

α 2-巨球蛋白对X线照射后人皮肤成纤维细胞的抗氧化及抗纤维化的作用

孔祥波¹, 刘 仰², 陈雪英², 李浣洋², 李 洁², 葛雅平², 房思炼²

(中山大学附属 1. 孙逸仙纪念医院口腔科, 广东 广州 510120; 2. 第六医院口腔颌面外科, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】研究 α 2-巨球蛋白(α 2M)对X线照射后人皮肤成纤维细胞(HSF)超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和HSF细胞向肌成纤维细胞转化过程中的影响。【方法】分别使用0、5、10、15、20 Gy X线照射HSF细胞,在照射后第1天检测细胞培养基上清液中 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量、SOD活性的变化,在照射后第5天采用Western blot检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的蛋白表达变化,以选定合适的照射剂量。用以上合适剂量照射HSF细胞,分别于照射前1 h、照射后1 h实验组细胞培养基中加入终浓度为0.25 mg/mL、0.5 mg/mL的 α 2M,检测并比较不同实验组细胞培养基上清液中 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量、SOD活性和 α -SMA蛋白表达的变化情况。【结果】5~20 Gy X线照射HSF细胞后, $\cdot\text{O}_2^-$ 含量逐渐增多,SOD活性逐渐降低, α -SMA蛋白表达量逐渐升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。10 Gy X线照射后1 h加入 α 2M,可明显减少照射后HSF细胞 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量,提高SOD活性,下调放射后HSF细胞 α -SMA的蛋白表达,差异具有统计学意义($P<0.05$),照射前1 h给药则无明显变化。【结论】X线照射后的HSF细胞明显增加 $\cdot\text{O}_2^-$ 释放量,同时SOD活性降低,并有向肌成纤维细胞转化的趋势;而X线照射后加入 α 2M可明显减少受照射HSF细胞的 $\cdot\text{O}_2^-$ 释放量,提高其SOD活性,并抑制向肌成纤维细胞转化的趋势,说明 α 2M可通过抗氧化和抗纤维化起到放射保护作用。

关键词: α 2-巨球蛋白;放射损伤;人皮肤成纤维细胞;抗氧化;抗纤维化

中图分类号: R782.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)01-0048-06

Effect of Alpha2-macroglobulin on Anti-Oxidation and Anti-Fibrosis in Human Skin Fibroblasts after X-ray Irradiation

KONG Xiang-bo¹, LIU Yang², CHEN Xue-ying², LI Huan-yang², LI Jie², GE Ya-ping², FANG Si-lian²

(1. Department of Stomatology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510655, China)

Corresponding to: FANG Si-lian; Email: fangsilian@126.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effect of alpha2-macroglobulin (α 2M) on superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) content, superoxide dismutase (SOD) activity and the process of cell-to-myofibroblast transformation in human skin fibroblasts (HSF) after X-ray irradiation. 【Methods】 HSF cells were irradiated with 0, 5, 10, 15 and 20 Gy X-ray. The change of $\cdot\text{O}_2^-$ content and SOD activity in the supernatant of cell culture medium were measured on the first day after irradiation. The protein expression of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) was detected by Western blot on the fifth day after irradiation. The most sensitive radiation dose is selected. HSF cells were irradiated with the above sensitive dose. Respectively, 1h before irradiation, 1 h after irradiation, the experimental group cell culture medium was added to a final concentration of 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL of α 2M. The change of $\cdot\text{O}_2^-$ content, SOD activity and the protein expression of α -SMA were

收稿日期: 2017-10-20

基金项目: 广东省自然科学基金(2015A030313064); 广东省科技计划项目(2014A020212127)

作者简介: 孔祥波, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 牙周病学, E-mail: 13822183636@163.com; 房思炼, 通信作者, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 口腔颌面外科学, E-mail: fangsilian@126.com

detected. 【Results】 HSF cells were irradiated with 5~20 Gy doses of X-ray. $\cdot O_2^-$ content increased, SOD activity decreased and α -SMA protein expression increased gradually ($P < 0.05$). The addition of $\alpha 2M$ at 1 h after 10Gy X-ray irradiation reduced the $\cdot O_2^-$ content, increased the SOD activity and downregulated the protein expression of α -SMA in HSF cells ($P < 0.05$). There was no significant change in the administration at 1 h before irradiation. 【Conclusion】 HSF cells increased $\cdot O_2^-$ content significantly, while SOD activity decreased, and the tendency to transform myofibroblasts after X-ray irradiation. $\alpha 2M$ can reduce the $\cdot O_2^-$ content, increase the SOD activity in HSF cells and inhibit the transformation of fibroblasts into myofibroblasts after irradiation. Indicating that $\alpha 2M$ can play a role in radiation protection by anti-oxidation and anti-fibrosis.

Key words: alpha2-macroglobulin; radiation injury; human skin fibroblasts; anti-oxidation; anti-fibrosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2018, 39(1):48-53]

放射性颌骨坏死 (osteoradionecrosis of the jaws, ORNJ) 常发生于鼻咽癌等头颈恶性肿瘤放疗之后, 是一种渐进性颌骨坏死, 可导致患者组织坏死溃烂、缺损畸形甚至病理性骨折等症状^[1-3]。在前期研究中, 我们发现 $\alpha 2$ -巨球蛋白 (alpha2-macroglobulin, $\alpha 2M$) 为 ORNJ 患者血清中差异性低表达蛋白, 并获得临床样本验证^[4-5], 这提示 $\alpha 2M$ 与颌骨电离辐射损伤有着密切关系, 但机制未明。 $\alpha 2M$ 是血浆中一类重要的大分子糖蛋白, 是体内广谱的蛋白酶抑制剂^[6]。近年来随着研究的不断深入, 发现 $\alpha 2M$ 具有广泛、多样的生物学功能。此外, 有研究发现 $\alpha 2M$ 可通过使受电离辐射的体外细胞 ROS 含量下降而起到抗氧化作用^[7]。电离辐射可导致成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 是组织发生纤维化的关键环节, 其中 α -SMA 是标志性蛋白。结合放射性纤维化理论, 有学者^[8-9] 提出 ORNJ 的发病机制可能是由于放射导致的组织纤维化。本研究以人皮肤成纤维细胞 (human skin fibroblasts, HSF) 为实验对象, 探讨 $\alpha 2M$ 对 X 线照射后 HSF 细胞的抗氧化及抗纤维化的作用, 以期对 ORNJ 的放射保护研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

成人皮肤成纤维细胞 (HSF) 购自广州速聚生物有限公司, $\alpha 2$ -巨球蛋白 ($\alpha 2M$) 购自美国 ENZO 公司, 高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM)、胎牛血清 (FBS)、2.5 g/L 胰蛋白酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司, SOD、超氧阴离子自由基 ($\cdot O_2^-$) 测定试剂盒购自南京建成, 兔抗人 α -SMA 多克隆抗

体、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Proteintech 公司, 山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗购自联科生物; 生物安全柜、二氧化碳培养箱、酶标仪购自美国 Thermo 公司, 倒置显微镜购自日本 Nikon 公司, 电泳槽、转印槽、超高灵敏度化学发光成像系统购自美国 BIO-RAD 公司, X 射线辐照仪购自美国 Rad Source 公司。

1.2 HSF 细胞的培养

完全培养基配方为含 100 mL/L FBS, 100 U/mL 青霉素, 100 U/mL 链霉素的高糖 DMEM, 于 37 °C、体积分数为 5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞融合度达到 70%~80% 时进行传代。

1.3 $\alpha 2M$ 溶液的配制

预冷 0.01 mol/L PBS 溶解 $\alpha 2M$, 配成 1.0 mg/mL 的 $\alpha 2M$ 溶液。

1.4 细胞照射

采用中山大学医学实验中心 RAD SOURCE RS2000 型 X-ray 生物学辐照器, 对处于对数生长期的细胞进行照射, 工作电压为 160 kV, 剂量率为 1.31 Gy/min (加反射体), 照射剂量分别为 0、5、10、15、20 Gy 剂量, 所有样品辐照都在室温下进行, 处理完成后细胞重新放置培养箱。

1.5 $\cdot O_2^-$ 含量检测

取对数生长期的 HSF 细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后制备 HSF 细胞培养液上清备用。按超氧阴离子自由基测定试剂盒说明书进行操作, 使用分光光度计于 550nm 波长处测定吸光度值。根据公式计算各组样品产生的超氧阴离子含量 (U/g)。

1.6 SOD 活性检测

取对数生长期的 HSF 细胞, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后吹打制成 1×10^6 /mL 的细胞悬液, 置于 -80 °C

冰箱中,4 h后取出融化,再次吹打制成细胞悬液。重复3次后,吸取裂解液,2 000 r/min,离心10 min(离心机半径为15 cm),上清液用0.45 μm 滤膜过滤后备用。按SOD测定试剂盒说明书进行操作,使用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度值。另取10 μL 裂解液采用BCA法测定各组样品的蛋白浓度,计算每毫克蛋白所具有的SOD活性。

1.7 Western blot检测蛋白表达

取照射后24 h的HSF细胞,吸除细胞培养液,PBS清洗3次,RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,配平。将样品加入制备好的SDS-PAGE凝胶中,恒压120 V电泳约1.5 h。电泳完成后,恒流280 mA将蛋白转移至PVDF膜上,约90 min。5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,兔抗人 α -SMA、鼠抗人GAPDH一抗孵育过夜。TBST洗膜3次,山羊抗兔、山羊抗鼠二抗孵育1 h。TBST洗膜3次后,化学发光法进行显影。使用Image J软件对条带灰度进行分析,根据目的蛋白净灰度值/GAPDH净灰度值计算出目的蛋白表达量。

1.8 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验独立重复3次。多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用Bonferroni校正的 t 检验,以 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 X射线对HSF细胞 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量、SOD活力和 α -SMA蛋白表达的影响

根据单因素方差分析,HSF细胞经5、10、15、20 Gy 4个不同剂量X射线照射后24 h,与0 Gy对照组相比, $\cdot\text{O}_2^-$ 释放量增多,差异具有统计学意义($F=2222.407, P < 0.01$),Bonferroni法两两比较显示不同剂量组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中5 Gy组与10 Gy组的组间差异较其他组别更为明显(图1);细胞SOD活力受到抑制,差异具有统计学意义($F=327.517, P < 0.01$),Bonferroni法两两比较显示不同剂量组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中5 Gy组与10 Gy组的组间差异较其他组别更为明显(图2); α -SMA蛋白表达量增多,差异具有统计学意义($F=930.999, P < 0.01$),Bonferroni法两两比较显示不同剂量组间差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中10 Gy组与15 Gy组的组间差

异较其他组别更为明显(图3)。综上实验,我们选择10 Gy作为X射线的最大效应剂量值。

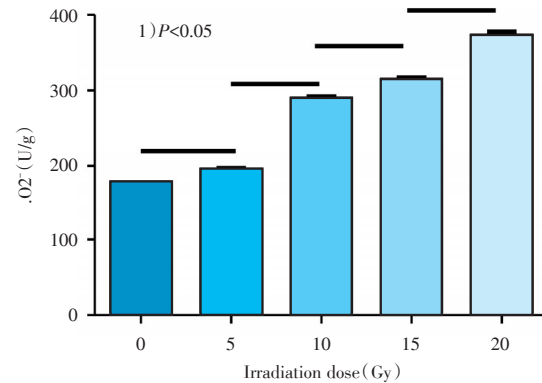


图1 不同剂量X射线对HSF细胞 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量的影响

Fig.1 Effect of different doses of X-ray on $\cdot\text{O}_2^-$ content in HSF cells

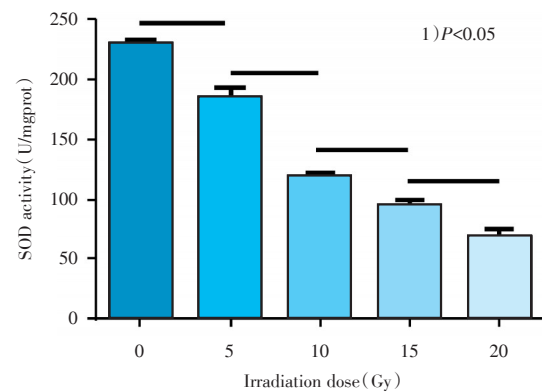


图2 不同剂量X射线对HSF细胞SOD活力的影响

Fig.2 Effect of different doses of X-ray on SOD activity in HSF cells

2.2 照射前加入不同浓度 α 2M对HSF细胞 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量、SOD活力和 α -SMA蛋白表达的影响

根据单因素方差分析,与对照组(control组)相比,HSF细胞在10 Gy X射线照射前1 h加入不同浓度的 α 2M(0.25 mg/mL组、0.5 mg/mL组), $\cdot\text{O}_2^-$ 含量变化差异不具有统计学意义($F=3.815, P > 0.05$),Bonferroni法两两比较显示组间差异不具有统计学意义($P > 0.05$;图4);SOD活力变化差异不具有统计学意义($F=7.141, P > 0.05$),Bonferroni法两两比较显示组间差异不具有统计学意义($P > 0.05$;图5); α -SMA蛋白表达量变化差异不具有统计学意义($F=1.500, P > 0.05$),Bonferroni法两两比较显示组间差异不具有统计学意义($P > 0.05$;图6)。

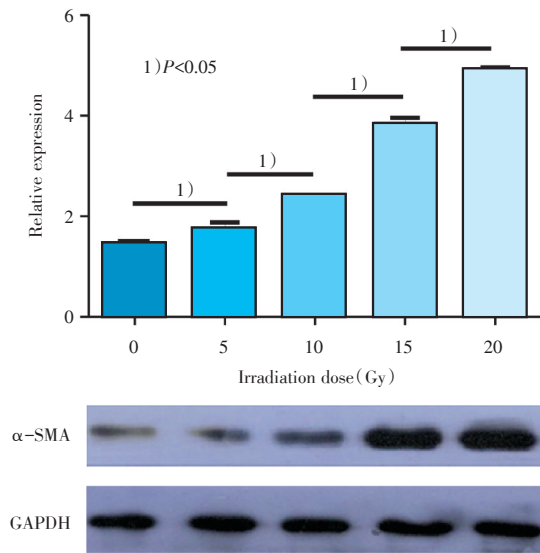


图3 不同剂量X射线对HSF细胞 α -SMA蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of different doses of X-ray on α -SMA protein expression in HSF cells

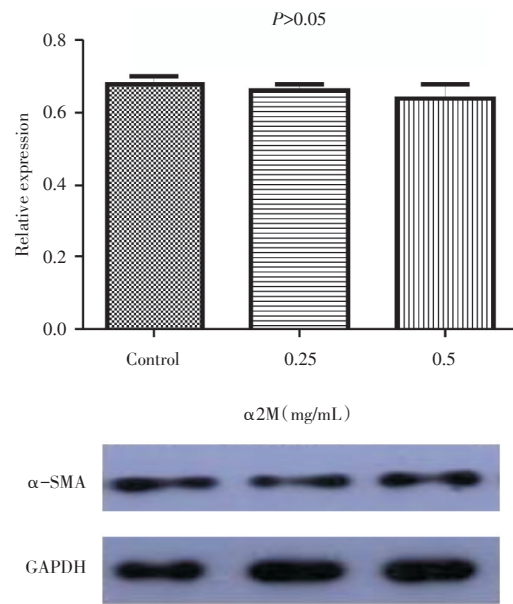


图6 不同浓度 $\alpha 2$ M对放射前HSF细胞 α -SMA蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of $\alpha 2$ M on α -SMA protein expression in HSF cells before irradiation

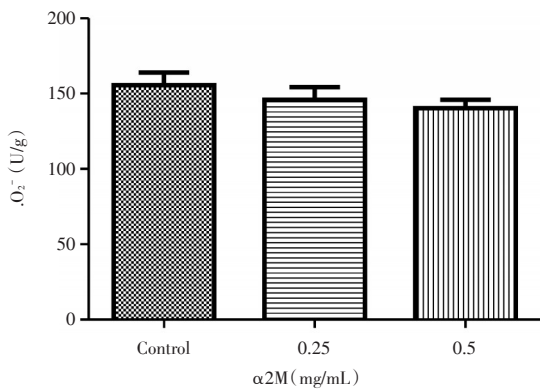


图4 不同浓度 $\alpha 2$ M对放射前HSF细胞 $\cdot O_2^-$ 含量的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of $\alpha 2$ M on $\cdot O_2^-$ content in HSF cells before irradiation

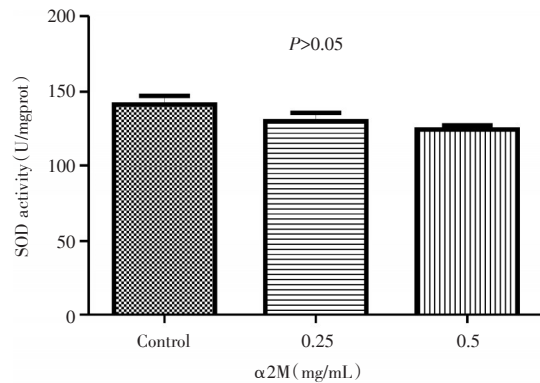


图5 不同浓度 $\alpha 2$ M对放射前HSF细胞SOD活性的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of $\alpha 2$ M on SOD activity in HSF cells before irradiation

2.3 照射后加入不同浓度 $\alpha 2$ M对HSF细胞 $\cdot O_2^-$ 含量、SOD活力和 α -SMA蛋白表达的影响

根据单因素方差分析,与对照组(control组)相比,HSF细胞在10 Gy X射线照射后1 h加入不同浓度的 $\alpha 2$ M(0.25 mg/mL组、0.5 mg/mL组), $\cdot O_2^-$ 含量降低,差异具有统计学意义($F=306.930, P<0.01$), Bonferroni法两两比较显示组间差异具有统计学意义($P<0.05$;图7);SOD活力升高,差异具有统计学意义($F=212.055, P<0.001$), Bonferroni法两两比较显示组间差异具有统计学意义($P<0.05$;图8); α -SMA的蛋白表达量下调,差异具有统计学意义($F=212.055, P<0.01$), Bonferroni法两两比较显示组间差异具有统计学意义($P<0.05$;图9)。

3 讨论

ORNJ是头颈部放疗所致颌骨等组织的严重放射损伤,一旦发生,预后往往很差。目前,如何在保证放疗疗效的同时,减少对颌骨等正常组织的损伤即放射保护越来越受到重视。开发高效、低毒的放射防护剂以减少和防止ORNJ等放射病的发生是放射保护研究的热点和重点。目前虽有一些药物能发挥抗辐射作用,但都因毒副作用大,

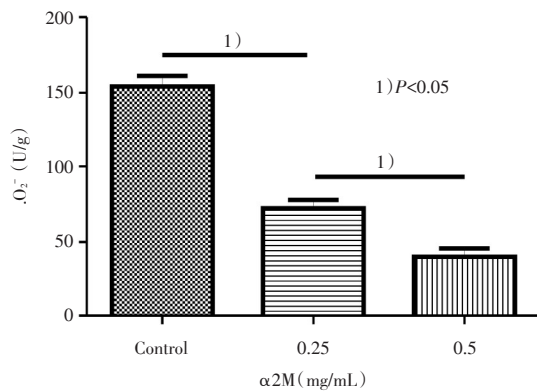


图7 不同浓度 $\alpha 2\text{M}$ 对放射后HSF细胞 O_2^- 含量的影响
Fig.7 Effect of different concentrations of $\alpha 2\text{M}$ on O_2^- content in HSF cells after irradiation

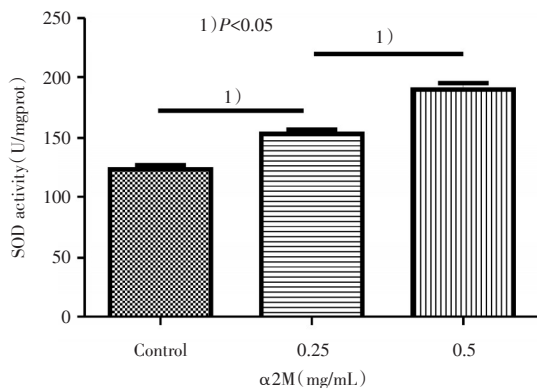


图8 不同浓度 $\alpha 2\text{M}$ 对放射后HSF细胞SOD活力的影响
Fig.8 Effect of different concentrations of $\alpha 2\text{M}$ on SOD activity in HSF cells after irradiation

难以推广应用。

电离辐射对组织细胞的损伤机理,除直接损伤大分子外,另一方面很大程度上是由于辐射作用水分子后形成超氧阴离子(O_2^-)等活性氧簇(ROS)^[10]。ROS具有很强氧化能力,可通过氧化作用使体内大分子物质如DNA产生过氧化变性等,从而引起细胞结构和功能的破坏,最终导致组织损害和变异。ROS水平的高低是评价机体氧化应激程度的经典指标。SOD是重要的清除体内自由基的抗氧化酶,抗氧化剂清除ROS的重要机制就是提高SOD等的活性^[11-12]。

本研究采用X射线辐照仪进行照射,较以往钴源等辐照仪同位素更安全,用于细胞放射损伤模型的建立,具有剂量均匀且精确可控、环境剂量低、重复性佳。在本研究中,HSF细胞经X线照射后,其 O_2^- 释放量显著增多,与照射剂量呈正相关;而SOD活性降低($P<0.05$),与照射剂量呈负相关,

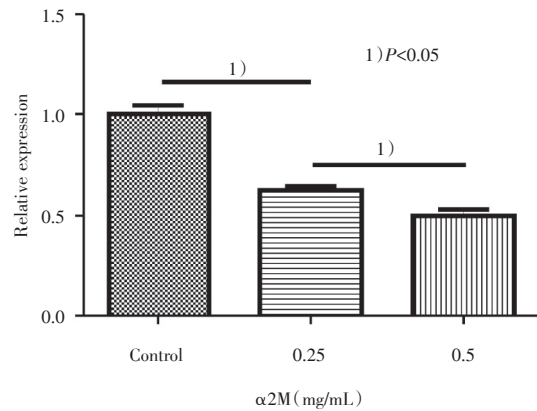


图9 不同浓度 $\alpha 2\text{M}$ 对放射后HSF细胞 α -SMA蛋白表达的影响
Fig.9 Effect of different concentrations of $\alpha 2\text{M}$ on α -SMA protein expression in HSF cells after irradiation

结果证实HSF细胞经X照射同样受到氧化损伤。

纤维性变学说是目前较受认可的电离辐射损伤的主要机制,认为放射性纤维化是放射性组织损伤共有的阶段。而电离辐射诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,是组织发生纤维化的关键环节。肌成纤维细胞具有产生胶原纤维的功能,分泌的 α -SMA是其标志蛋白^[13-14]。在本研究中也证实,经X射线照射后的HSF细胞的 α -SMA蛋白表达量增加($P<0.05$),并与照射剂量呈正相关。

在前期研究中,我们发现ORNJ患者血清中有12种差异表达蛋白,其中 $\alpha 2\text{M}$ 等3个蛋白低表达,而 $\alpha 2\text{M}$ 经扩大临床样本量验证为ORNJ患者血清中差异性低表达蛋白^[4-5],这提示血清 $\alpha 2\text{M}$ 与颌骨电离辐射损伤有着密切关系,但机制待阐明。

$\alpha 2\text{M}$ 是血浆中一类重要的大分子糖蛋白,是体内广谱的蛋白酶抑制剂。近年随着研究的不断深入,发现 $\alpha 2\text{M}$ 具有广泛、多样的生物学功能。现已有研究表明, $\alpha 2\text{M}$ 对肝脏组织等有放射保护作用^[15]。在对大鼠全身X线照射前给予 $\alpha 2\text{M}$,结果发现 $\alpha 2\text{M}$ 通过提高Mn/CuSOD等活性清除自由基,降低DNA损伤水平,从而对肝组织产生放射保护效应,提示 $\alpha 2\text{M}$ 对机体电离辐射损伤有重要保护作用。本研究中,培养的HSF细胞经X线照

射后给予 α 2M,发现不同浓度的 α 2M均能有效降低 O_2^- 含量,升高SOD活性($P<0.05$),且作用与给予的剂量呈依赖关系,结果也证实 α 2M对HSF细胞的放射损伤可起到抗氧化作用。

肌成纤维细胞为异常激活的成纤维细胞,生物学特性介于平滑肌细胞及成纤维细胞之间,可以分泌 α -SMA是关键特征^[16]。因此,如果能抑制细胞外基质的堆积,阻断成纤维性变向肌成纤维细胞转化,则可望延缓或终止组织纤维性变的发生,发挥电离辐射保护作用。本研究中,不同浓度 α 2M均能降低成纤维细胞 α -SMA的蛋白表达水平($P<$

0.05),说明 α 2M可抑制电离辐射后成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化,从而发挥抗纤维化的作用。

结果表明, α 2M可对放射后HSF细胞起到抗氧化和抗纤维化作用,即通过清除氧自由基,以阻止或减缓纤维性变进程的发展,从而起到放射保护作用。但是在照射前给予 α 2M,它的抑制作用不明显,推测可能与 α 2M在受照时它的分子结构遭到破坏而失活有关。在本研究的基础上,我们将进一步探讨 α 2M对颌骨等骨组织的放疗保护,以及机体受电离辐射产生ROS后,如何启动 α 2M抗氧化作用达到放射保护的分子机制。

参考文献:

- [1] Raguse JD, Hossamo J, Tinhofer I, et al. Patient and treatment-related risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck cancer [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2016, 121(3): 215-221.
- [2] Shaw R, Tesfaye B, Bickerstaff M, et al. Refining the definition of mandibular osteoradionecrosis in clinical trials: The cancer research UK HOPON trial (Hyperbaric Oxygen for the Prevention of Osteoradionecrosis) [J]. *Oral Oncol*, 2017, 64: 73-77.
- [3] Lyons AJ, Brennan PA. Pentoxifylline—a review of its use in osteoradionecrosis [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2017, 55(3): 230-234.
- [4] Fang SL, Chen W, Wang SY, et al. Proteomic analysis of serum in patients with osteoradionecrosis of the jaws [J]. *Inter Dent J*, 2012, 62(S1): 24.
- [5] Fang SL, Kong XB, Chen W, et al. Identification of differential proteins that related to bone metabolism in the serum of ORNJ patients [J]. *Inter Dent J*, 2012, 62(S1): 25.
- [6] Rehman AA, Zaman M, Zia MK, et al. Conformational behavior of alpha-2-macroglobulin: Aggregation and inhibition induced by TFE [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104(Pt A): 539-546.
- [7] Siddiqui T, Zia MK, Ali SS, et al. Reactive oxygen species and anti-proteinases [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2016, 122(1): 1-7.
- [8] Zhuang Q, Zhang Z, Fu H, et al. Does radiation-induced fibrosis have an important role in pathophysiology of the osteoradionecrosis of jaw? [J]. *Med Hypotheses*, 2011, 77(1): 63-65.
- [9] Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibrotrophic process: Therapeutic perspective via the antioxidant pathway [J]. *Radiother Oncol*, 2004, 73(2): 119-131.
- [10] Sakuma S, Abe M, Kohda T, et al. Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2 [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2015, 56(1): 15-19.
- [11] Weekley CM, Kenkel I, Lippert R, et al. Cellular fates of manganese(II) pentaazamacrocyclic superoxide dismutase (SOD) mimetics: Fluorescently labeled MnSOD mimetics, X-ray absorption spectroscopy, and X-ray fluorescence microscopy studies [J]. *Inorg Chem*, 2017, 56(11): 6076-6093.
- [12] M Fetherolf M, Boyd SD, Winkler DD, et al. Oxygen-dependent activation of Cu, Zn-superoxide dismutase-1 [J]. *Metallomics*, 2017, 9(8): 1047-1059.
- [13] Sun KH, Chang Y, Reed NI, et al. α -Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGF β activation or collagen production across multiple models of organ fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(9): L824-836.
- [14] Inoue A, Obayashi K, Sonoda Y, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-1 and alpha-smooth muscle actin expression by interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor alpha in hepatic stellate cells [J]. *Cytotechnology*, 2017, 69(3): 461-468.
- [15] Bogojevic D, Poznanovic G, Grdovic N, et al. Administration of rat acute-phase protein α 2-macroglobulin before total-body irradiation initiates cytoprotective mechanisms in the liver [J]. *Radiat Environ Biophys*, 2011, 50(1): 167-179.
- [16] Edanami N, Yoshida N, Ohkura N, et al. Characterization of dental pulp myofibroblasts in rat molars after pulpotomy [J]. *J Endod*, 2017, 43(7): 1116-1121.

(编辑 徐杰)