶胀的凝胶态基体中扩散释放; (3) 壳聚糖降解产生溶蚀效果从而释放其负载药物^[24]。

壳聚糖除作为药物载体负载药物外, 同时具有优异的抗菌性能及促进干细胞分化能力, 可与负载药物共同发挥作用促进牙髓愈合及牙髓-牙本质复合体的再生。壳聚糖具有广谱抗菌性能, 对细菌和真菌均有抑制作用。研究表明, 壳聚糖对持续性牙髓感染中常见的粪肠球菌 (细菌) 和白色念珠菌 (真菌) 的浮游形态和生物膜均产生抑制效果, 可降低培养液中游离微生物数量, 抑制生物膜中微生物的代谢活性、延缓生物膜的形成^[25, 26]。壳聚糖的抗菌性能可为损伤牙髓提供无菌环境, 促进牙髓愈合。目前普遍认同的观点是: 壳聚糖的抗菌机制可能与壳聚糖的聚阳离子特性相关, 通过氨基上的正电荷与细菌表面的负电荷相互作用, 导致细胞膜通透性的变化诱导细菌破裂死亡^[27, 28]; 或通过抑制细菌的遗传物质的转录和翻译达到抗菌作用^[29]; 或与细菌生长必须金属离子螯合抑制细菌生长达到抑菌作用^[30]。

有报道指出, 壳聚糖可促进 DPSCs 成牙分化。Porrelli 等^[31]将乳糖改性的壳聚糖均匀涂覆在支架多孔结构表面研究其对 DPSCs 成牙分化的作用, 发现乳糖

改性壳聚糖的加入促进了 DPSCs 碱性磷酸酶的表达, 并使矿物质沉积增加, 证明其在促进 DPSCs 牙源性分化中具有一定作用。壳聚糖还可促进脱落乳牙干细胞(Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs)成牙分化, 在 Subhi 等^[32]的实验中发现壳聚糖加入到水门汀内后 SHEDs 的牙源性分化标志物表达水平较加入前升高并具有统计学意义, 证明壳聚糖的加入促进了 SHEDs 的成牙本质向分化。体内研究同样证明壳聚糖促进干细胞成牙分化的效果, Ashry 等^[33]在狗盖髓模型中将壳聚糖与 MTA 作为盖髓剂, 检测到添加壳聚糖的 MTA 组样品中 DSPP 的 mRNA 表达水平较仅使用 MTA 组显著提高, 进而说明壳聚糖具有促进 DPSCs 牙源性分化的能力。

壳聚糖的这些优良特性使其在活髓保存制剂的研究中发挥重要作用, 但其仍有不足: 壳聚糖结晶度较低, 分子排列松散、体内降解速度过快^[34], 通常需要进行表面修饰或与其他材料复合改性, 由此我们引入丝素蛋白与壳聚糖形成复合材料, 优化材料性能。

1.4.2 丝素蛋白

丝素蛋白 (Silk fibroin, SF) 是一种从蚕丝中提取的天然高分子物质, 组成成分为 18 种氨基酸, 有效的保证了材料的生物安全性^[34]。丝素蛋白和丝胶蛋白共同组成了蚕茧, 目前获得丝素蛋白的方法主要通过热化学处理蚕茧, 即选择弱碱性试剂 (如 Na_2CO_3) 在 100°C 下加热 30~60 min, 脱去丝胶蛋白; 此时得到的丝素蛋白为不溶性的 silk II 型晶体结构, 可通过高浓度盐溶液 (如 CaCl_2 、LiBr 等) 转化为可溶性的 silk I 型晶体结构, 后通过透析、离心去除盐离子及杂质, 得到再生丝素蛋白溶液, 4°C 可保存 1 个月, 冻干后可保存数年^[35]。丝素蛋白在体内可被多种酶如蛋白酶 XIV、胶原酶 IA 等降解且降解产物无毒害, 降解速率受降解酶的类型及丝素蛋白结晶度的影响^[36]。目前丝素蛋白作为药物递送系统表现出载药量较高、药物控释效果良好的特点。

丝素蛋白作为药物载体机械性能欠佳^[37], 与壳聚糖复合使用制成载药微球, 微球内部形成聚合物网络, 既改善了丝素蛋白机械性能不佳的缺陷、又弥补了壳聚糖降解速率快的不足, 是一种性能较为优异的药物控释载体。因此, 本实验旨

在以壳聚糖/丝素蛋白微球 (Chitosan/silk fibroin protein microspheres, CS/SF-MPs) 为载体, 负载 MCDs 使其以一定释放速度缓慢释放, 在有效浓度水平长期作用, 从而调节细胞的生理活动和牙髓-牙本质复合体的再生。

1.5 本实验研究内容

前期研究表明, MCDs 的浓度影响 DPSCs 的增殖及分化, 低浓度的 MCDs 促进 DPSCs 的增殖及成牙分化, 高浓度的 MCDs 抑制 DPSCs 的增殖及活性, 且细胞毒性随着培养时间的延长而增加^[38]。牙髓反应并形成致密的修复性牙本质桥是一个需要时间的复杂过程, 因此, 我们将 MCDs 载入 CS/SF-MPs 内, 以期维持 MCDs 长期低浓度释放, 作用于损伤部位实现修复性牙本质的再生。

本实验制备出载二甲双胍碳点的壳聚糖/丝素蛋白微球 (Metformin carbon dots-loaded chitosan/silk fibroin protein microspheres, MCDs-CS/SF-MPs), 体外采用 CCK8 技术及细胞活死染色评估缓释微球的生物相容性; 体内实验建立大鼠牙髓损伤模型, 探究缓释微球对牙髓炎症的抑制作用及修复性牙本质形成情况, 为新型盖髓剂的研制提供理论基础。

第 2 章 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验材料与amp;试剂

表 2.1 实验材料与amp;试剂

材料、试剂名称	产地
壳聚糖（脱乙酰度>95%，MW：60-80w）	北京伊诺凯，中国
碳酸氢钠（分析纯）	北京化工厂，中国
无水氯化钙	北京化工厂，中国
无水乙醇	西陇科学股份有限公司，中国
液体石蜡	西陇科学股份有限公司，中国
蚕茧	西北桑蚕基地，中国
Span80	天津大茂化学试剂厂，中国
甲醇	天津大茂化学试剂厂，中国
京尼平	临川之信生物科技，中国
冰乙酸	天津新通，中国
石油醚	天津新通，中国
异丙醇	天津新通，中国
盐酸	天津新通，中国
透析袋（MW:14000）	白鲨生物，中国
磷酸盐缓冲液（PBS）	白鲨生物，中国
高糖培养基	Hyclone 公司，美国
双抗（青链霉素混合液）	Hyclone 公司，美国
胰蛋白酶	Hyclone 公司，美国
胎牛血清	Gibco 公司，美国

续表

表 2.1 实验材料与试剂

聚乙二醇 20000	索莱宝, 中国
I 型胶原酶	索莱宝, 中国
Dispase 酶	索莱宝, 中国
中性树胶	索莱宝, 中国
CCK8 试剂盒	新赛美生物, 中国
Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	碧云天生物, 中国
抗原修复液	迈新生物技术公司, 中国
免疫组化试剂盒	迈新生物技术公司, 中国
DAB 显色试剂盒	迈新生物技术公司, 中国
羊抗鼠、兔二抗试剂盒	迈新生物技术公司, 中国
一抗 DMP-1	Affinity-江苏亲科生物, 中国
Dycal	登士柏西诺德牙科产品公司, 中国

2.1.2 实验设备

表 2.2 主要仪器设备

仪器名称	产地
SW-CJ-IF 无菌超净台	AirTech 公司, 美国
CO ₂ 恒温细胞培养箱	Thermo 公司, 美国
TGA-16G-A 高速离心机	上海安亭离心机械厂, 中国
酶标仪 RT-6000	Bio-Rad, 美国
冷冻干燥机	Vitis 公司, 美国
恒温振荡器	哈尔滨东联电子公司, 中国
数显恒温水浴箱	北京东仪世博仪器有限公司, 中国
超声波清洗机	上海尚仪仪器设备有限公司, 中国
真空干燥箱	上海恒科学仪器有限公司, 中国
C-MAG HS7 磁力搅拌器	IKA 公司, 德国

续表

表 2.2 主要仪器设备

1712Mps 电子天平	Sartoriccs 公司, 德国
纯水系统	Millipore 公司, 德国
倒置荧光显微镜及照相系统	OLYMPUS 公司, 日本
光学显微镜	OLYMPUS 公司, 日本
高压蒸汽灭菌锅	HICLAVE 公司, 日本
石蜡包埋机	美康公司 (德国)
石蜡切片机	徕卡-2016 (德国)
恒温摊片烤片机	泰维科技公司, 中国

2.2 实验方法

2.2.1 MCDs-CS/SF-MPs 的制备及体外释放

2.2.1.1 MCDs-CS/SF-MPs 的制备

MCDs-CS/SF-MPs 的制备参照杨亚兰的方法^[39]: 以 MCDs、壳聚糖及丝素蛋白为原料, 采用乳化交联的方法合成 MCDs-CS/SF-MPs。

具体制备步骤如下: ①制备水相: 配制 1 %的乙酸溶液, 将 MCDs 按照 15 mg/mL 的比例投入乙酸溶液中, 低速磁力搅拌得 MCDs-乙酸溶液; 将 CS 粉末按照 30 mg/mL 的比例投入 MCDs-乙酸溶液中, 磁力搅拌 30 min, 得到褐色粘稠的 MCDs-CS 混合溶液, 4°C静置除泡; 将 MCDs-CS 溶液与 3 %SF 溶液等体积混合, 磁力搅拌 60 min, 得到棕黑色溶液, 为水相; ②油相制备: 将液体石蜡与 Span 80 按照体积比为 49 : 1 混合, 磁力搅拌 30 min 得到油相; ③乳化: 将水相与油相按照体积比 1 : 5 混合, 35°C, 750 r/min 磁力搅拌, 乳化 30 min; ④交联: 将 GP 溶液 (5 mg/mL, 溶于无水乙醇) 与油相体积比为 1 : 10 加入乳化体系, 40°C, 750 r/min 磁力搅拌固化交联 120 min 得到墨绿色悬浊液, 内有墨绿色颗粒; ⑤洗涤干燥: 转移悬浊液至离心管中, 离心机设置为 3000 r/min, 10 min, 离心完成后收集沉淀物, 用石油醚、异丙醇、去离子水依次洗涤沉淀物各三次,

冷冻干燥得到墨绿色 MCDs-CS/SF-MPs。

2.2.1.2 MCDs-CS/SF-MPs 的体外释放

分别称取 10 mg MCDs-CS/SF-MPs 和 CS/SF-MPs (在制备 MCDs-CS/SF-MPs 过程中省去加入 MCDs 的步骤, 既可得到 CS/SF-MPs), 研磨成粉后用 0.1 mol/L 盐酸定容至 10 mL, 超声震荡充分溶解微球, 后将溶液转移至离心管中离心, 取上清液测定其在 336 nm 处吸光度值, 根据标准曲线计算上清液内 MCDs 的浓度, 随后算出微球的载药量及包封率。

取 100 mg MCDs-CS/SF-MPs、100 mg CS/SF-MPs, 分别投入含 10 mL PBS 溶液的离心管中, 在 37°C、100 r/min 的恒温振荡器中连续振荡, 每隔 24 小时取出离心管, 离心后取少量上清液测量其在 336 nm 处吸光度值, 同时补入的等量的 PBS。根据标准曲线计算 MCDs 的释放量及累计释放率。

2.2.2 人牙髓细胞的提取与培养

(1) 细胞来源: 实验所需牙髓细胞来源于患者因正畸拔除的前磨牙或者因阻生拔除的第三磨牙, 牙齿从吉林大学口腔医院颌面外科门诊收集, 其中患者年龄 15-22 周岁, 拔出牙齿完好、无龋损及根尖周炎。

(2) 细胞提取与培养: 牙齿拔出后, 迅速置入含 10% 双抗的培养基中, 4°C 保存, 并于 4 小时内完成人牙髓细胞 (Human dental cells, hDPCs) 的提取。在超净台内清理牙齿表面, 剔净牙齿表面组织, 劈开牙齿取出牙髓组织, 依次使用含 10% 双抗的高糖培养基及纯高糖培养基冲洗 3 遍, 用眼科剪剪碎牙髓, 置入 3 mg/mL I 型胶原酶 + 4 mg/mL Dispase 酶的混合液中 37°C 消化 30~60 min, 肉眼观测牙髓组织呈云雾状时加入含 1% 双抗+20% 血清的高糖培养基终止消化, 离心机 1000 r/min, 5 min 后弃上清。细胞转移至培养瓶中并加入 3 mL 含 1% 双抗+20% 血清的高糖培养基于 37°C 恒温孵育箱中进行原代培养。

(3) 细胞传代: 观察组织块周围细胞生长情况, 待细胞融合至 70%-80% 后传代培养, 弃除原培养基, PBS 清洗后胰酶消化 30 s~1 min, 终止消化、轻轻吹打, 将细胞悬液转移至离心管中, 离心机 1000 r/min, 5 min 后弃上清, 按照 1:

2~1:3 细胞传代, 传代培养用含 1%双抗+10%血清的高糖培养基, 每隔两天换液一次。后续试验采用第 3~4 代细胞。

2.2.3 MCDs-CS/SF-MPs 对 hDPCs 增殖和存活的影响

2.2.3.1 CCK8 检测

将 MCDs-CS/SF-MPs 于超净台内紫外照射消毒 1 小时备用。用含 1%双抗+10%血清的高糖培养基配置不同浓度 (0、0.5、1、1.5、2、2.5 mg/mL) 的 MCDs-CS/SF-MPs 混悬液。

取 3~4 代 hDPCs 以 3×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 放入细胞孵箱中培养 24 小时。观察到细胞贴壁良好, 弃除原培养基, 加入含不同浓度微球的培养基, 200 μ l/孔, 每组 5 个副孔, 期间每 2 天换一次液。在培养 1、3、7 天后, 终止培养并用 PBS 冲洗, 每孔加入 100 μ l 的含 1%双抗+10%血清的高糖培养基及 10 μ l CCK8, 孵育 3 小时后, 用酶标仪于 450 nm 处测吸光度值。重复实验三次。

2.2.3.2 活/死细胞染色

取 3~4 代 hDPCs 以 5×10^3 个/孔的密度接种到 24 孔板中, 放入细胞孵箱中培养, 待细胞贴壁良好, 弃除原培养基, 加入含不同浓度 (0、0.5、1、1.5、2、2.5 mg/mL) 微球的培养基, 500 μ l/孔, 期间每 2 天换一次液。在培养第 7 天时, 进行细胞活死染色。分别取 5 μ l 的 Calcein AM 与 5 μ l PI 加入到 5 mL 的检测缓冲液中即得到 Calcein AM/PI 检测工作液。去除原培养基, 用 PBS 清洗, 后每孔加入 250 μ L 的检测工作液, 37°C 细胞培养箱内避光孵育 30 min。染色完成后在荧光显微镜下观察并拍照, 用 Image j 软件进行细胞计数 (Calcein AM 为绿色荧光, 染色活细胞, Ex/Em=494/517 nm; PI 为红色荧光, 染色死细胞, Ex/Em=535/617 nm)。

2.2.4 牙髓损伤模型的建立

本实验在吉林大学动物实验中心设施开展（SYXK（吉）2018-0001），在吉林大学基础医学院动物伦理福利委员会监督下开展（IACUC），遵守吉林大学及国家对于实验动物伦理福利的要求，饲养条件严格依照 GB14925 进行，实验的伦理编号是：2022 年研审第 455 号。用于实验的大鼠共 50 只，均为 8 周龄、体重 180~220 g 的 SPF 级雄性 Wistar 大鼠，来源于长春市亿斯实验动物技术有限公司。适应性饲养 1 周后，大鼠随机分为 5 组，每组各 10 只：

- （1）空白对照组（Control 组）
- （2）MCDs 组
- （3）CS/SF-MPs 组
- （4）MCDs-CS/SF-MPs 组
- （5）Dycal 组

大鼠称重，用 1.5~2 % 异氟烷吸入麻醉后 3 % 戊巴比妥钠（1 mL/kg）行腹腔注射麻醉，固定四肢成仰卧位于手术板上。牵拉口角，暴露牙位，口腔内黏膜常规消毒，酒精棉球擦拭大鼠左侧上颌第一磨牙表面，用 1/4 球钻在该牙殆面中央备洞，至洞底透出粉红色，用 15#K 锉于洞底中央穿髓，生理盐水冲洗，无菌棉球轻轻压迫止血，露髓处放置各实验分组相关药物，后用玻璃离子（富士IX）充填窝洞，调殆，术后进食软食。手术过程如图 2.1 所示。



图 2.1 大鼠牙髓损伤模型建立过程

A：1/4 球钻在大鼠左上第一磨牙殆面中央备洞，洞底透出粉红色，用 15#K 锉于洞底中央穿髓；B：止血，露髓处放置各实验分组相关药物；C：玻璃离子（富士IX）充填窝洞，调殆

2.2.5 组织学切片制作

按处死时间将各组大鼠随机分为两小组，每组 5 只，分别为 14 天组和 28 天组。

(1) 动物处死：在规定的时点，异氟烷吸入麻醉后，固定于手术板上，4%的多聚甲醛心脏灌注固定处死。

(2) 样本分离与固定：迅速分离大鼠左侧上颌骨置于包埋盒中，然后将包埋盒放入新配置的 4%多聚甲醛溶液中，4℃固定 48 h。

(3) 脱钙：流水冲洗 1 h，将包埋盒放入 10%EDTA(PH=7.4)脱钙液中，装有脱钙液的容器置于 37℃恒温振荡器中脱钙，每 2 天更换一次脱钙液，待到组织块质韧，注射器针头可扎透组织时完成脱钙。

(4) 取材：用刀片修剪脱钙完成后的组织块，仅保留左上第一磨牙及周围牙槽骨，使其为长方体结构，置于包埋盒中。

(5) 脱水：流水冲洗 2 h，梯度酒精脱水：将包埋盒依次放入 60%乙醇、70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇I、95%乙醇II各 2 h，再放入无水乙醇I过夜，然后将包埋盒依次转移到无水乙醇II、正丁醇I、正丁醇II中各脱水 30 min。

(6) 透明：将包埋盒依次转移到二甲苯I、二甲苯II各 15 min。

(7) 浸蜡：在 60℃恒温箱内，组织转移到石蜡二甲苯、石蜡I、石蜡II、石蜡III各浸泡 30 min。

(8) 包埋：将组织块颊侧面朝下放置，紧贴包埋盒底，组织块近中侧朝向包埋盒前端，远中侧朝向包埋盒后端。灌注蜡液，待蜡块冷却成形后于冰箱 4℃保存。

(9) 切片：平行于牙体长轴方向作近远中向连续切片，切片需暴露第一磨牙牙齿冠根，每张切片 3 μm 。60℃烤片 2 h 后，载玻片置于冰箱 4℃保存。

2.2.6 组织学观察

2.2.6.1 HE 染色

将 4°C 保存的石蜡切片在 60°C 复烤 30 min，然后按照如下步骤进行 HE 染色：

- (1) 将切片置于二甲苯中脱蜡 15 min*2 次；
- (2) 梯度乙醇水化：无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、85%乙醇各 5 min，流水冲洗 5 min；
- (3) 苏木精染色 3 min，流水冲洗 30 s，1%盐酸乙醇分化 3 s，流水冲洗 15 s，氨水返蓝 10 s；
- (4) 伊红染色 5 min，流水稍洗 2s；
- (5) 梯度乙醇脱水：80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇各 2-5s，无水乙醇 10 min；
- (6) 切片置于二甲苯中透明 5 min*2 次，中性树胶封片，显微镜下观察染色结果并拍照；
- (7) 为评估不同药物对大鼠牙髓的影响，对每组切片进行打分评估修复性牙本质形成情况，打分标准参考赵举红^[40]的方法并加以细化，如表 2.3 所示；同时计算髓腔内炎症坏死面积百分比，用以评估药物对牙髓炎症的抑制作用，并统计有无显著性差异。

表 2.3 基于硬组织形成的大鼠牙髓组织反应评分标准

打分	牙本质形成程度
0	无牙本质形成；
1	<25 %牙本质桥形成；
2	25 %-50 %牙本质桥形成；
3	50 %-75 %牙本质桥形成；
4	>75 %牙本质桥形成，未完全覆盖暴露区域；
5	连续牙本质桥形成完全覆盖暴露区域。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/476021223003010054>