

骨膜蛋白基因敲除鼠正畸牙齿移动模型的建立及验证

郭薇¹, 房付春², 徐会勇², 欧阳钧³

1. 南方医科大学口腔医院病理科, 广东 广州 510510; 2. 南方医科大学南方医院口腔科, 广东 广州 510515; 3. 南方医科大学基础医学院解剖教研室, 广东 广州 510515

【摘要】目的:建立小鼠以及骨膜蛋白(PN)基因敲除小鼠正畸牙齿移动模型,并分析相关信号通路。**方法:**根据实验条件把小鼠分为4组:C57小鼠未加力组和加力组、PN基因敲除小鼠组上颌加力组和未加力组,每组5只,其中加力组加力5 d。处死后,显微CT扫描上下颌骨,并采用RT-PCR检测牙周膜中相关基因的表达水平。**结果:**与C57小鼠相比,PN基因敲除小鼠的牙槽骨出现明显的吸收,牙周膜连续性中断破坏。在C57小鼠中,加力组牙周膜中的PN、粘着斑激酶(FAK)和TGF- β 1表达水平显著增强($P<0.05$);在基因敲除鼠中,加力组牙周膜中的FAK($P<0.05$)和TGF- β 1表达水平显著增强($P<0.01$);在同样加力的条件下,C57小鼠与PN基因敲除小鼠相比,TGF- β 1显著降低($P<0.05$),FAK表达水平显著升高($P<0.01$)。**结论:**PN是正畸作用下牙周膜的改建过程一个重要分子环节,发挥着转导调控作用,TGF- β 1--PN--FAK信号通路参与调控正畸作用下牙周膜的改建过程。

【关键词】骨膜蛋白;小鼠模型;基因敲除;正畸移动

【中图分类号】R318.01

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2019)10-1233-06

Construction and validation of orthodontic tooth movement model in periostin knockout mice

GUO Wei¹, FANG Fuchun², XU Huiyong², OUYANG Jun³

1. Department of Pathology, Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish the orthodontic tooth movement model in periostin (PN) knockout mice and analyze the related signaling pathways. **Methods** According to experimental conditions, the enrolled mice were divided into 4 groups, namely C57 mice groups with and without receiving orthodontic force, PN knockout groups with and without receiving orthodontic force, with 5 mice in each group, and the orthodontic force was last for 5 days. After the mice were killed, the upper and lower jaws were scanned with Micro-CT; and the expression levels of related genes in periodontal ligament were detected with RT-PCR. **Results** Compared with C57 mice, PN knockout mice had obvious alveolar bone resorption and continuous destruction of periodontal ligament. The comparison between two groups of C57 mice showed that the expression levels of PN, focal adhesion kinase (FAK) and TGF- β 1 in the periodontal ligament of mice receiving orthodontic force were significantly increased ($P<0.05$). The comparison between two groups of PN knockout mice showed that the expression levels of FAK and TGF- β 1 in the periodontal ligament of mice receiving orthodontic force were remarkably increased ($P<0.01$). Under the same force condition, the expression level of TGF- β 1 in C57 mice was significantly lower than that in PN knockout mice ($P<0.05$), while the expression level of FAK in C57 mice was obviously increased ($P<0.01$). **Conclusion** PN which is an important molecular link in the process of periodontal ligament remodeling under orthodontic action plays an important role in transduction and regulation. TGF- β 1--PN--FAK signaling pathway is involved in the process of periodontal ligament remodeling under orthodontic action.

Keywords: periostin; mice model; gene knockout; orthodontic movement

【收稿日期】2019-09-25

【作者简介】广东省自然科学基金(2015A030310140)

【作者简介】郭薇, 硕士, 主治医师, 研究方向: 口腔肿瘤病理学, E-mail: 575716574@qq.com

【通信作者】欧阳钧, 博士, 教授, 研究方向: 骨与关节生物力学、肌肉与骨创伤修复学, E-mail: jouyang@126.com

前言

牙齿在正畸治疗过程中,牙周膜受到机械力刺激发生改建,众多细胞因子、炎症介质和生长因子参与这一过程^[1-3]。我们前期研究证实在机械力刺激下牙周膜中的骨膜蛋白(Periostin, PN)表达水平显著升高,且其

表达与 TGF- β 1 相关^[4]。有研究表明,PN 作为 TGF- β 1 的下游因子,具有趋化心肌细胞,促进胶原合成和成熟,形成稳定的胶原网络和参与胶原重塑的功能^[5-6]。PN 主要通过刺激 TGF- β 1 信号系统参与反馈机制,由 α v-整合素阳性成纤维细胞表达。生成的蛋白能进一步增加成纤维细胞的流动性、收缩性和合成基质蛋白的能力。PN 成为这个反馈机制中的扳机点^[7-8]。TGF- β 1 信号相关通路是否也在正畸牙齿移动过程中介导 PN 对牙周膜的改建作用?基于以上问题,本研究拟通过小鼠正畸牙齿移动模型和基因敲除小鼠正畸牙齿移动模型研究 TGF- β 1--PN 牙周膜相关信号通路分子,进一步揭示 PN 对牙周膜在机械力作用下改建的分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型建立

实验所需的 PN 基因敲除小鼠是中国科学院广州分院生物医药与健康研究院李鹏研究员惠赠,为 C57 转基因基因敲除鼠。所有动物的饲养及繁殖条件为室温 18~25 ℃,湿度 40%~60%。每天应给予足够的鼠粮,饮用水经 121 ℃、30 min 高压灭菌,每周至少更换垫料 2 次,保证其干净。

1.2 实验分组

根据前期结果^[4],本实验选择 5 d 加力效应最大时间点。实验分为 C57 小鼠未加力组 5 只、C57 小鼠加力 5 d 组 5 只,加力方法同实验一^[9];基因敲除小鼠组上颌加力牙组 5 只、未加力牙 5 d 组 5 只,饲养条件同实验一。将实验小鼠按实验要求处死后拔出牙齿放于盛有裂解液的 EP 管中,并搔刮牙槽窝去组织于 EP 管中。

1.3 显微 CT (Micro-Computed Tomography, Micro-CT) 影像学检查

处死未加力 12 周龄的 C57 和 PN 基因敲除小鼠,分离上下颌骨,分别选取各组小鼠上、下颌骨。每组标本都贴上标签并固定在特殊的扫描管中,以防止滑动影响扫描效果。断层扫描成像采用 Micro-CT (uCT80) 成像系统。选择小视场成像扫描,校正断层扫描值,电源功率设置为 30 W,电流为 429 μ A,扫描电压为 70 kV,扫描层厚为 20 μ m,每次扫描一个下颌骨大约需要 20 min。扫描后,文件存储在计算机中,供后续观察与分析^[10]。

1.4 PN 基因敲除小鼠基因型的鉴定

PN 基因敲除小鼠基因型鉴定的 PCR 引物为:

mPN1: 5'-CCTTGCCAGTCTCAAYGAAGG-3'

mPN2: 5'-TGACAGAGTGAACACATGCC-3'

mPN3: 5'-GGAAGACAATAGCAGGCATGCTG-3'

按照 mPN1:mPN2:mPN3=2:1:1 的比例混合后

加入 ddH₂O 稀释成 10 倍工作液后使用。以上引物由 Invitrogen 公司合成。

1.5 RT-PCR 检测小鼠牙移动牙周膜改建中与 PN 相关信号通路调控因子

1.5.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 提供的相关序列,应用 Primer premier 5 软件进行设计,经 BLAST 软件同源性分析选择特异性引物,由 Invitrogen 公司合成。引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 引物序列
Tab.1 RT-PCR primer sequence

基因名称	上下游引物	引物序列
M-GAPDH	上游	5'-TGGATTGTGGACGCATTGGTC-3'
	下游	5'-TTTGCACTGGTACGTGTTGAT-3'
M-PN	上游	5'-CACGGCATGGTTATTCCTTCA-3'
	下游	5'-TCAGGACACGGTCAATGACA-3'
M-FAK	上游	5'-TTAGGCGATCCTATTGGGAGATG-3'
	下游	5'-TTCTTAGTGTTTGGCCTTGACA-3'
M-TGF- β 1	上游	5'-ATGTCACGGTTAGGGGCTC-3'
	下游	5'-GGCTTGCATACTGTGCTGTATAG-3'

1.5.2 从组织样本中提取总 RNA 用于提取总 RNA 的容器都已经进行去 Rnase 处理。加样枪及玻璃器皿已用 RNase ZapTM (Rnase Decontamination solution) 试剂处理;用含 1/1 000 DEPC 无菌水浸泡塑料制品 24 h,经两次 120 ℃、30 min 条件进行高压灭菌,60 ℃烤干;1/1 000 比例的去离子水加入 DEPC 处理 24 h 后,高压消毒^[11]。

1.5.3 逆转录 取 100 ng~2 μ g 总 RNA,加入 2 μ L gDNA Remover,用移液器轻柔吹打 5~10 次混匀,室温 (19~27 ℃) 反应 5 min,置于冰上待用;向 gDNA Remover 处理过的总 RNA 中加入 5 μ L 的 4x RT Master Mix,然后加 ddH₂O 补足至 20 μ L;加好试剂后,用移液器轻柔吹打 10 次充分混匀。逆转录反应条件:42 ℃、15 min。

1.5.4 RT-PCR RT-PCR 反应体系如表 2 所示。利用上述逆转录的 cDNA,采用特异的引物扩增,进行实时 RT-PCR,检测基因敲除小鼠牙周膜组织中 PN、FAK、TGF- β 1 等基因的 mRNA 表达水平;反应条件:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 34 s,35 个循环,反应结束后得 Ct 值。

1.5.5 数据分析 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行 RT-PCR 结果分型,得到相关基因表达差异值。对每个样本的 Ct 值算得平均值后 (3 复孔求平均值),通过减去各自内参的平均 Ct

表2 RT-PCR反应体系
Tab.2 RT-PCR reaction system

试剂	使用量/ μL
SYBR®Premix Ex TaqII (TliRNaseH Plus) (2 \times)	10.0
目的基因 Forward Primer	0.4
目的基因 Reverse Primer	0.4
DNA Template	2.0
ddH ₂ O(sterile distilled water)	7.2
总计	20.0

值得到 ΔCt 值。减去需要比较的两个样本之间的 ΔCt 值得到 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值。计算 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,得到相关基因表达差异倍数。统计学分析使用SPSS 13.0软件,采用单样本 t 检验进行分析比较,取 $\alpha=0.05$ 为检验标准。

2 结果

2.1 基因敲除小鼠的鉴定

小鼠基因组DNA经PCR电泳后的结果如图1所示,C57小鼠的DNA样本放置于1泳道,用于鉴定的基因小鼠的DNA样本放置于2泳道。从图中可以看出1泳道只有一个亮度很强的目的条带,其范围在691bp处,可根据标准判定为WT小鼠;2泳道也只有一个亮度较强的目的条带,范围在500bp左右,根据标准判定为PN-/-小鼠(基因敲除小鼠)。试验中所用基因敲除小鼠必须经过基因鉴定后才能使用。

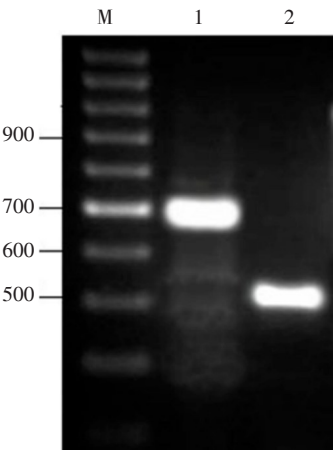


图1 小鼠基因组PCR鉴定结果
Fig.1 Mice genomic PCR identification results

2.2 Micro-CT影像学检查结果

小鼠Micro-CT三维重建图显示:与对照组C57小鼠相比,PN-null小鼠(基因敲除小鼠)牙周组织破坏,牙槽骨出现明显的水平吸收,磨牙根分叉区完全

暴露(图2a和图2b)。小鼠Micro-CT曲面断层图显示:与对照组C57小鼠相比,PN-null小鼠牙周组织破坏,牙槽骨出现明显的吸收,牙槽脊顶消失,牙周膜连续性中断破坏(图2c和图2d)。

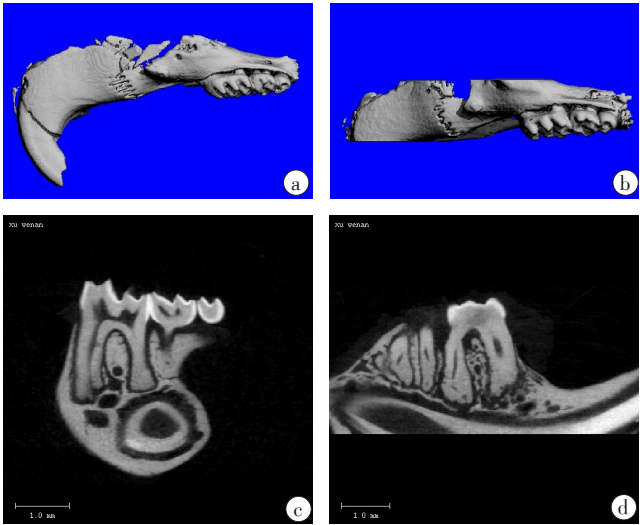


图2 Micro-CT影像学检查结果
Fig.2 Examination results of Micro-CT
a:C57小鼠Micro-CT三维重建图;b:PN-null Micro-CT小鼠三维重建图;
c:C57小鼠Micro-CT曲面断层图;d:PN-null Micro-CT曲面断层图

2.3 小鼠牙移动牙周膜改建中与PN相关的信号通路调控因子

根据图3所示,与C57未加力对照组相比,C57小鼠牙加力实验组牙周膜中PN mRNA表达增强,差值有统计学意义($P=0.024$);粘着斑激酶(Focal Adhesion Kinase, FAK) mRNA表达增强,差值有统计学意义($P=0.027$);TGF- β 1 mRNA表达增强,差值有统计学意义($P=0.025$)。

与PN-null未加力对照组相比,PN-null加力实验组牙周膜中FAK mRNA表达增强,差值有统计学意义($P=0.016$);TGF- β 1 mRNA表达显著增强,差值有统计学意义($P=0.001$)。与PN-null未加力对照组相比,C57未加力组牙周膜中TGF- β 1 mRNA表达显著减少,差值有统计学意义($P=0.004$),FAK mRNA表达显著增强,差值有统计学意义($P=0.005$)。与PN-null加力组相比,C57加力实验组牙周膜中TGF- β 1 mRNA表达显著减少,差值有统计学意义($P=0.01$);FAK mRNA表达显著增强,差值有统计学意义($P=0.002$)。

3 讨论

建立生物研究模型在生物医学等各方面的研究中都非常重要。基因敲除技术通常用于某种特定基因缺

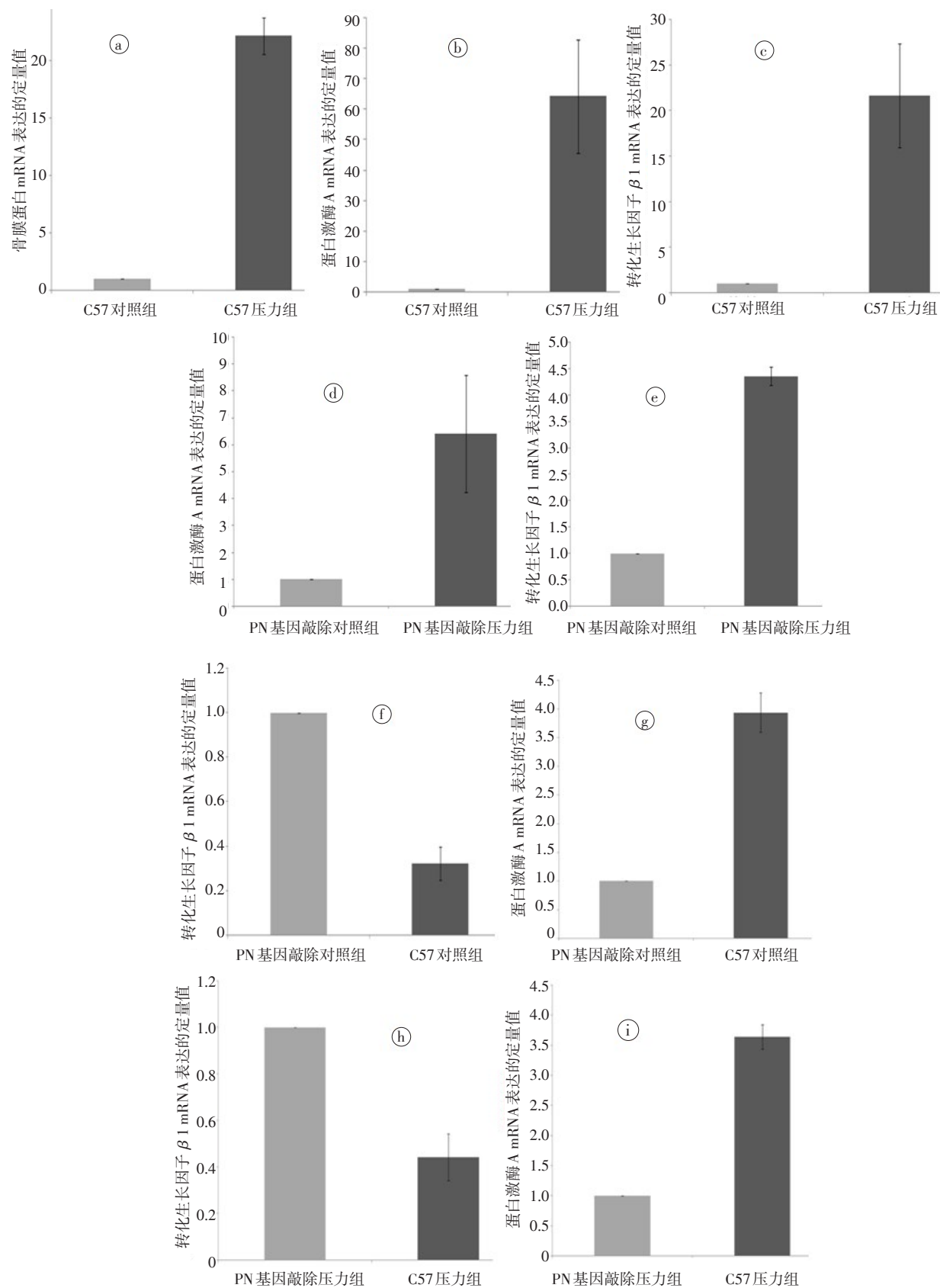


图3 RT-PCR检测C57和PN-null小鼠加力和不加力牙周膜TGF-β1、FAK和PN mRNA水平的表达

Fig.3 The mRNA levels of TGF-β1, FAK and PN in the periodontal ligament of C57 and PN-null mice with or without receiving orthodontic force detected by RT-PCR

a: C57小鼠牙加力和未加力牙周膜中PN mRNA表达水平; b: C57小鼠牙加力和未加力牙周膜中FAK mRNA表达水平; c: C57小鼠牙加力和未加力牙周膜中TGF-β1 mRNA表达水平; d: PN-null小鼠牙加力和未加力牙周膜中FAK mRNA表达水平; e: PN-null小鼠牙加力和未加力牙周膜中TGF-β1 mRNA表达水平; f: C57和PN-null小鼠未加力牙周膜中TGF-β1 mRNA表达水平; g: C57和PN-null小鼠未加力牙周膜中FAK mRNA表达水平; h: C57和PN-null小鼠加力牙周膜中TGF-β1 mRNA表达水平; i: C57和PN-null小鼠加力牙周膜中FAK mRNA表达水平

失的研究模型^[12],借助细胞生物学、分子生物学和动物胚胎学的技术,通过胚胎干细胞将生物正常的功能基因的编码区破坏,使特定基因失活,从而研究该基因的功能^[13];还可以通过外源基因来替换研究宿主基因组,以便测定其是否具有类似的功能,从而进行相关的研究^[14]。人类很多疾病都由基因决定,因此构建相应的基因敲除动物模型是研究人类疾病的理想方法^[15]。本实验为了清楚了解PN在小鼠牙移动牙周膜改建中的作用以及相关信号通路,通过检测PN基因敲除后相关通路调控因子表达的变化,从而研究PN在小鼠牙移动牙周膜改建中的角色,这需要对建模用的PN-null小鼠进行鉴定。PN+/+基因型小鼠基因组DNA经PCR扩增产物大小为691bp,PN-/-基因型小鼠基因组DNA经PCR扩增产物大小为500bp,本实验中1泳道放置C57小鼠的DNA样本,2泳道放置作鉴定的基因小鼠DNA样本,可以看出1泳道只有一个亮度很强的目的条带,其范围在691bp处,可根据标准判定为WT小鼠;2泳道也只有一个亮度较强目的条带,范围在500bp左右,根据判定标准判定为PN-/-小鼠,可用作后期的进一步研究。

Micro-CT是利用X线成像原理的新型高分辨率三维成像设备,它可以通过牙齿和骨骼等硬组织的高分辨率X线成像获得高精度的三维图像,且不会损坏样本,可对结构、密度和体积进行定量分析^[16-17]。与普通CT相比,Micro-CT可以利用锥形X光束获得真正的各向同性体积图像,从而提高空间分辨率和射线利用率,该技术可以在样品完好的情况下对骨骼、牙齿和生物材料进行高分辨率(<10 μm)X线成像,并获得详细的内部结构信息,从而进行各部分的三维重建图像。Micro-CT拥有的图像处理软件可以从任意角度观察研究对象的三维图像和断层图像,定量计算样本内选定区域的孔隙率、连接密度、面积、结构模型及体积指数等指标^[18]。Micro-CT广泛应用于骨形态和骨量的各种研究,包括骨生长发育分析、肾性骨病和骨质疏松症等病理状态的动物模型分析、三维血管重建下的骨折愈合分析及关节软骨形态学分析等^[19]。

本实验采用Micro-CT对C57小鼠和PN-null小鼠进行上下颌骨扫描三维重建发现,与对照组C57小鼠相比,PN-null小鼠牙周组织破坏,牙槽骨出现明显的水平吸收,磨牙根分叉区完全暴露。小鼠Micro-CT曲面断层图显示:与对照组C57小鼠相比,PN-null小鼠牙周组织破坏,牙槽骨出现明显的吸收,牙槽脊顶消失,牙周膜连续性中断破坏。仅仅把PN基因敲除,没有其他任何干预的情况下,基因敲除小鼠在正常咀嚼力作用下牙周组织出现严重破坏,充分说明PN在维持牙周膜等牙周组织完整性方面不可或缺,它在牙周膜、牙周组织的改建更新中扮演着非常关

键的角色,可能会调控其他信号分子影响牙周组织的代谢,这与Rios等^[20]研究结果基本一致。

根据前期的研究,我们知道牙周组织的改建是牙周膜对不同机械力产生反应的结果。牙周膜是怎样将这种机械信号转化为生物信号的呢?牙周膜为复杂、多细胞和血管的软结缔组织,包含许多独立的细胞群。主要细胞类型是内皮细胞,包括马拉色上皮细胞、成骨细胞、感觉细胞、破骨细胞、成牙骨质细胞及成纤维细胞^[21-22]。研究发现许多细胞因子、炎性介质、生长因子等在这一过程中起着非常重要的作用。PN是一种新发现的多功能的细胞外基质蛋白,研究发现PN是牙周内环境稳定和承受机械应力后重塑所不可缺少的^[23]。PN作为细胞外基质蛋白,能影响细胞的迁移、细胞外基质合成、细胞粘附、细胞的增殖与凋亡等^[24]。研究表明PN可与I型胶原直接相互作用,透射电子显微镜和形态分析表明,PN基因敲除小鼠皮肤真皮层的胶原纤维直径减小,形成异常的I型胶原纤维。此外,差示扫描量热法显示PN基因敲除小鼠中胶原蛋白变性温度较低,反映交联胶原蛋白水平降低。这些结果表明PN可以调节I型胶原纤维形成,从而成为纤维结缔组织生物力学性质的重要介质^[25]。

目前,PN与TGF-β1的关系受到各界越来越多的关注。许多研究表明PN参与多种系统性疾病的发生和发展,其表达与TGF-β1密切相关^[26]。现已公认TGF-β1可诱导PN的高表达,说明PN可能作为TGF-β1的下游因子发挥作用,但TGF-β1诱导其表达的机制还不清楚。研究结果显示在PN基因敲除小鼠情况下TGF-β1表达反而升高,说明TGF-β1作为PN调控基因的上游参与机械力对牙周膜改建的过程,其在PN基因敲除小鼠因为PN基因缺失,作为上游的调控因子会按照原始意图代偿增加PN的量以弥补其表达不足,因此PN-null小鼠的TGF-β1表达升高,可能是通过下游信号因子PN负反馈引起,这与Sen等^[27]研究基本一致。

本研究发现与PN-null未加力对照组相比,C57未加力组牙周膜中FAK mRNA表达显著增强,与PN-null加力组相比,C57加力实验组牙周膜中FAK mRNA表达显著增强。说明FAK mRNA在PN基因敲除其在牙周膜的表达量减少,二者具有一致性,说明FAK是PN调控信号通路的下游分子,接受PN调控参与机械力对牙周膜改建的过程。但是FAK在PN基因敲除小鼠情况下牙周膜中仍然有表达,说明FAK可能除PN信号通路之外,还接受其它上游因子调控参与正畸力对牙周膜改建的过程,也就是说在牙周膜接受应力刺激进行改建过程中,FAK并不是单一的只有TGF-β1--PN--FAK信号通路,还接受其它信号通路参与牙周膜改建。这与Hakuno等^[28]研究基本一致,研究发现,PN敲除鼠梗

死区边缘AKT磷酸化形式的单体显著减少,梗死区边缘仅表达少量FAK磷酸化形式,提示心肌成纤维细胞PN蛋白趋化是通过FAK-AKT磷酸化途径实现的。以上研究提示我们有可能在正畸作用下牙周膜的改建过程,其中一个信号调控通路可能是TGF- β 1--PN--FAK信号通路通过AKT磷酸化来激活细胞外基质的改变。由于在QCR不能对P-AKT进行检测,而且小鼠牙周膜过少也难以进行P-AKT蛋白水平功能检测。人牙根粗大,牙周膜面积大,有足够的牙周膜组织进行蛋白功能水平检测,因此通过人牙周膜加力改建进行蛋白水平检测可以进一步在蛋白功能水平深入探讨PN在正畸牙齿移动过程中牙周膜改建作用机制。

综上所述,PN参与调控了正畸作用下牙周膜的改建过程,是保持牙周膜的结构和功能完整性所必需的,TGF- β 1--PN--FAK信号通路参与调控了正畸作用下牙周膜的改建过程,PN作为TGF- β 1调控通路的下游,其可能通过负反馈机制引起TGF- β 1在PN基因敲除小鼠表达升高,FAK可能通过除PN信号通路之外的其他途径参与正畸力对牙周膜改建的过程。

【参考文献】

- [1] ASIRY M A. Biological aspects of orthodontic tooth movement: a review of literature[J]. Saudi J Biol Sci, 2018, 25(6): 1027-1032.
- [2] BALOUL S S. Osteoclastogenesis and osteogenesis during tooth movement[J]. Front Oral Biol, 2016, 18: 75-79.
- [3] WISE G E, KING G J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement[J]. J Dent Res, 2008, 87(5): 414-434.
- [4] XU H Y, NIE E M, DENG G, et al. Periostin is essential for periodontal ligament remodeling during orthodontic treatment[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 1800-1806.
- [5] DU J, LI M. Functions of periostin in dental tissues and its role in periodontal tissue regeneration[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1132: 63-72.
- [6] 李佳成. Periostin蛋白对实验性大鼠心梗后心室室重构的影响及药物的干预作用[D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [7] LI J Y. Attenuation of cardiac fibrosis consequent on inhibition of periostin by using ramipril or a traditional Chinese medicine in a heart failure rat model[D]. Changchun: Jilin University, 2009.
- [7] MARRELLI M, CODISPOTI B, SHELTON R M, et al. Dental pulp stem cell mechanoresponsiveness: effects of mechanical stimuli on dental pulp stem cell behavior[J]. Front Physiol, 2018, 9: 1685.
- [8] 赖玲芝, 吴补领, 徐会勇, 等. 周期性张应力对人牙周膜细胞Periostin表达的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(2): 79-83.
- [8] LAI L Z, WU B L, XU H Y, et al. Expression of Periostin mRNA and protein in cultured human periodontal ligament cells after cyclic stretch[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2015, 25(2): 79-83.
- [9] 徐会勇. 骨膜蛋白在正畸牙周膜改建中的表达及调控机制[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.
- [9] XU H Y. The expression and mechanism of periostin during orthodontic periodontal ligament remodeling [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014.
- [10] 郑笑臣. 脾脏切除对正常及去势大鼠骨形成的影响[D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [10] ZHENG X C. Effect of splenectomy on osteogenesis in normal and ovariectomized rats[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2013.
- [11] 邓欢. STOML-2在宫颈癌中的表达及其功能研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- [11] DENG H. Explore the expression and function of Stomatin-like protein (STOML-2) in cervical cancer[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2012.
- [12] 石玉衡. 基因敲除模型小鼠在疾病研究中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(33): 6239-6242.
- [12] SHI Y H. Gene knockout mouse models for disease study[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2011, 15(33): 6239-6242.
- [13] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. Life Sci, 2019, 8: 116636.
- [14] ZAREI A, RAZBAN V, HOSSEINI S E, et al. Creating cell and animal models of human disease by genome editing using CRISPR/Cas9[J]. J Gene Med, 2019, 21(4): e3082.
- [15] YOSHIMI K, MASHIMO T. Application of genome editing technologies in rats for human disease models[J]. J Hum Genet, 2018, 63(2): 115-123.
- [16] BAIRD E, TAYLOR G. X-ray micro computed-tomography[J]. Curr Biol, 2017, 27(8): R289-R291.
- [17] 许悦, 陈振琦, 吴军, 等. SD大鼠人造牙槽突骨缺损自愈率的显微CT评价[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2011, 9(2): 126-129.
- [17] XU Y, CHEN Z Q, WU J, et al. Micro-CT evaluation of spontaneous cure rate of rat alveolar bone defect man-made[J]. China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2011, 9(2): 126-129.
- [18] DU PLESSIS A, BROECKHOVEN C, GUELPA A, et al. Laboratory X-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples[J]. Gigascience, 2017, 6(6): 1-11.
- [19] BOUXSEIN M L, BOYD S K, CHRISTIANSEN B A, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(7): 1468-1486.
- [20] RIOS H F, MA D, XIE Y, et al. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice[J]. J Periodontol, 2008, 79(8): 1480-1490.
- [21] DE JONG T, BAKKER A D, EVERTS V, et al. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: lessons for periodontal regeneration[J]. J Periodontol Res, 2017, 52(6): 965-974.
- [22] 蒋一. Periostin在高糖条件下牙周组织中的表达及胰岛素干预调控的研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2013.
- [22] JIANG Y. Effect of insulin on Periostin expression in high glucose in periodontal ligament tissue[D]. Beijing: Medical School of Chinese PLA, 2013.
- [23] DU J, LI M. Functions of Periostin in dental tissues and its role in periodontal tissues' regeneration[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(23): 4279-4286.
- [24] TAKAYAMA I, TANABE H, NISHIYAMA T, et al. Periostin is required for matricellular localization of CCN3 in periodontal ligament of mice[J]. J Cell Commun Signal, 2017, 11(1): 5-13.
- [25] 蒋一, 刘洪臣. 牙周膜中Periostin表达的研究进展[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2012, 13(6): 363-366.
- [25] JIANG Y, LIU H C. Research progress of Periostin expression in periodontal ligament[J]. Chinese Journal of Prosthodontics, 2012, 13(6): 363-366.
- [26] 管琳, 李硕, 汪硕, 等. 骨膜蛋白在人正畸牙移动中对牙周膜改建的作用机制[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(24): 3624-3625.
- [26] ZAN L, LI S, WANG Q, et al. The mechanism of periostin in periodontal ligament remodeling in orthodontic tooth movement[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2017, 14(24): 3624-3625.
- [27] SEN K, LINDENMEYER M T, GASPART A, et al. Periostin is induced in glomerular injury and expressed *de novo* in interstitial renal fibrosis[J]. Am J Pathol, 2011, 179(4): 1756-1767.
- [28] HAKUNO D, TAKAHASHI T, LAMMERDING J, et al. Focal adhesion kinase signaling regulates cardiogenesis of embryonic stem cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(47): 39534-39544.

(编辑:谭斯允)