

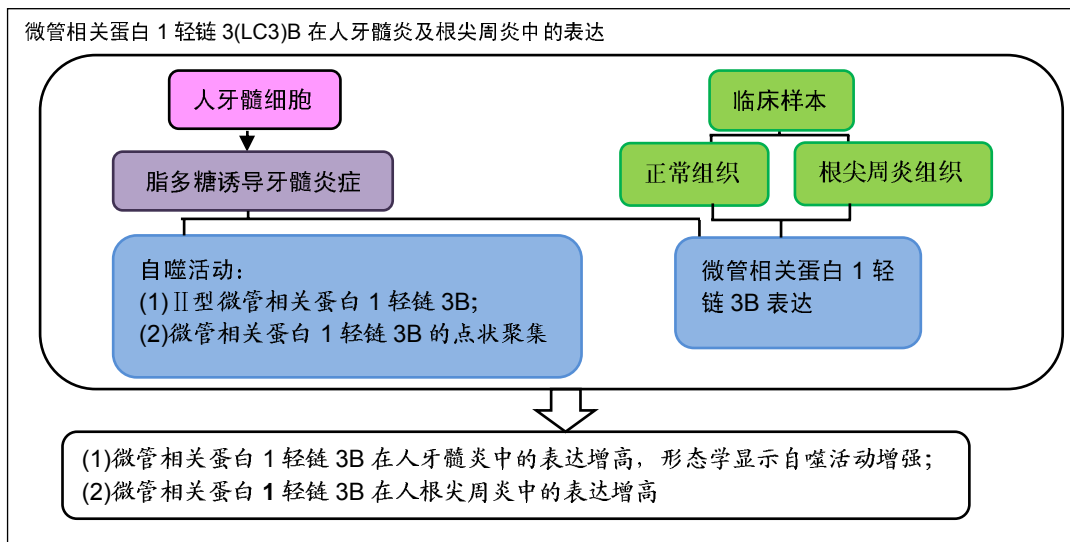
人牙髓炎及根尖周炎病损组织中自噬相关蛋白 微管相关蛋白1轻链3B的表达

马金宝¹, 王倩², 董明³, 白桦² (¹大连医科大学附属第一医院口腔科, 辽宁省大连市 116011; ²大连医科大学口腔医学院, 辽宁省大连市 116044; ³大连医科大学, 辽宁省大连市 116044)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1177

ORCID: 0000-0002-5042-4421(马金宝); 0000-0002-9960-030X(王倩)

文章快速阅读:



马金宝, 男, 1981年生, 辽宁省人, 汉族, 2011年东京医科齿科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事口腔临床与基础研究。

并列第一作者: 王倩, 女, 1985年生, 辽宁省人, 汉族, 2012年上海交通大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事口腔临床与基础研究。

通讯作者: 白桦, 博士, 讲师, 大连医科大学, 辽宁省大连市 116044

文献标识码:A
稿件接受: 2018-12-13



文题释义:

微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3): 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8 (Aut7/Apg8)基因的同源物, 定位于自噬体表面并参与其形成。LC3B 作为 LC3 家族蛋白, 被普遍认为是自噬的标记物, 同时有研究表明 LC3B 与许多疾病如肿瘤等的发生发展相关。

自噬: 是细胞通过溶酶体途径对其胞内内容物(如错误折叠的蛋白、受损细胞器等)进行自我消化、自我降解的过程, 这一过程对细胞存活、分化及维持稳态具有重要的意义。

摘要

背景: 自噬在牙髓炎、根尖周炎及其引起的牙槽骨破坏中的作用和明确机制尚未完全阐明。

目的: 研究自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)B 在人牙髓炎及根尖周炎中的表达, 以初步探讨自噬发挥的作用。

方法: 经患者知情同意后选取临床因正畸新鲜拔除的健康第 1 前磨牙或外科完整拔除无龋坏的健康第 3 磨牙。使用 1 mg/L 脂多糖刺激牙髓细胞, 作用时间分别为 0, 6, 12, 24, 48 h, 使其引起致炎反应。Western blot 法检测正常及脂多糖刺激的人牙髓细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3B 的表达水平; 细胞免疫荧光染色观察微管相关蛋白 1 轻链 3B 点状聚集情况; Real-time RT-PCR 法检测人慢性根尖周炎病损组织中微管相关蛋白 1 轻链 3B 的表达水平。

结果与结论: ①脂多糖刺激 6, 12, 24, 48 h 后的牙髓细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3B 的表达高于正常牙髓细胞, 且 II 型微管相关蛋白 1 轻链 3B 的表达随刺激时间的延长而增高, 其中 24 h 达到高峰; ②微管相关蛋白 1 轻链 3B 点状聚集随脂多糖刺激时间延长而增多; ③微管相关蛋白 1 轻链 3B 在人慢性根尖周炎病损组织中的表达高于正常根尖周组织; ④结果说明, 自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3B 在人牙髓炎及根尖周炎中的表达增高, 形态学亦显示自噬活动增强, 提示自噬作用可能与牙髓炎及根尖周炎的发生发展相关。

关键词:

自噬; LC3B; 牙髓炎; 根尖周炎; 自噬相关蛋白; II 型微管相关蛋白; 自噬活动; 慢性根尖周炎

主题词:

自噬; 牙髓; 根尖周炎; 组织工程

中图分类号: R496

基金资助:

国家自然科学基金(81300869), 项目负责人: 白桦; 辽宁省自然科学基金(20180550008), 项目负责人: 白桦

缩略语:

微管相关蛋白 1 轻链 3: microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3

Ma Jinbao, DDS, PhD, Associate chief physician, Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Wang Qian, Master, Lecturer, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Ma Jinbao and Wang Qian contributed equally to this work.

Corresponding author: Bai Hua, DDS, PhD, Lecturer, College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Expression of autophagy-associated protein light chain 3B in human pulpitis and periapical periodontitis

Ma Jinbao¹, Wang Qian², Dong Ming³, Bai Hua² (¹Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China; ²College of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China; ³Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Role of autophagy in pulpitis, periapical periodontitis and alveolar bone destruction and the underlying mechanisms have not been fully elucidated.

OBJECTIVE: To investigate the expression of autophagy-related protein light chain 3B in human pulpitis and periapical periodontitis, in order to explore the rule of autophagy.

METHODS: The healthy first premolar or surgically removed third premolar was selected from the patients undergoing orthodontics after their consent informs. The dental pulp cells were treated with 1 mg/L lipopolysaccharide for 0, 6, 12, 24 and 48 hours to induce inflammation. The expression of light chain 3B in normal and lipopolysaccharide-stimulated dental pulp cells was detected by western blot assay. The dotted accumulation of light chain 3B was observed by immunofluorescence. The expression level of light chain 3B in specimens of human chronic periapical periodontitis tissues was tested by real-time RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression of light chain 3B in dental pulp cells stimulated by lipopolysaccharide for 6, 12, 24 and 48 hours was higher than that in normal dental pulp cells. The expression of light chain 3B increased with time, and peaked at 24 hours. Dotted accumulation of light chain 3B increased with lipopolysaccharide simulation time prolonged. The expression level of light chain 3B in specimens of human chronic periapical periodontitis tissues was higher than that in normal periapical tissues. These results indicate that the expression of light chain 3B is increased in human pulpitis and periapical periodontitis, and morphology also shows an increase of autophagy, suggesting that autophagy may be associated with the occurrence and development of pulpitis and periapical periodontitis.

Subject headings: Autophagy; Dental Pulp; Periapical Periodontitis; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81300869 (to BH); the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20180550008 (to BH)

0 引言 Introduction

牙髓炎和根尖周炎是由革兰阴性厌氧菌为主的混合感染所引起^[1], 其最主要的病因就是细菌及其毒素等病原体侵入到髓腔后产生多种有害物质, 在这些物质的作用下引起牙髓的炎症, 并进一步导致根尖周炎的发生^[2-3]。牙髓炎及根尖周炎具有患病率高、急发症状明显、治疗过程复杂等特点, 给患者带来了极大的不便与痛苦, 也是口腔临床工作者极为关注的疾病之一。

自噬是真核细胞内主要的蛋白质降解途径之一^[4], 作为机体内一种重要的防御及代谢功能, 在炎症及感染性疾病中发挥着重要的作用^[5]。研究显示自噬在病原体感染中具有双面作用^[6]: 一方面, 机体可利用自噬清除感染入侵的病原体; 另一方面, 自噬可被某些病原体利用、修饰或干扰, 以促进自身在宿主细胞内的存活与增殖。可见自噬在病原体感染中的作用是不可忽视的, 特别是病原体入侵导致自噬的快速诱导, 这对于先天和适应性免疫反应都是至关重要的^[7]。最近的研究也显示自噬和炎症小体相互交叉和相互调节, 以维持组织内的平衡^[8-9]。牙髓牙本质复合体中, 自噬可能在炎症成牙本质细胞中发挥双重作用, 它可能保护成牙本质细胞, 使它们在早期存活, 但在炎症后期加速细胞凋亡^[10-12]。Akt/mTOR/Survivin通路也可能在炎症后期保护细胞免于自噬细胞死亡中发挥重要作用^[11]。

微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)是哺乳动物细胞中酵母ATG8 (Aut7/Apg8)基因的同源物^[13], 定位于自噬体表面并参与其形成, 分为I型和II型。LC3B作为LC3家族蛋白, 被普遍认为是自噬的标记物^[14], 同时有研究表明LC3B与许多疾病

如肿瘤等的发生发展相关^[15-17], 但其在牙髓根尖周炎中的表达及作用鲜见报道。基于此, 该研究检测LC3B在牙髓炎及根尖周炎中的表达情况, 并利用免疫荧光技术检测自噬活动中细胞的形态学变化, 初步探讨自噬在牙髓炎及根尖周炎中的作用, 以期疾病的发生发展机制研究提供新的理论依据。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 细胞学及分子生物学实验观察。

1.2 时间及地点 于2017年6至12月在大连医科大学附属第一医院及大连医科大学口腔医学院完成。

1.3 对象 同期在大连医科大学附属第一医院口腔科行根尖手术或拔牙患者中, 取得患者的知情同意后, 收集慢性根尖周炎病损组织6例, 因正畸需要拔除的健康牙齿的牙周膜组织1例, 放入装有TRIzol@Reagent(Thermo, 美国)的EP管中, -80℃保存。慢性根尖周炎患者纳入标准: ①患者无牙周病及全身系统性疾病, 1个月内未服用过抗生素及非类固醇类抗炎药等; ②患牙经检查已无牙髓活力; ③X射线证实有根尖暗影; ④经临床诊断需行根尖手术, 术后可获得与牙齿根尖相连的病损组织。

1.4 材料 体积分数10%胎牛血清、 α -MEM(Gibco, 美国); 1 mg/L脂多糖、兔抗LC3B抗体(Sigma, 美国); NP-40裂解液、鼠抗 β -actin抗体、抗兔二抗、抗鼠二抗(碧云天生物, 中国); Alexa Fluor 488抗兔IgG抗体(Invitrogen, 美国); PrimeScript反转录试剂盒(Takara, 日本); BCA蛋白定量试剂盒、TRIzol@ Reagent(Thermo, 美国); Odyssey成像系统(Licor, 美国); 荧光显微镜(Olympus BX-51TF, 日本)。

1.5 实验方法

1.5.1 牙髓细胞的分离培养 经患者知情同意后选取临床因正畸新鲜拔除的健康第1前磨牙或外科完整拔除无龋坏的健康第3磨牙。放入含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养液的离心管,置于冰盒中。转入实验室无菌台上操作, PBS清洗干净,刮净牙周膜。继而将冲洗干净的牙齿置于无菌袋中,用锤子砸开牙齿,取出牙髓,放入盛有PBS的EP管中,用剪刀剪碎牙髓组织。1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入1 mL胶原酶; 37 °C,体积分数5%CO₂ 孵育箱45 min(每5 min振荡1次),随后1 000 r/min离心5 min离心,弃上清,用含体积分数10%胎牛血清的培养液冲洗,离心,重复3次后弃上清。用枪头吸出组织块,种入盛有约2 mL含体积分数20%胎牛血清培养液的25 mL培养瓶中。EP管中加入约500 μ L含体积分数20%胎牛血清的培养液,重悬后种入培养瓶。将培养瓶放入37 °C,体积分数5%CO₂孵育箱中培养,待细胞从组织块中游出增加后,添加培养液。倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长情况,待细胞汇度达到80%左右,胰酶消化传代。

1.5.2 脂多糖作用于牙髓细胞引起致炎反应 使用1 mg/L脂多糖刺激牙髓细胞使其引起致炎反应^[1],作用时间分别为0, 6, 12, 24, 48 h。

1.5.3 Western blot检测人牙髓炎中LC3B的表达

(1)蛋白样本的制备:细胞胰酶消化离心,收集细胞并用PBS洗2次,弃上清后加入NP-40裂解液,置于冰上,超声充分裂解后,15 000 r/min离心5 min,取上清液即为蛋白。BCA法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液混匀,100 °C水浴煮沸5 min进行蛋白样本制备。

(2)蛋白质印迹:样本经15%SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭,TBS-T漂洗3次。加入1:5 000稀释兔抗LC3B抗体、1:2 000稀释鼠抗 β -actin抗体4 °C孵育过夜后,TBS-T漂洗3次。继而分别加入带有荧光基团标记的1:5 000稀释抗兔二抗、1:5 000稀释抗鼠二抗避光孵育60 min,TBS-T漂洗3次。最后Odyssey成像系统扫描成像。

1.5.4 细胞免疫荧光染色 细胞用体积分数4%甲醛固定后PBS清洗,继而0.2%TritonX-100封闭渗透30 min,PBS清洗,一抗为1:5 000稀释兔抗LC3B抗体4 °C孵育过夜;PBS清洗,二抗为1:2 000 Alexa Fluor 488抗兔IgG抗体室温避光孵育60 min;PBS清洗,DAPI工作液(1 mg/L)进行细胞核染色15 min;PBS清洗,封片剂封固。荧光显微镜观察取像。

1.5.5 Real-time RT-PCR检测人慢性根尖周炎病损组织中LC3B的表达 充分研磨组织,TRIzol@Reagent提取并纯化组织的RNA,并以此为模板使用PrimeScript反转录试剂盒合成cDNA。引物由宝生物工程(大连)有限公司设计并合成,以GAPDH为内参基因,引物序列见表1。采用Real-time PCR法检测人慢性根尖周炎病损组织中LC3B

的表达水平。

表1 Real-time RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time RT-PCR

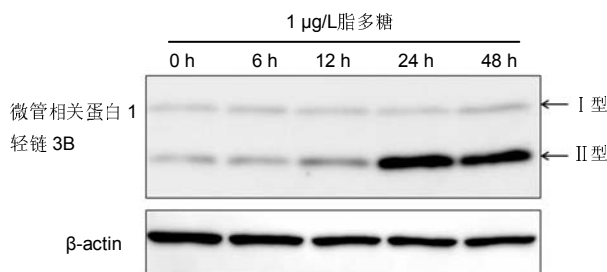
引物名称	序列(5'-3')	引物长度(mer)	碱基对度(bp)
GAPDH-F	GCA CCG TCA AGG CTG AGAAC	20	138
GAPDH-R	TGG TGA AGA CGC CAG TGG A	19	
MAP1LC3B-F	AGT TGG CAC AAA CGC AGG GT'	21	80
MAP1LC3B-R	TTA GGA GTC AGG GAC CTT CAG CA	23	

1.6 主要观察指标 ①LC3B在人牙髓炎中的表达;②LC3B在致炎的牙髓细胞中的分布情况;③LC3B在人慢性根尖周炎病损组织中的表达。

1.7 统计学分析 由第一作者应用Graphpad5软件对牙髓细胞中LCB的蛋白表达水平数据进行统计,采用Newman-keuls方法行单因素方差分析。

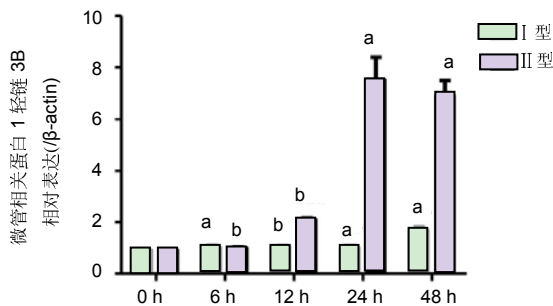
2 结果 Results

2.1 LC3B在人牙髓炎中的表达 经Western blot检测,脂多糖致炎的牙髓细胞中LC3B的表达随着脂多糖作用时间的延长而增高,同时II型LC3B也出现明显增加情况,见图1,其表达在24 h达到高峰。通过对条带的灰度值进行分析显示,相对于对照组,随脂多糖作用时间延长,LC3B I型和II型的表达均增高,且差异有统计学意义,见图2。



图注:微管相关蛋白1轻链3B的表达随着脂多糖作用时间的延长而增高。

图1 脂多糖诱导后人牙髓细胞中微管相关蛋白1轻链3B的表达
Figure 1 Expression of light chain 3B in human dental pulp cells induced by lipopolysaccharide

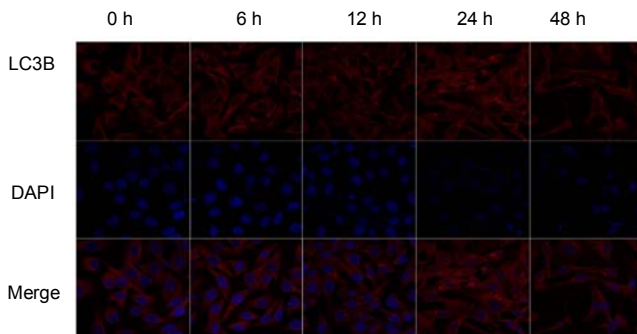


图注:与0 h比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.001$ 。

图2 脂多糖诱导后人牙髓细胞中微管相关蛋白1轻链3B的表达分析

Figure 2 Expression of light chain 3B in human dental pulp cells induced by lipopolysaccharide

2.2 LC3B点状聚集 免疫荧光染色实验检测LC3B在致炎的牙髓细胞中的分布情况,结果显示在脂多糖致炎作用下,LC3B在牙髓细胞中由分散状态转为点状聚集,并随着脂多糖作用时间的延长,点状聚集情况明显增多,见图3。

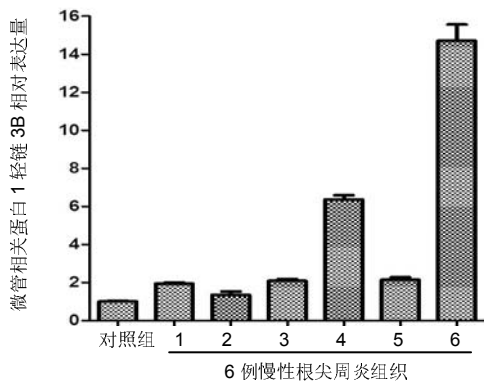


图注:随着脂多糖作用时间的延长,LC3B在牙髓细胞中点状聚集情况明显增多。

图3 脂多糖诱导后牙髓细胞中微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)的分布($\times 200$)

Figure 3 Distribution of light chain 3B in human dental pulp cells induced by lipopolysaccharide ($\times 200$)

2.3 LC3B在人慢性根尖周炎病损组织中的表达 通过Real-time PCR检测人慢性根尖周炎组织中LC3B的表达情况,结果显示,与正常牙周膜组织相比,LC3B在6例人慢性根尖周炎病损组织中均表现为表达增加的趋势,见图4。



图注:与正常牙周膜组织相比,微管相关蛋白1轻链3B在6例人慢性根尖周炎病损组织中均表现为表达增加的趋势。

图4 人慢性根尖周炎病损组织中微管相关蛋白1轻链3B的表达

Figure 4 Expression of light chain 3B in chronic periapical periodontitis tissue

3 讨论 Discussion

自噬是维持细胞内环境稳态的重要机制,正常情况下自噬处于较低的水平,但受到饥饿、氧化损伤、病原微生物入侵等刺激时可诱导自噬活性增高^[18]。有研究显示自噬活性在成熟的牙髓细胞中增强^[19];此外自噬与成牙本质细胞发育有一定关系^[20-21];自噬相关基因如LC3Av1、Beclin1在口腔癌中表达异常^[22-23];在牙周炎患者的外周血当中,自噬相关基因ATG12的表达增高等^[24],可见在口腔生理病理过程中自噬也发挥了重要的作用。此次实验结果显示脂

多糖刺激的人牙髓细胞中LC3B的表达较未刺激组增高;人慢性根尖周炎病损组织中的LC3B表达量也较正常对照组增高,提示LC3B可能与牙髓炎及根尖周炎的发生发展相关。

作为自噬活性的典型标记物,LC3有I型和II型之分,未发生自噬时,细胞内合成的LC3经过加工,成为胞质可溶性的I型LC3;当自噬发生时,I型LC3(LC3-I)经泛素样加工修饰过程,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成II型LC3(LC3-II),LC3-II结合并始终位于胞内自噬体膜上,其含量的多少与自噬泡数量的多少成正比,与自噬活性成正相关^[25]。此次实验结果显示随着脂多糖刺激时间的延长,在炎性牙髓细胞中II型LC3B表达增高,提示脂多糖诱导牙髓炎后自噬活力增强,而48 h比24 h表达减弱说明此时自噬趋于平稳并进入蛋白降解阶段。

自噬是一个复杂、动态的细胞过程,利用单一指标对自噬进行检测和分析可能会造成结果的偏差,因此作者又对牙髓细胞进行了免疫荧光检测以观察自噬活动。LC3-I到LC3-II的转变体现在免疫荧光是胞浆中弥散分布的LC3变为点状聚集^[14]。细胞免疫荧光结果可看出未受脂多糖刺激人牙髓细胞中LC3B呈弥散状分布于胞浆中,随着刺激时间不断延长,可以看到明显的高荧光信号点状聚集,提示着炎性牙髓细胞中的自噬活性增高,与免疫印迹法检测结果相符。

临床上牙髓炎若未能及时有效控制会进一步发展为根尖周炎,甚至导致根尖区牙槽骨的吸收^[26],牙槽骨的吸收往往对根尖周炎的预后带来不良影响。研究显示自噬贯穿于骨组织及各类骨细胞发育成熟全过程,在骨类疾病中也能发现自噬现象^[27]。LC3在成骨细胞矿化的过程中表达增加,而抑制ATG7和ATG5的表达会降低成骨细胞的矿化能力,表明自噬在成骨细胞矿化的过程起促进作用^[28]。还有学者发现LC3基因表达和自噬介导的程序性细胞死亡在维持种植体周围矿化组织中骨样细胞的能量平衡及存活中发挥了重要作用^[29]。此次实验在对人根尖周炎组织的研究显示,LC3B在根尖周炎组织中的表达高于正常牙周膜组织,说明自噬活动在根尖周炎组织中增强,因此推测自噬可能与根尖区牙槽骨的破坏相关。

研究表明在由缺氧导致的破骨细胞分化中,miRNA-20a以ATG16L1为直接靶向基因,并与低氧诱导因子1 α 结合从而下调了LC3和破骨细胞分化标记物^[30]。异甘草素(ISL)可抑制RANKL介导的核因子 κ B的表达和核转运,从而抑制破骨细胞形成,同时阻碍LC3II和Beclin1的聚集进而下调自噬活性^[31]。此外,还有学者发现在脂肪干细胞的三维培养中,抑制自噬能导致脂肪干细胞的成骨分化和矿化受抑制^[32]。为研究LC3B在根尖周炎骨组织破坏中发挥的作用,未来需通过检测成骨破骨相关蛋白的表达、LC3B与骨改建相关蛋白的相互作用关系、及LC3B与核因子 κ B等相关信号通路的关联等进一步验证。

综上所述,研究初步揭示了自噬相关蛋白LC3B在人牙髓炎及根尖周炎中的表达情况,发现LC3B在炎症中的表达增高,由此提示LC3B可能与牙髓炎及根尖周炎的发生及发展过程相关。同时免疫印迹法和细胞免疫荧光检查均显示脂多糖致炎后的牙髓细胞内自噬活性增强,提示在牙髓炎及根尖周炎中自噬可能被调动以抵御机体受到的炎性刺激。但是LC3B介导的自噬在牙髓炎及根尖周炎进展中究竟如何发挥作用,必须通过进一步的实验来研究。

作者贡献: 课题设计为通讯作者; 实验实施为第一作者及共同第一作者、论文撰写为第一作者、共同第一作者及通讯作者。评估者为全部作者,均经过正规培训。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81300869)”及“辽宁省自然科学基金(20180550008)”资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案已经大连医科大学伦理委员会讨论批准。

知情同意问题: 经患者和相关家属知情同意,并签署知情同意书。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Coil J, Tam E, W aterfield JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibro-blasts stimulated with lipopolysaccharide and methylmercap tan. J Endodon. 2004; 30 (2): 88-91.
- [2] Spilka CJ. Pathways of dental infections. J Oral Surg. 1966;24(2): 111-124.
- [3] Tagger M, Massler M. Periapical tissue reactions after pulp exposure in rat molars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1975, 39(2):304-317.
- [4] Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. Dev Cell. 2008;15(3): 344-357.
- [5] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. Cell. 2008;132 (1): 27-42.
- [6] Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. Nat Immunol. 2009;10: 461-470.
- [7] Gomes LC, Dikic I. Autophagy in Antimicrobial Immunity . Molecular Cell. 2014;54: 224-233.
- [8] Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. Autophagy. 2016;12:245-260.
- [9] Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, NLRP3 inflammasome and auto-inflammatory/immune diseases. Clin Exp Rheumatol, 2016; 34:12-16.
- [10] Pei F, Lin H, Liu H, et al. Dual role of autophagy in lipopolysaccharide-induced pre-odontoblastic cells. J Dent Res. 2015;94:175-182.
- [11] Pei F, Wang HS, Chen Z, et al. Autophagy regulates odontoblast differentiation by suppressing NF-kappa B activation in an inflammatory environment. Cell Death Dis. 2016;7: e2122.
- [12] Wang HS, Pei F, Chen Z, et al. Increased apoptosis of inflamed odontoblasts is associated with CD47 loss. J Dent Res. 2016; 95(6): 697-703.
- [13] Kuznetsov SA, Gelfand VI. 18 kDa microtubule-associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP-1). FEBS Lett. 1987;212:145-148.
- [14] Ladoire S, Chaba K, Martins I, et al. Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. Autophagy. 2012;8:1175-1184.
- [15] Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. SF knockdown enhances apoptosis via downregulation of LC3B in human colon cancer cells. Biomed Res Int. 2013; 2013: 204973.
- [16] Satyavarapu EM, Das R, Mandal C, et al. Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells. Cell Death Dis. 2018; 9(10):934.
- [17] Zhao H, Yang M, Zhao J, et al. High expression of LC3B is associated with progression and poor outcome in triple-negative breast cancer. Med Oncol. 2013; 30(1):475.
- [18] Alvarez VE, Kosec G, Sant AC, et al. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in Trypanosoma cruzi. J Biol Chem. 2008; 283(6):3454-3464.
- [19] Li L, Zhu YQ, Jiang L, et al. Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. Int Endod J. 2012;45(12):1074-1079.
- [20] Couve E, Schmachtenberg O. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. J Dent Res. 2011; 90(4):523-528.
- [21] Yang JW, Zhu LX, Yuan GH, et al. Autophagy appears during the development of the mouse lower first molar. Histochem Cell Biol. 2013;139(1):109-118.
- [22] Bai H, Inoue J, Kawano T, et al. A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. Oncogene. 2012;31(40):4397-4408.
- [23] Kapoor V, Paliwal D, Baskar Singh S, et al. Deregulation of Beclin 1 in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. Biochem Biophys Res Commun. 2012;422(4):764-769.
- [24] Bullon P, Cordero MD, Quiles JL, et al. Autophagy in periodontitis patients and gingival fibroblasts: unraveling the link between chronic diseases and inflammation. BMC Med. 2012;17(10):122-133.
- [25] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. J Cell Sci. 2004; 117: 2805-2812.
- [26] Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20(3):340-349.
- [27] DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. Dev Cell. 2011; 21(5):966-974.
- [28] Tchertina EV, Maslova KA, Krylov MY, et al. Association of bone loss with the upregulation of survival-related genes and concomitant downregulation of Mammalian target of rapamycin and osteoblast differentiation-related genes in the peripheral blood of late postmenopausal osteoporotic women. J Osteoporos. 2015;2015: 802694.
- [29] Morishita A, Kumabe S, Nakatsuka M, et al. A histological study of mineralised tissue formation around implants with 3D culture of HMS0014 cells in Cellmatrix Type I-A collagen gel scaffold in vitro. Okajimas Folia Anat Jpn. 2014;91(3):57-71.
- [30] Sun KT, Chen MY, Tu MG, et al. MicroRNA-20a regulates autophagy related protein-ATG16L1 in hypoxia-induced osteoclast differentiation. Bone, 2015;73:145-153.
- [31] Liu S, Zhu L, Zhang J, et al. Antiosteoclastogenic activity of isoliquiritigenin via inhibition of NF-kB-dependent autophagic pathway. Biochem Pharmacol. 2016;106:82-93.
- [32] Li Y, Guo T, Zhang Z, et al. Autophagy Modulates Cell Mineralization on Fluorapatite-Modified Scaffolds. J Dent Res. 2016;95(6):650-656.