

ATF4 通过调控 HKDC1 对肝癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响

张黎 崔杰 王安琪 孙国平

摘要 目的 探讨转录活化因子 4(ATF4)对肝癌细胞(HCC)增殖、迁移、凋亡的影响及其作用机制。方法 通过 RNA 干扰技术下调 HepG2 和 Huh7 细胞中 ATF4 和己糖激酶结构域成分 1(HKDC1)的蛋白表达;分别用 CCK-8 法、克隆形成实验、划痕实验及流式细胞术检测转染后的 HCC 增殖、迁移及凋亡的变化,用 Western blot 测定肝癌细胞系中 ATF4、HKDC1 以及凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达情况。结果 敲低 ATF4、HKDC1 可降低 HepG2 和 Huh7 细胞的增殖及迁移能力,并诱导其凋亡增加;敲低 ATF4 可抑制 HepG2 和 Huh7 细胞中 HKDC1 蛋白的表达。结论 ATF4 可能通过调节 HKDC1 蛋白的表达在肝癌的进展中发挥作用, HKDC1 可能是肝癌治疗干预的潜在靶点。

关键词 ATF4; HKDC1; 肝细胞癌; 内质网应激

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1932-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.016

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率分别位居世界第 6 和第 3,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是肝癌中最常见的类型,占有肝癌病例的 75%~85%^[1]。目前,系统性化疗是肝癌患者的重要治疗手段,但由于治疗耐药性,晚期 HCC 患者在很大程度上仍无法缓解^[2]。因此,探索肝癌发生分子机制,寻找肝癌治疗新靶点,对肝癌患者的治疗有着极其重要的临床意义。

细胞内外各种因素如低氧、营养缺乏、氧化应激、Ca²⁺浓度改变等刺激,可使未折叠或错误折叠蛋白质在内质网中累积,导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)和随后的未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)的激活^[3]。研究^[4]表明 ERS 能通过调节肿瘤微环境来影响肿瘤进展和治疗。转录活化因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)是参与 UPR 的蛋白激酶 R 样内质网激酶

(protein kinase R-like ER kinase, PERK)途径的重要组成部分,ATF4 及其靶基因与肿瘤血管生成和转移有关,ATF4 是治疗癌症的潜在靶点^[5]。相关研究表明己糖激酶结构域成分 1(hexokinase domain component 1, HKDC1)可能是 ATF4 转录识别的靶点之一^[6],HKDC1 是近年发现的第五种己糖激酶^[7],现已有研究^[8-11]表明 HKDC1 可能在乳腺癌、肺癌、结直肠癌及淋巴瘤中发挥致癌作用,但目前 HKDC1 在肝癌中的研究机制甚少。该研究通过观察敲低 ATF4 及 HKDC1 对 HCC 增殖、迁移及凋亡的影响,探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及培养 人 HCC 细胞株 HepG2、Huh7(购自中国科学院上海细胞库);在含 1% 链霉素、1% 青霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养,细胞置于含 5% CO₂ 的 37 °C 加湿培养箱中培养,根据细胞生长状态及时换液和传代。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、DMEM 高糖培养基(以色列 BI 公司);青-链霉素(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶、RIPA 细胞裂解缓冲液、PMSF 蛋白酶抑制剂(上海碧云天生物技术公司);通用型 ECL 化学发光显影试剂盒(美国 ThermoFisher 公司);抗 Bcl-2(BS1511)、Bax 抗体(BS2538)(美国 Bioword 公司);抗 GAPDH 抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(美国 Biologeng 公司);抗 ATF4 抗体(美国 Proteintech 公司);抗 HKDC1 抗体(北京 Bioss 公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、CCK-8 试剂盒(上海贝博生物科技有限公司);脂质体 LipofectamineTM 2000(美国 Millipore 公司);ATF4 小干扰 RNA 及其对照 siRNA(上海吉玛公司);结晶紫染色液(杭州吴鑫公司);高纯度质粒小量快速提取试剂盒(北京 Biomed 公司)。

1.1.3 主要仪器 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)、流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)、化学发光成像分析仪(美国 GE 公司)。

1.2 方法

2021-10-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81872047)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:张黎,女,硕士研究生;

孙国平,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

1.2.1 质粒提取 取 200 μl 菌液 (shNC、shHKDC1) 于 10 ml 含有氨苄抗生素的液体 LB 培养基中 200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,次日根据质粒提取试剂盒按步骤提取质粒后上机检测浓度。

1.2.2 细胞转染 预先将 HepG2 和 Huh7 接种于 6 孔板中,待细胞生长融合率达 50% ~ 60% 开始转染,将细胞分组设置为阴性组 (si-NC、shNC)、转染组 (si-ATF4、shHKDC1),按照 LipofectamineTM 2000 说明书进行转染,6 h 后将无血清的 Opti-MEM 培养基更换为含 10% 血清的完全培养基,转染后继续培养 48 h 用于后续实验。序列信息如下: si-NC: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' (F), 5'-ACGUGA CACGUUCGGAGAATT-3' (R); siATF4: 5'-CCUGAA AGAUUUGAUAGAATT-3' (F), 5'-UUCUAUCAAUC UUUCAGGT-3' (R); shNC: 5'-TTCTCCGAACGTGT CACGT-3'; shHKDC1: gcCTTGCTAATACAAGAGA GA。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将 HepG2 和 Huh7 以每孔 100 μl 的接种量 (细胞密度为 3×10^3 个/ml) 接种于 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,分别在转染后 24、48、72 h 加入 CCK-8 检测试剂 (10 μl /孔),继续孵育 2 h 后使用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光度 (optical density, OD)。

1.2.4 克隆形成实验检测细胞增殖 将转染后的细胞按 500 个/孔接种于 6 孔板中,培养 1~2 周,直至肉眼可见克隆形成结束培养,用 PBS 轻轻清洗 3 次后,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,再用 0.5% 结晶紫染色 30 min,在显微镜下观察对照组和转染组克隆数目 (细胞数 > 50 个计为一个克隆)。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞转染 48 h 后用 0.25% 的胰蛋白酶 (不含 EDTA) 消化,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,离心收集细胞后用 400 μl 膜联蛋白 V (Annexin V) 结合缓冲液重悬,加入 5 μl 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 室温下避光孵育 15 min,再加入 5 μl 碘化丙啶 (propidium, PI) 室温下避光孵育 5 min 后上机检测,获取数据后使用 CytExpert 软件进行分析。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移 将转染后的细胞按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞生长融合率达 90%,用 Marker 笔在 6 孔板背面划 3 条直线,用 200 μl 枪头垂直板面匀速划痕,使划痕线垂直于 3 条标记线,用 PBS 洗去脱落细胞后加入无血清培养基继续培养,分别于培养 0、24 h 后在 4 倍光学显微镜下拍照 (选取标记线与划痕相交处拍照,保证 2

个时间点拍照视野一致) 用 Image J 软件分析并计算划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.2.7 Western blot 检测相关蛋白的表达 细胞转染 48 h 后加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液置于冰上裂解 30 min 后刮取细胞裂解物,4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液;使用 BCA 试剂盒进行蛋白定量;在蛋白上清液中加入 $4 \times$ Loading buffer 后在 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加热 10 min 制备蛋白样品;用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,并将其转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,用特异性一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,包括 ATF4 (1 : 1 000)、HKDC1 (1 : 500)、GAPDH (1 : 2 000)、Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000),再用相应的二抗 (1 : 10 000) 在室温下孵育 2 h,最后用 ECL 发光显影检测蛋白;用 Image J 软件进行条带分析并计算其灰度值。

1.3 统计学处理 该研究使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图和统计分析,数据统计分析采用 t 检验,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲低 ATF4 对肝癌细胞增殖的影响 用 CCK-8 法和克隆形成实验来检测 si-NC 组和 si-ATF4 组肝癌细胞的增殖情况。CCK-8 结果显示,与 si-NC 组相比,敲低 ATF4 抑制肝癌细胞增殖能力,差异有统计学意义 ($t_{\text{HepG2 } 24 \text{ h}} = 3.408$, $t_{\text{HepG2 } 48 \text{ h}} = 6.261$, $t_{\text{HepG2 } 72 \text{ h}} = 7.393$; $t_{\text{Huh7 } 24 \text{ h}} = 5.271$, $t_{\text{Huh7 } 48 \text{ h}} = 9.135$, $t_{\text{Huh7 } 72 \text{ h}} = 9.853$; 均 $P < 0.01$) (图 1A); 克隆形成结果显示,与 si-NC 组相比,敲低 ATF4 抑制肝癌细胞克隆形成能力,差异有统计学意义 ($t_{\text{HepG2}} = 17.270$, $t_{\text{Huh7}} = 16.280$; 均 $P < 0.01$) (图 1B)。

2.2 敲低 ATF4 对肝癌细胞迁移能力的影响 划痕实验结果显示,24 h 后 si-ATF4 划痕组愈合率较 si-NC 组低,差异有统计学意义 ($t_{\text{HepG2}} = 17.420$, $t_{\text{Huh7}} = 19.310$; 均 $P < 0.01$) (图 2)。结果表明抑制 ATF4 基因的表达可能抑制肝癌细胞的迁移潜能。

2.3 敲低 ATF4 对肝癌细胞凋亡率的影响 流式细胞术检测结果显示,与 si-NC 组比较,抑制 ATF4 基因的表达后, HepG2 和 Huh7 细胞凋亡增加,差异有统计学意义 ($t_{\text{HepG2}} = 8.786$, $t_{\text{Huh7}} = 6.872$; 均 $P < 0.01$) (图 3A); 为了进一步探究敲低 ATF4 诱导肝癌细胞凋亡的机制,用 Western blot 检测肝癌细胞中 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达情况,结果显示,敲除 ATF4

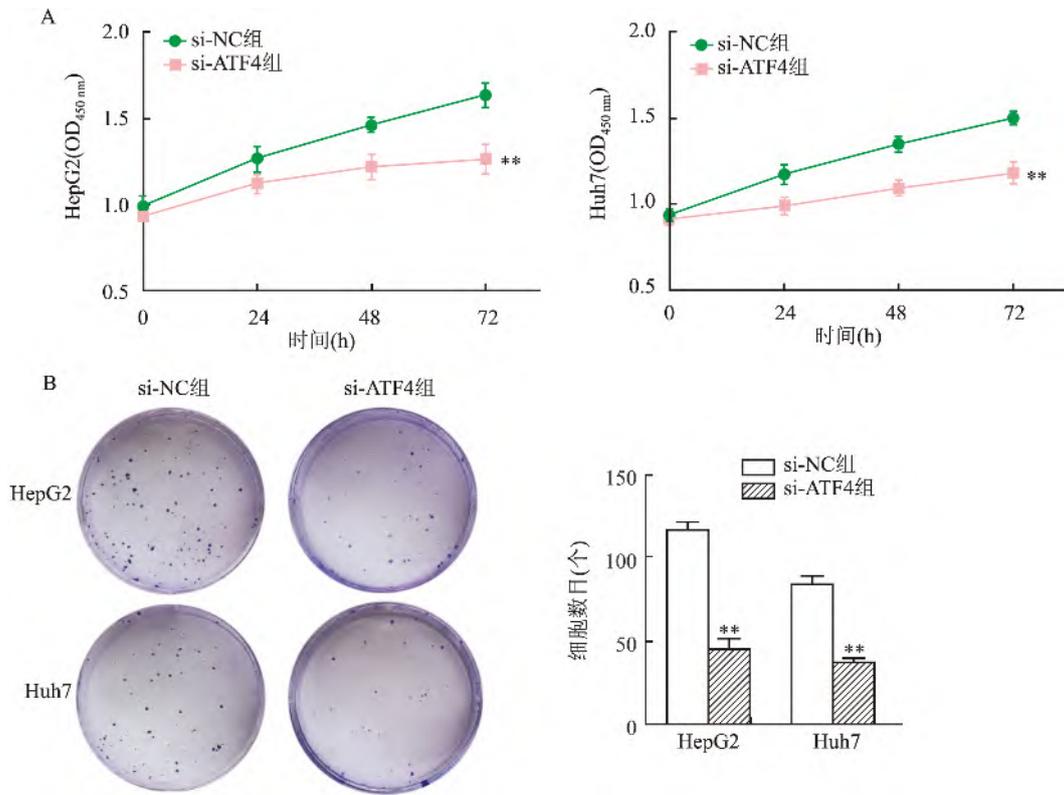


图1 敲低 ATF4 对 HepG、Huh7 细胞增殖和克隆形成的影响

A: CCK-8 法检测敲低 ATF4 对 HepG、Huh7 细胞增殖的影响; B: 克隆形成实验检测敲低 ATF4 对 HepG、Huh7 细胞集落形成的影响; 与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$

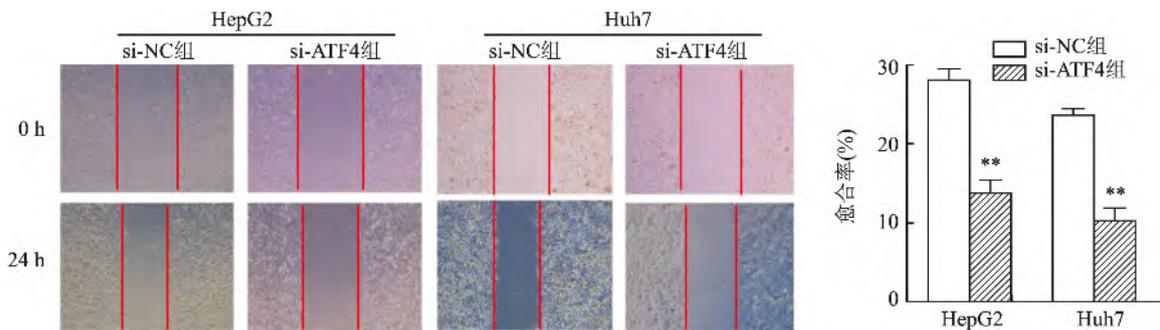


图2 敲低 ATF4 对 HepG2、Huh7 细胞迁移的影响 ×4

与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$

可上调肝癌细胞中 Bax 蛋白的表达而下调 Bcl-2 蛋白的表达 相较于 si-NC 组, si-ATF4 组 Bcl-2/Bax 的比值显著降低, 差异有统计学意义 ($t_{HepG2} = 22.710$, $t_{Huh7} = 37.950$; 均 $P < 0.01$) (图 3B)。

2.4 ATF4 通过调控 HKDC1 对肝癌细胞增殖产生影响 为了探究 ATF4 在肝癌细胞中对 HKDC1 的调控作用, 该研究在 HepG2 和 Huh7 细胞系中敲除 ATF4 后, 用 Western blot 检测 HKDC1 基因的表达, 结果显示沉默 ATF4 可以下调肝癌细胞中 HKDC1 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ($t_{HepG2, ATF4} =$

12.340 , $t_{Huh7, ATF4} = 5.586$; $t_{HepG2, HKDC1} = 13.850$, $t_{Huh7, HKDC1} = 14.850$; 均 $P < 0.01$) (图 4A); 为了进一步探究 HKDC1 在肝癌细胞中的作用, 在 HepG2 和 Huh7 细胞系中敲除 HKDC1 后, 进行细胞增殖和凋亡检测, 结果发现敲除 HKDC1 后, CCK-8 检测发现两种细胞系的增殖均受到抑制 ($t_{HepG2, 24h} = 4.393$, $t_{HepG2, 48h} = 9.673$, $t_{HepG2, 72h} = 6.747$; $t_{Huh7, 24h} = 5.677$, $t_{Huh7, 48h} = 9.960$, $t_{Huh7, 72h} = 10.750$; 均 $P < 0.01$); 另外, 流式细胞凋亡术结果显示, 与 shNC 组对比, 抑制 HKDC1 的表达后, HepG2 和 Huh7 细胞凋亡增

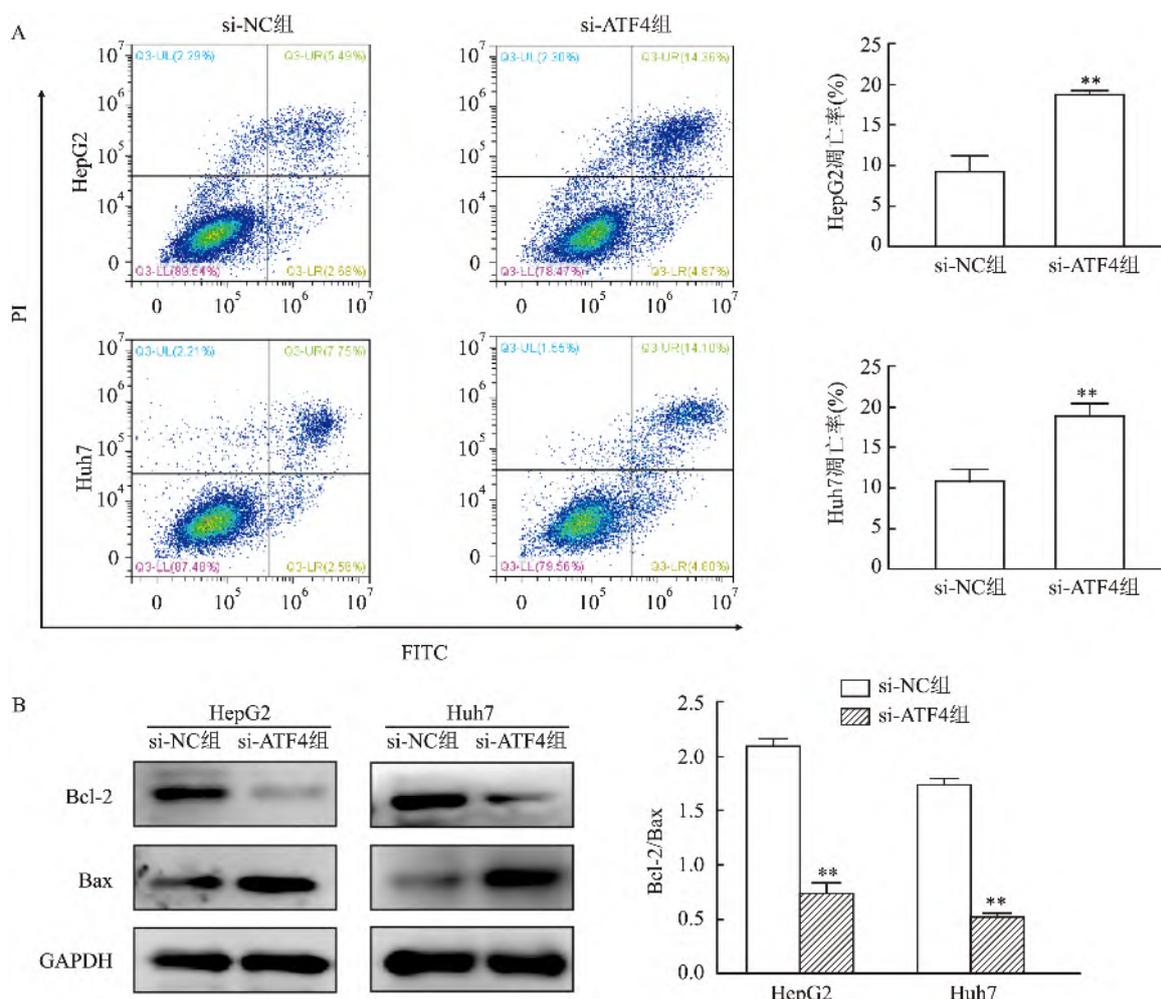


图3 敲低 ATF4 诱导 HepG2、Huh7 细胞凋亡

A: 流式细胞术检测敲低 ATF4 对 HepG、Huh7 细胞凋亡的影响; B: Western blot 检测敲低 ATF4 对 HepG、Huh7 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达量的影响; 与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$

加, 差异有统计学意义 ($t_{\text{HepG2}} = 7.836$, $t_{\text{Huh7}} = 9.016$; 均 $P < 0.01$) (图 4B、C); 划痕实验结果显示, 与 shNC 组相比, shHKDC1 组肝癌细胞迁移能力降低, 差异有统计学差异 ($t_{\text{HepG2}} = 14.830$, $t_{\text{Huh7}} = 20.420$; 均 $P < 0.01$) (图 4D)。

3 讨论

在低氧、营养缺乏的肿瘤微环境下, 肿瘤细胞仍可生存下来, 这可能与导致细胞存活的压力相关信号通路的激活有关, ATF4 是其中的关键介质, 其通过参与氧化还原稳态、自噬和血管生成的基因转录来促进肿瘤细胞存活, 维持肿瘤代谢的平衡, 目前已有关于在肝癌治疗中靶向 ATF4 途径增强细胞药物敏感性的相关研究的报道^[12]。与正常组织相比, ATF4 在肿瘤组织中表达增高, 其在肿瘤进展中的作用已被证实^[13]。为了研究 ATF4 在肝癌细胞生长

中的作用, 该研究使用 ATF4 特异性的 siRNA 有效抑制 ATF4 在肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 中的表达后, 观察肝癌细胞体外增殖迁移能力和凋亡的变化, 结果显示细胞内 Bax 蛋白表达上调, Bcl-2 蛋白表达降低, 肝癌细胞凋亡增加且增殖迁移受到抑制。为进一步观测其长期效应, 采用相同的方法研究其对肝癌细胞克隆形成的影响, 发现沉默 ATF4 的表达后成功抑制了肝癌细胞的克隆形成。

ATF4 是由各种应激和病理诱导的适应性综合应激反应 (ISR) 的关键调节因子, 相关研究^[6]表明, 内质网应激可诱导 ATF4 介导的 HKDC1 基因的转录上调, HKDC1 基因是 ISR 的一个新的候选成分, ISR 期间 HKDC1 的上调通过刺激葡萄糖在细胞内聚集, 并将其驱动至糖酵解过程中, 有助于克服应激期间能量的缺乏。该研究假设 ATF4 通过上调 HKDC1 的表达来增强肝癌细胞的增殖及迁移能力,

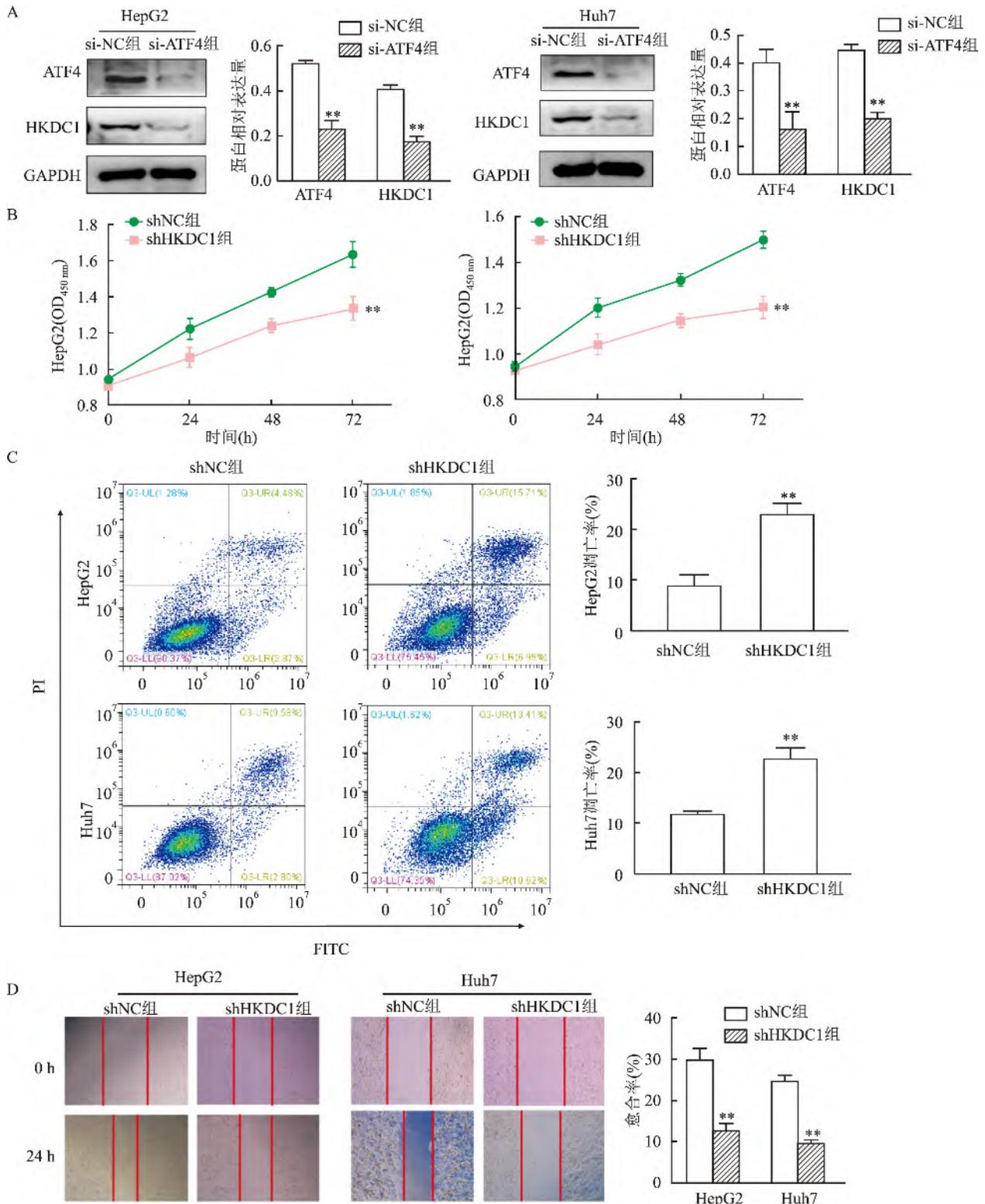


图4 ATF4可能通过靶向HKDC1促进HepG2、Huh7细胞增殖迁移 ×4

A: Western blot 检测敲低 ATF4 对 HepG、Huh7 细胞 HKDC1 蛋白表达的影响; 与 si-NC 组比较: ** $P < 0.01$; B ~ D: 分别采用 CCK-8 法、流式细胞凋亡术、划痕实验检测敲低 HKDC1 对 HepG、Huh7 细胞增殖、凋亡及迁移的影响; 与 shNC 组比较: ** $P < 0.01$

研究显示抑制 ATF4 在肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 中的表达后, 蛋白表达下调, 证实了在 HCC 中 ATF4

对 HKDC1 蛋白表达的调节作用。有研究^[14]表明, 肿瘤细胞能量代谢方式发生改变, 即使在氧气充足

的情况下,肿瘤细胞仍主要利用糖酵解而不是氧化磷酸化来产生能量,这种现象被称为“Warburg 效应”这种肿瘤细胞中的有氧糖酵解反应能产生大量三磷酸腺苷(ATP)和生物合成所需的代谢中间体,以满足肿瘤生长和恶性进展中大量的生物合成和能量需求,是肿瘤细胞生长、增殖及转移的重要因素之一。己糖激酶(HKs)是糖酵解第一步的关键代谢酶,其中HKDC1是一种新的HK亚型^[7]。据相关研究表明,HKDC1在肿瘤组织中表达增多,是一种新的潜在的肺癌治疗靶点^[15]。该实验通过抑制HKDC1在肝癌细胞中的表达来观察其对肝癌细胞生物学行为的影响,结果显示敲低HKDC1的表达对HepG2和Huh7肝癌细胞株有增殖抑制和诱导凋亡的作用。该研究进一步证实ATF4可能作用于HKDC1并增强其表达,从而在肝癌细胞的增殖、转移中发挥作用。综上所述,该研究证实了ATF4和HKDC1在HCC进展中的作用,是肝癌治疗的候选靶点。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–49.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301–14.
- [3] 范璐璐,孙国平,查丽霞,等. 丹皮酚逆转内质网应激诱导的HepG2细胞凋亡抵抗[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 45–50.
- [4] Ramirez M U, Hernandez S R, Soto-Pantoja D R, et al. Endoplasmic reticulum stress pathway, the unfolded protein response, modulates immune function in the tumor microenvironment to impact tumor progression and therapeutic response [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 169.
- [5] Wortel I, van der Meer L T, Kilberg M S, et al. Surviving stress: modulation of ATF4-mediated stress responses in normal and malignant cells [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(11): 794–806.
- [6] Evstafieva A G, Kovaleva I E, Shoshinova M S, et al. Implication of KRT16, FAM129A and HKDC1 genes as ATF4 regulated components of the integrated stress response [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0191107.
- [7] Khan M W, Ding X, Cotler S J, et al. Studies on the tissue localization of HKDC1, a putative novel fifth hexokinase, in humans [J]. *J Histochem Cytochem*, 2018, 66(5): 385–92.
- [8] Chen X, Lv Y, Sun Y, et al. PGC1beta regulates breast tumor growth and metastasis by SREBP1-mediated HKDC1 expression [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 290.
- [9] Wang X, Shi B, Zhao Y, et al. HKDC1 promotes the tumorigenesis and glycolysis in lung adenocarcinoma via regulating AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20: 450.
- [10] Fuhr L, El-Athman R, Scrima R, et al. The circadian clock regulates metabolic phenotype rewiring via HKDC1 and modulates tumor progression and drug response in colorectal cancer [J]. *EBioMedicine*, 2018, 33: 105–21.
- [11] Chen Q, Feng J, Wu J, et al. HKDC1 c-terminal based peptides inhibit extranodal natural killer/T-cell lymphoma by modulation of mitochondrial function and EBV suppression [J]. *Leukemia*, 2020, 34(10): 2736–48.
- [12] Zhou B, Lu Q, Liu J, et al. Melatonin increases the sensitivity of hepatocellular carcinoma to sorafenib through the PERK-ATF4-Bcl-1 pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9): 1905–20.
- [13] Chen D, Fan Z, Rauh M, et al. ATF4 promotes angiogenesis and neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner [J]. *Oncogene*, 2017, 36(40): 5593–608.
- [14] Liberti M V, Locasale J W. The warburg effect: how does it benefit cancer cells [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211–8.
- [15] Li G H, Huang J F. Inferring therapeutic targets from heterogeneous data: HKDC1 is a novel potential therapeutic target for cancer [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(6): 748–52.

Effect of ATF4 on the proliferation, migration and apoptosis of hepatocellular carcinoma by regulating HKDC1 protein

Zhang Li, Cui Jie, Wang Anqi, et al

(Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the influences of activating transcription factor 4 (ATF4) on the proliferation, migration and apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) and its molecular mechanism. **Methods** Expression of ATF4 and the hexokinase domain component 1 (HKDC1) were down-regulated in HepG2 and Huh7 cells by RNA interference technique. In HCC cell lines, CCK-8, clone formation, wound-healing assay and flow cytometry apoptotic analysis were used to observe the changes in the proliferation, migration and apoptosis of HCC after transfection and the expressions of ATF4, HKDC1 and apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax in hepatocellular carcinoma

上颌窦区三种种植体表面改性工艺早期成骨能力的比较

陈永翔, 刘亚军, 杨刚, 刘鑫, 王元银

摘要 目的 为了评价3种市售种植体表面SLA[®]、SLActive[®]、Xpeed[®]在上颌窦成骨困难区内早期成骨效果。方法 细胞实验:将MC3T3E1细胞接种在3种钛片表面,细胞染色与CCK-8法检测黏附与增殖能力。动物实验:将16只新西兰兔随机分为SLActive组与Xpeed组,双侧上颌窦建立外提升模型,以SLA钛片做对照,按分组植入不同钛片,术后4周qRT-PCR检测骨形态发生蛋白2(BMP2)、核心结合因子2(Runx2)、骨钙素(OCN)、I型胶原蛋白(Col-I)的mRNA表达量,Micro CT分析钛片表面骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)及骨小梁数量(Tb.N),评价成骨效果。结果 6h细胞计数结果显示3种钛片表面细胞黏附量差异无统计学意义,24h荧光染色观察Xpeed组细胞形态与铺展较SLA、SLActive组更充分。CCK-8法检测结果显示第3、7天SLActive组与Xpeed组细胞增殖均高于SLA组($P < 0.05$),而两实验组SLActive组与Xpeed组之间差异无统计学意义。qRT-PCR成骨相关基因表达量Xpeed组高于SLA、SLActive组($P < 0.01$)。Micro-CT检测术后第4周时Xpeed组Tb.Th大于SLA、SLActive组($P < 0.05$),Tb.Sp小于SLA、SLActive组($P < 0.05$)。结论 表明Xpeed[®]表面处理的钛片在上颌窦内早期成骨效果有更好的表现。

关键词 种植体;早期成骨;动物模型;上颌窦提升
中图分类号 R 782

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1938-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.017

种植区骨密度及剩余牙槽嵴形态是影响种植体

2021-10-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162);安徽省重点研究和开发计划项目(编号:201904a07020062)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

作者简介:陈永翔,男,硕士研究生;

王元银,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: wyy1970548@sohu.com

成功的重要因素。上颌磨牙区缺牙后,剩余牙槽嵴发生萎缩,上颌窦气化,同时上颌窦区成骨前体细胞不足,血供环境较差的特点,导致此区域植入的种植体常无法在短期形成有效稳定骨结合,导致更长愈合周期^[1]。为提高上述成骨困难区种植成功率,缩短愈合周期,众多学者尝试不同工艺改善钛表面。由于临床验证的高成本与困难,上颌窦区直接基于市售种植体表面性能比较的研究报道也较少。该研究通过体外实验比较3种市售种植体表面SLA[®]、SLActive[®]、Xpeed[®]对骨髓干细胞生物学行为的影响,通过兔上颌窦外提升模型,探讨三者早期骨结合能力有无差异,为临床中上颌窦区种植体的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备 SLA[®]、SLActive[®]圆形钛片各50枚,厚度1.0 mm,直径5 mm,由瑞士Straumann[®]公司研究中心提供。Xpeed[®]圆形钛片50枚,厚度1.0 mm,直径5 mm,由韩国Megagent[®]公司研究中心提供。小鼠前成骨细胞系MC3T3E1细胞(中国上海科学院细胞库);DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗溶液(美国Gibco公司);荧光定量PCR试剂盒、Triton X-100(美国Sigma公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);PrimeScript RT试剂盒(日本TaKaRa公司);罗丹明-鬼笔环肽鬼笔环肽(北京索莱宝公司);CCK-8试剂盒、DAPI(上海碧云天公司);细胞恒温培养箱、实时定量荧光PCR仪(美国Thermo公司);正置荧光显微镜Leica TCS SP2(德国Leica公司);微孔板分光光度计(美国Molecular Devices公司);种植机、内径5 mm取骨环钻(美国Biomet3i公司);超声

cells were determined by Western blot. **Results** Functional studies had shown that knockdown of ATF4 and HKDC1 not only led to an increase in cell apoptosis and a decrease in cell proliferation but also inhibited the cells' abilities of migration; ATF4 silencing could inhibit the expression of HKDC1 protein. **Conclusion** ATF4 may play a role in the progression of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of HKDC1 protein, and HKDC1 may be a potential target of therapeutic intervention for HCC.

Key words ATF4; HKDC1; hepatocellular carcinoma; endoplasmic reticulum stress