

miRNA-378a 过表达巨噬细胞株复合胶原蛋白海绵：抗炎及促进组织修复

王思凡^{1,2}, 何惠宇^{1,2}, 杨泉^{1,3}, 韩祥祯^{1,2}<https://doi.org/10.12307/2025.263>

投稿日期: 2023-12-02

采用日期: 2024-01-20

修回日期: 2024-04-04

在线日期: 2024-04-12

中图分类号:

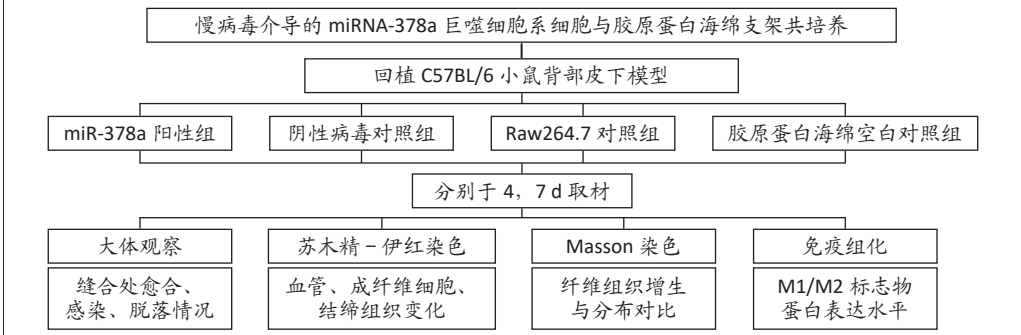
R459.9; R318; R392

文章编号:

2095-4344(2025)04-00789-11

文献标识码: A

文章快速阅读: miRNA-378a 促进巨噬细胞 M2 极化对免疫调节和抗炎作用的影响



文题释义:

miRNA-378a: miRNA是含有1个茎环结构的非编码小型RNA分子, 可通过与靶基因3'UTR不完全的碱基互补配导致信使RNA降解或编码蛋白抑制, 在细胞增殖、分化、凋亡和侵袭等过程中发挥重要调控作用。

巨噬细胞极化: 巨噬细胞极化分型M1(Classically activated type 1)/M2(Alternatively activated type 2)表型是巨噬细胞极化的两个极端, 可共同调节其所处内环境的稳态。

摘要

背景: 巨噬细胞M1/M2极化方向的调节在组织工程应用中尤为关键, 及时调控可最大程度地减少促炎、促进抗炎或组织愈合反应。

目的: 将慢病毒介导的miRNA-378a过表达巨噬细胞株复合胶原蛋白海绵回植入动物模型, 据此检测免疫调节在体内环境中的相关表达水平等组织修复相关的指标, 进一步阐明在体内环境中miRNA-378a是否促进巨噬细胞M2极化及其对免疫调节和组织修复的作用。

方法: 将慢病毒介导的miRNA-378a过表达巨噬细胞株、阴性对照病毒巨噬细胞株扩增、筛选, 复苏培养巨噬细胞株后与胶原蛋白海绵共培养以此构成复合体, 具体分组如下: ①阳性组: 过表达miRNA-378a巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ②阴性组: 阴性对照病毒介导的miRNA-378a巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ③对照组: 巨噬细胞-胶原蛋白海绵; ④空白对照组: 胶原蛋白海绵。通过免疫荧光及扫描电镜观察各组细胞密度、表型、黏附情况, 后回植入小鼠背部皮下模型, 分别于造模后4, 7 d处死小鼠, 通过大体观察、苏木精-伊红染色、Masson染色、免疫组化分析慢病毒介导的miRNA-378a过表达巨噬细胞胶原蛋白海绵复合体中巨噬细胞极化的方向及其对机体免疫调控、组织修复的作用。

结果与结论: ①免疫荧光镜下观察各组巨噬细胞株确实与胶原蛋白海绵形成复合体; ②扫描电镜下慢病毒介导的miRNA-378a巨噬细胞(阳性组)较其他分组细胞密度增加, 细胞出现球形、椭圆形及多边形分化, 具有更多的伪足; ③大体观察下总体7 d愈合好于4 d, 慢病毒介导的miRNA-378a过表达巨噬细胞(阳性组)无论4, 7 d愈合均好于其他分组; ④苏木精-伊红染色、Masson染色下, 慢病毒介导的miRNA-378a过表达巨噬细胞(阳性组)具有较多量的纤维细胞、毛细血管、成纤维细胞以及胶原纤维增生; ⑤免疫组化显示, 慢病毒介导的miRNA-378a过表达巨噬细胞(阳性组)无论4, 7 d M2极化细胞阳性率均大于其他分组; 对照组及阴性组巨噬细胞无论4, 7 d M2极化细胞阳性率均大于空白对照组, 而对照组及阴性组之间无统计学差异; 阳性组、阴性组、对照组无论4, 7 d染色细胞数量均大于空白对照组, 且阳性组 > 阴性组 ≈ 对照组 > 空白对照组; ⑥提示在体内环境中miRNA-378a过表达巨噬细胞具有较多量的纤维细胞、毛细血管、成纤维细胞以及胶原纤维增生, 对组织修复起到了正向作用, 并且能促进巨噬细胞向M2型极化并抑制M1型极化, 从而有助于减少机体炎症反应。

关键词: miRNA-378a; 慢病毒转染; 巨噬细胞极化; 免疫调节; 组织工程

miRNA-378a overexpression of macrophage cell line composite collagen sponge: anti-inflammation and tissue repair promotion

Wang Sifan^{1,2}, He Huiyu^{1,2}, Yang Quan^{1,3}, Han Xiangzhen^{1,2}

¹Department of Stomatology of First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Stomatological Hospital), Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Institute of Stomatology of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Urumqi Stomatological Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

¹新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)口腔修复种植科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; ²新疆维吾尔自治区口腔医学研究所, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; ³新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市口腔医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

第一作者: 王思凡, 男, 1996年生, 新疆维吾尔自治区昌吉州玛纳斯县人, 汉族, 在读硕士, 主要从事口腔修复学及组织工程基础研究。

通讯作者: 韩祥祯, 主治医师, 新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)口腔修复科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; 新疆维吾尔自治区口腔医学研究所, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

<https://orcid.org/0009-0000-6953-5191> (王思凡)

基金资助: 2021年新疆维吾尔自治区自然科学基金计划青年项目(2021D01C337), 项目负责人: 韩祥祯

引用本文: 王思凡, 何惠宇, 杨泉, 韩祥祯. miRNA-378a 过表达巨噬细胞株复合胶原蛋白海绵: 抗炎及促进组织修复[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(4):789-799.



Wang Sifan, Master candidate, Department of Stomatology of First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Stomatological Hospital), Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Institute of Stomatology of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Han Xiangzhen, Attending physician, Department of Stomatology of First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University (Affiliated Stomatological Hospital), Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Institute of Stomatology of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: The regulation of M1/M2 polarization direction of macrophages is particularly critical in tissue engineering applications, and timely regulation can minimize proinflammatory, anti-inflammatory, or tissue healing responses.

OBJECTIVE: To implant lentivirus-mediated miRNA-378a macrophage strain complex collagen to detect the expression level of immune regulation in the *in vivo* environment, and further clarify the influence of miRNA-378a in promoting macrophage M2 polarization in immune regulation and tissue repair in the *in vivo* environment.

METHODS: Lentivirus-mediated miRNA-378a overexpressing macrophage cell lines and negative control virus macrophage lines were amplified and screened, and the macrophage lines were recovered and cultured together with collagen sponge to form a composite scaffold, which was divided into the following groups: (1) Positive group: miRNA-378a overexpressing macrophage-collagen sponge composite; (2) negative group: negative control of virus-mediated miRNA-378a macrophage-collagen sponge composite; (3) control group: macrophage-collagen sponge; (4) blank control group: collagen sponge. The cell density, phenotype, and adhesion of each group were observed by immunofluorescence and scanning electron microscopy. The cells were implanted into the subcutaneous model of the back of mice, and the mice were sacrificed 4 and 7 days after modeling. The direction of macrophage polarization in the collagen sponge composite of macrophages with miRNA-378a overexpression mediated by lentivirus and its effect on immune regulation and tissue repair were analyzed by gross observation, hematoxylin-eosin staining, MASSON staining, and immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Under immunofluorescence microscopy, the macrophage cell lines in each group were observed to form a composite scaffold with the collagen sponge. (2) Under scanning electron microscope, lentivirus-mediated miRNA-378a macrophages in the positive group proliferated in cell density, had spherical, elliptic and polygonal differentiation, and had more pseudopodia than other groups. (3) Under general observation, the overall 7-day healing was better than that at 4 days. Lentivirus-mediated miRNA-378a macrophages in the positive group healed better than other groups regardless of 4 and 7 days. (4) Lentivirus-mediated miRNA-378a macrophages in the positive group under hematoxylin-eosin staining and MASSON staining had more amounts of fibrocytes, capillaries, fibroblasts, and collagen fiber hyperplasia. (5) Immunohistochemistry showed that lentivirus-mediated miRNA-378a macrophages in the positive group were more positive in 4- and 7-day M2 polarized cells than in other groups. The macrophages of the control and negative groups in 4- and 7-day M2 polarized cells were greater than that of the blank control group. There was no statistical difference between the control group and the negative group. The number of stained cells in the positive, negative, and control groups regardless of 4 and 7 days was higher than that in the blank control group, and the positive group > negative group ≈ control group > blank control group. (6) It is concluded that macrophages with miRNA-378a overexpression have a large amount of fibroblasts, capillaries, fibroblasts, and collagen fiber hyperplasia *in vivo*, which has a positive effect on tissue repair, and can promote the polarization of macrophages towards M2 type and inhibit the polarization of M1 type, thus contributing to reducing the inflammatory response of the body.

Key words: miRNA-378a; lentiviral transfection; macrophage polarization; immunomodulation; tissue engineering

Funding: Youth Program of Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region in 2021, No. 2021D01C337 (to HXZ)

How to cite this article: WANG SF, HE HY, YANG Q, HAN XZ. miRNA-378a overexpression of macrophage cell line composite collagen sponge: anti-inflammation and tissue repair promotion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(4):789-799.

0 引言 Introduction

骨组织的再生与修复重建一直是医学领域的重大课题，也是世界性难题，全球范围内的骨疾病及创伤的发病率呈急剧上升趋势^[1-2]。组织工程骨始于近30年前，侧重于替代治疗方案，这些方案理想地解决了当前临床使用的治疗方法中出现的问题，即供体部位发病率、有限的可获得性、免疫排斥和病原体转移^[3]。最佳的组织工程骨依赖于3个基本组成^[4]：优良的种子细胞来源、生长和分化因子以及合适的支架以支持基于细胞的组织再生。

巨噬细胞为组织工程领域中常用的种子细胞，属免疫细胞，有多种功能，是研究细胞吞噬、细胞免疫和分子免疫学的重要对象^[5]。极化后的巨噬细胞存在多种亚型^[6]，M1(Classically activated type 1)/M2(Alternatively activated type 2)表型是巨噬细胞极化的两个极端^[7]，可共同调节其所处内环境的稳态。免疫调节方面，M1型具有很强的杀菌、杀死肿瘤细胞的功能，M2型抑制了T细胞的增殖和活化，从而调节Th2型免疫应答，有助于组织重塑和伤口愈合。组织修复方面，研究表明M1可以分泌血管内皮生长因子来促进早期血管芽的形成，而M2可以分泌血小板衍生生长因子BB和其他参与血管重塑的因子，使它

们更加稳定和成熟。

微小RNA(microRNA, miRNA)是含有1个茎环结构的非编码小型RNA分子，可通过与靶基因3'UTR不完全的碱基互补配导致信使RNA降解或编码蛋白抑制，在细胞增殖、分化、凋亡和侵袭等过程中发挥重要调控作用；也可作为多种疾病进展的生物学标志物和预防治疗的靶标，是目前基因疗法的研究热点^[8-12]。利用miRNA调节干细胞的功能和分化是再生医学一个极具吸引力的治疗模式^[13-16]。已有研究发现，miR-378a可能参与巨噬细胞的极化^[17-18]。现此项目前期体外细胞实验已将miRNA-378a慢病毒载体转染至巨噬细胞内并构建了稳定的细胞系^[19]，通过检测内源性miRNA-378a证实了巨噬细胞M1/M2双向极化均与miRNA-378a相关。使用ELISA和qRT-PCR方法分别检测得出：促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6、白细胞介素 1β 、一氧化氮合酶等M1型巨噬细胞相关产物表达有所下调；抗炎因子CD206、白细胞介素10、精氨酸酶1等M2型巨噬细胞相关产物表达有所上调。

因此，前期实验结果已经表明，miR-378a参与了巨噬细胞的极化，并且可以促进巨噬细胞M2极化且抑制M1极化。综上所述，此次实验拟将慢病毒介导的miRNA-378a

巨噬细胞株复合胶原蛋白海绵回植入动物模型, 据此检测免疫调节、促进组织修复相关指标在体内环境中的表达水平, 进一步阐明 miRNA-378a 促进巨噬细胞极化的方向和其对免疫调节、组织修复的相关影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 将慢病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞株复合胶原蛋白海绵回植入动物模型实验。免疫组化结果数据为定量资料, 样本为 4 组, 若满足正态性及方差齐采用 One-way ANOVA, 若满足正态性不满足方差齐采用 Welch ANOVA; 若不满足正态性采用 Kruskal wall's test。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 12 月至 2023 年 8 月在新疆医科大学第一附属医院科技楼干细胞研究实验室及动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 40 只 SPF 级 8 周龄 C57BL/6N 雌性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证: 北京百善 SCXK(京)2021-0006; 实验动物使用许可证: 北京 SYXK(京)2017-0033。此次实验经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会批准(批准号: IACUC-2021902-02), 实验过程中对动物的所有操作均严格参照《实验动物的护理和使用指南》进行。

实验前所有小鼠自由摄食、饮水, 在相同条件下饲养, 保持室温 (20±2) °C, 相对湿度 40%–60%, 每 3 d 更换一次鼠盒。

1.3.2 试剂与仪器 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); D-MEM 基础培养液、PBS(Hyclone, 美国); 胰酶、胎牛血清(Gibco, 美国); CD68、CD206、CCR-7 抗体(BioLegend, 美国); 苏木精染液、封闭用山羊血清(北京中杉金桥公司); 伊红染液(北京 Solaibio 公司); Masson 染色试剂盒(北 Solaibio 公司); 胶原蛋白海绵(北京湃生生物科技有限公司)。LV-rno-miR-378a 慢病毒载体、阴性对照病毒(ON137, hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin, 上海吉凯基因有限公司); 电子天平(BS124S, 赛多利斯科学仪器公司, 北京); 超净工作台(苏州净化); 细胞培养箱(Thermo, 美国); 扫描电子显微镜(S-4800, Hitachi, 日本); 荧光倒置显微镜(LASAF-CIP-HWS3LEICA, 德国 Leica 公司); 切片仪、脱水机、包埋机(德国 Leica 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 各组细胞株的制备 将巨噬细胞株与前体外细胞实验制备得到的慢病毒介导的 miR-378a 巨噬细胞株同步复苏后^[19], 用含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 DMEM 培养基培养, 每 2 d 换液 1 次。将细胞置于含体积分数 5% CO₂ 饱和湿度的 37 °C 条件下培养, 待细胞汇

合度为 80% 左右时传代, 取 3–5 代对数生长期细胞用于后续实验。并分组如下: ①阳性组: 过表达 miRNA-378a 巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ②阴性组: 阴性对照病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ③对照组: 巨噬细胞-胶原蛋白海绵; ④空白对照组: 胶原蛋白海绵。

1.4.2 荧光倒置显微镜、扫描电镜观察细胞与支架的相容性 将无菌胶原蛋白海绵裁成 3 mm(直径)×2 mm(高)大小, 放入 24 孔板内, 培养液平衡后待用。调整对照组、阳性组及阴性组细胞浓度为 1×10⁸ L⁻¹, 按照细胞悬液反复滴加的方法, 将 0.1 mL 混合悬液均匀分布于胶原蛋白海绵上, 将细胞-支架复合物置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 恒温箱中静置 4 h, 加入 D-MEM 完全培养基继续培养, 每 2 d 换液 1 次。荧光倒置显微镜、扫描电镜观察细胞与支架的相容性。

1.4.3 小鼠背部动物模型制备

(1) 动物选取及分组: 选取 40 只雌性 8 周龄的 C57BL/6 小鼠, 体质量控制在 (20±5) g, 耳标编号, 计算机完全随机分配分入 4 组: ①阳性组: 植入过表达 miRNA-378a 巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ②阴性组: 植入阴性对照病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ③对照组: 植入巨噬细胞-胶原蛋白海绵复合体; ④空白对照组: 植入胶原蛋白海绵。各组初始细胞浓度为 1×10⁸ L⁻¹, 共培养 7 d 镜下观察细胞汇合度达 80%, 细胞胶原蛋白海绵复合体 [3 mm(直径)×2 mm(高)] 分别回植入各组小鼠背部皮下。每组分配 10 只 C57BL/6 小鼠, 按时间周期每组再分为 4, 7 d, 每组每个时间节点随机分配各 5 只小鼠。

(2) 背部模型: 实验处理前 1 d 对小鼠进行断食断水处理过夜, 配制麻药(氯胺酮 1 支+安定 1 支+阿托品半支混合后稀至 10 mL) 备用; 腹腔注射麻药 6 mL/kg, 待其四肢松弛且呼吸平稳后进行造模。术区备皮, 俯卧位固定 C57BL/6 小鼠, 碘伏消毒术区, 背部正中做一 1 cm 切口, 钝性分离皮下组织形成一盲袋以供植入, 分别在盲袋内放置各组复合支架。缝合皮肤, 术后常规护理, 注意保暖(图 1)。分别于术后 4, 7 d 两个时间段 CO₂ 安乐处死小鼠收集样本, 40 g/L 多聚甲醛溶液保存备用。

1.4.4 大体观察 于造模术后 4, 7 d 处死小鼠后观察各组皮肤切口处愈合情况, 检查是否出现材料脱落、感染坏死和炎症反应等, 并用相片记录进行比较。

1.4.5 切片制备 造模术后 4, 7 d 两个时间段 CO₂ 安乐处死各组小鼠收集切口处表皮、皮下组织及植入物组成的多层复合物, 经 40 g/L 多聚甲醛固定 48 h 后并在清水中浸泡 24 h 再梯度乙醇脱水。石蜡 I 溶液、II、III 溶液中分别浸泡, 在石蜡包埋模具中用石蜡溶液包裹, 室温冷却

组织工程实验动物造模过程中的相关问题	
造模目的	引起免疫反应、组织缺损
选择动物的条件	与 Raw264.7 同小鼠种属, 常规用于免疫学实验
模型与所研究疾病的关系	小鼠背部皮下模型, 引起炎症反应、表皮及皮下组织缺损, 以此研究免疫调节和组织修复
动物来源及品系	C57BL/6N 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,
造模技术描述	背部脱毛备皮, 正中 1 cm 切口, 钝性分离皮下组织, 各组细胞材料复合体回植, 缝合皮肤
动物数量及分组方法	40 只小鼠耳标编号, 计算机完全随机分配分入 4 组, 每组分 10 只, 每组再分为 4, 7 d 两个时间节点, 每个时间点 5 只
造模成功评价指标	小鼠未提前死亡, 缝合线无脱落, 材料未从缝合创脱落
造模后观察指标	缝合创愈合情况, 有无明显炎症反应
造模后动物处理	CO ₂ 安乐处死, 收集样本, 40 g/L 多聚甲醛溶液保存备用
伦理委员会批准	此次实验经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会批准 (批准号: IACUC-2021902-02)

凝固成块, 将石蜡块修整成平整的切面, 用石蜡切片机切成厚度为 5 μm 的切片。用载玻片捞开展平的切片, 放在烘板上蒸发水分, 以待进行苏木精-伊红染色、Masson 染色及免疫组化检测。

1.4.6 苏木精-伊红染色 苏木精染色, 蒸馏水清洗 3 次, 置于盐酸乙醇分化液中分化, 蒸馏水清洗 3 次, 接下来再用伊红染液染色, 蒸馏水清洗 3 次。将切片依次浸泡于体积分数 80% 乙醇、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、无水乙醇、二甲苯 I、II 中透明。待二甲苯挥发后, 使用中性树脂胶封固, 等待干燥后于显微镜下观察并进行拍照留存。

1.4.7 Masson 染色 将 Weigert A1 液与 Weigert A2 液等量混合配置于 EP 管内混匀, 将新鲜配制的苏木精工作液滴加于切片上染色, 蒸馏水冲洗, 乙醇分化液分化, 再用蒸馏水冲洗。使用蓝化液返蓝, 蒸馏水冲洗。丽春红品红染色, 使用弱酸工作液清洗, 然后滴加磷钼酸溶液分化, 再用弱酸工作液清洗。滴加苯胺蓝染色液染色, 用弱酸工作液快速洗去工作液。脱水、透明、封固观察。

1.4.8 免疫组化观察 体积分数 3% 过氧化氢加于切片, 蒸馏水冲洗, 再用 PBS 冲洗 3 遍, 0.4% 胃蛋白酶修复抗原, 将切片放入湿盒中, 在 37 °C 温箱孵育, 拿出冷却, 蒸馏水清洗 1 次, PBS 清洗 3 次, 擦干片子, 使用山羊血清滴加于切片上, 室温封闭。稀释一抗: 选用 CD68、CCR-7、CD206 抗体进行检测 (1 : 200), 均按照说明书要求比例稀释备用。一抗孵育及二抗孵育 (1 : 200), DAB 显色, 复染后将切片放入盐酸乙醇分化液中, 自来水中终止, 然后放入 PBS 中返蓝, 自来水清洗 1 次。脱水、透明、封固观察。

1.5 主要观察指标 细胞与胶原蛋白海绵复合体部分共培养 7 d 后行荧光显微镜、扫描电镜观察细胞密度、表型、黏附情况。动物检测实验分别于造模后 4, 7 d 行大体观察、

苏木精-伊红染色、Masson 染色观察愈合情况、纤维增生、组织和细胞情况, 免疫组化和定量分析 CD68(泛巨噬细胞标记物)、CCR7(M1 型巨噬细胞标记物)、CD206(M2 型巨噬细胞标记物) 的细胞阳性率。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.5.1 和 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料使用 Shapiro-Wilk 检验数据是否具有正态性, 符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验; 不符合者则采用非参数检验 (Kruskal-Wallis test 秩和检验)。P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经新疆医科大学统计学专家审核。

2 结果 Results

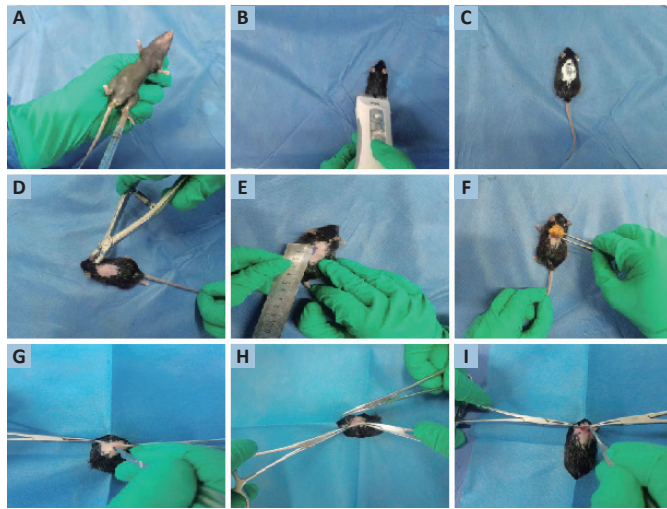
2.1 实验动物数量分析 40 只小鼠耳标编号, 随机分入 4 组, 每组 10 只; 每组再分为 4, 7 d 两个时间节点, 每个时间节点各 5 只, 实验过程中未出现动物死亡情况。

2.2 慢病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞株的制备 荧光显微镜下原 miRNA-378a 巨噬细胞株复苏后荧光及细胞汇合度较低, 经筛选扩增后荧光及细胞汇合度大幅度提升, 见图 2。荧光显微镜下见扩增筛选后 miRNA-378a 巨噬细胞株附着至胶原蛋白海绵内形成复合支架, 见图 3。

空白对照组 (胶原蛋白海绵) 可见胶原蛋白海绵具有良好的三维空间结构以供细胞株附着、增殖; 对照组 (巨噬细胞组) 可见三维空间空隙中有细胞株附着, 形态基本为球形, 且密度及伪足较少; 阴性组 (阴性对照病毒) 空隙中有细胞株附着, 形态仍基本为球形, 但密度及伪足较对照组有所增加; 阳性组 (过表达 miRNA-378a) 空隙中有细胞株附着, 形态出现球形、椭圆形及多边形分化, 且密度及伪足较对照组、阴性组有所增加。见图 4。

2.3 大体观察结果 各组小鼠造模术后大体观察, 4 d 时 4 组术区皆有较明显的缝合创, 阳性组愈合较为良好, 阴性组与对照组次之且差异不大, 空白对照组预后相较而言最差。7 d 时 4 组术区缝合创已基本痊愈, 阳性组基本上已经完全愈合, 阴性组、对照组、空白对照组此时未完全愈合且 3 组间差距不大。见图 5。

2.4 苏木精-伊红染色结果 各组 4, 7 d 苏木精-伊红染色观察, 表皮的局灶性坏死伴炎性渗出物 (深红色箭头); 皮下可见嗜酸性均质物 (黑色箭头); 周围结缔组织增生包裹、成纤维细胞 (黄色箭头) 并伴有粒细胞浸润 (蓝色箭头); 新生血管淤血 (红色箭头); 结缔组织排列疏松和水肿现象 (橙色箭头)。其中表皮小范围增厚、结缔组织增生、新生血管及成纤维细胞数量等现象 7 d 较 4 d 显著, 阳性组 > 阴性组 ≈ 对照组 > 空白对照组; 表皮的局灶性坏死伴炎性渗出物、嗜酸性均质物、粒细胞弥散性浸润、结缔组织排列疏松和水肿等现象 4 d 较 7 d 显著, 阳性组 <



图注：图 A 为腹腔注射，B 为备皮，C 为脱毛，D 为打耳标，E 为 1 cm 手术切口划线，F 为消毒，G 为洞巾下切开，H 为复合支架回植，I 为缝合。
图 1 | 小鼠背部皮下模型制备

Figure 1 | Mouse subcutaneous back model preparation

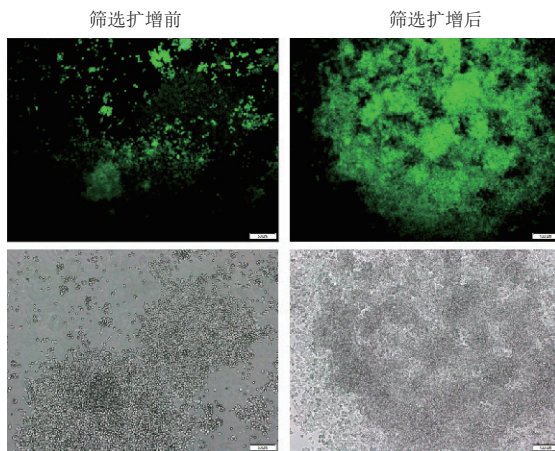


图 2 | 慢病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞株复苏培养与扩增筛选 (光镜与荧光显微镜) (Bars=100 μm)
Figure 2 | Lentivirus-mediated resuscitation culture and amplification screening of miRNA-378a macrophage cell lines (light microscopy and fluorescence microscopy) (scale bars=100 μm)

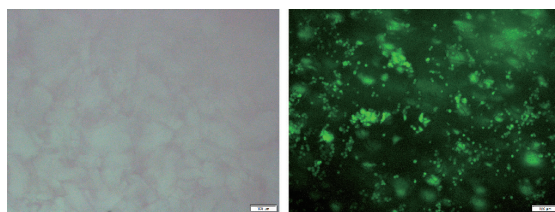


图 3 | 慢病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞株与明胶海绵复合 (Bars=100 μm)
Figure 3 | Lentivirus-mediated miRNA-378a macrophage cell line complexed with a gelatin sponge (scale bars=100 μm)

阴性组 ≈ 对照组 < 空白对照组。各组 4, 7 d Masson 染色观察结果与苏木精-伊红染色结果一致，胶原纤维增生面积 7 d 较 4 d 占比更大，且阳性组 > 阴性组 ≈ 对照组 > 空白对照组；4 d 时阳性组 > 阴性组 ≈ 对照组 > 空白对照组趋势不变，但差异较 7 d 有所减小。见图 6, 7。

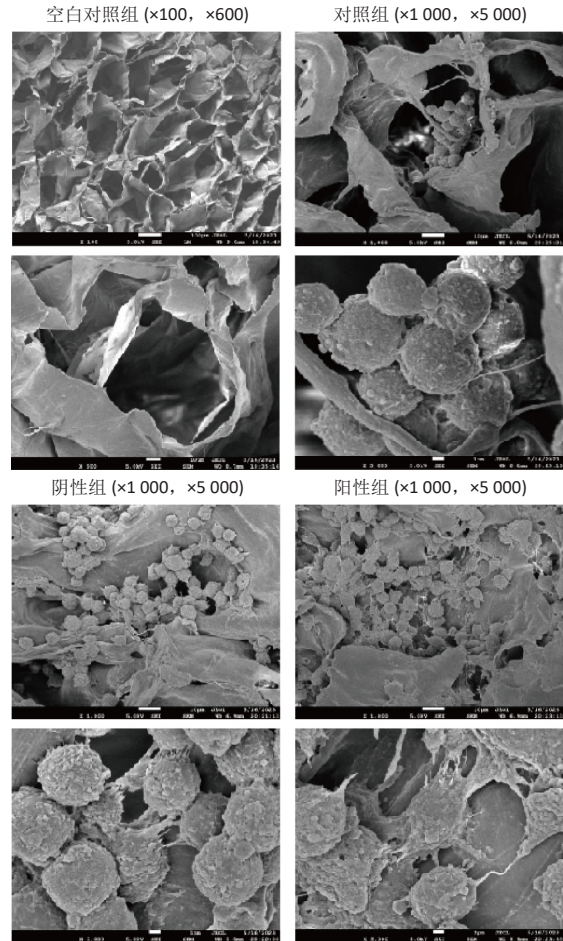


图 4 | 各组样品表面扫描电镜观察结果
Figure 4 | Surface scanning electron microscopy observation results of samples of each group

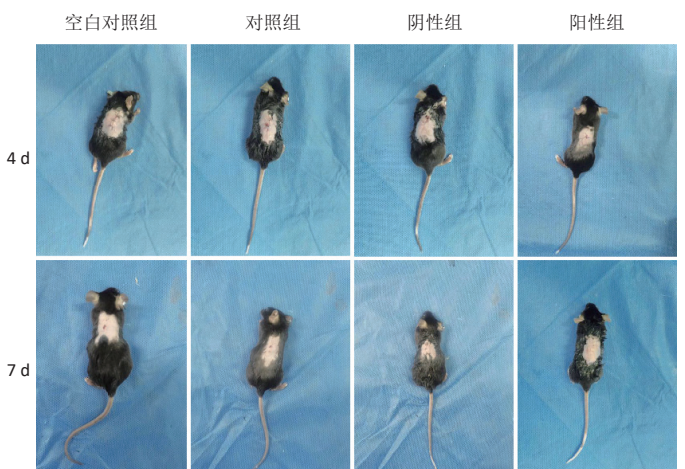
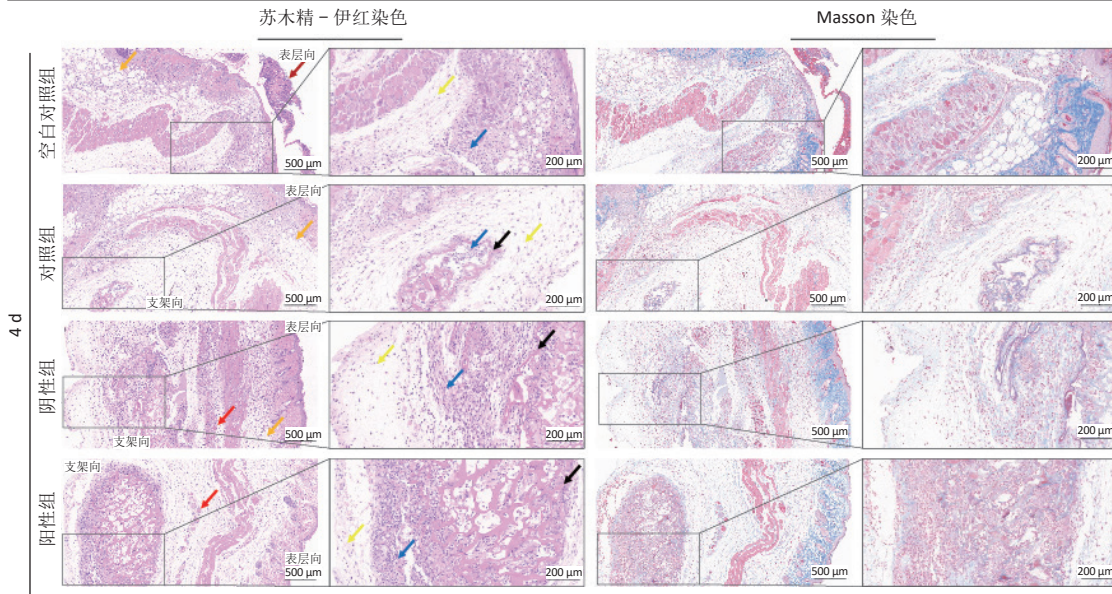


图 5 | 各组小鼠造模术后 4, 7 d 大体观察结果
Figure 5 | Macroscopic observation results of mice in each group after modeling surgery at 4 and 7 days

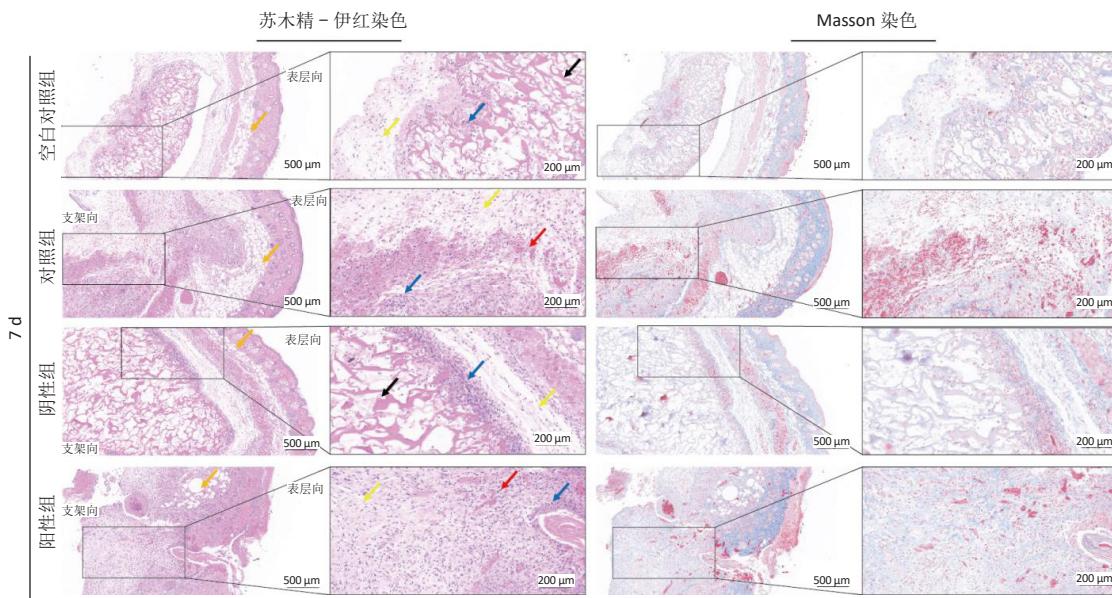
2.5 免疫组化结果 从图片可以直观地看到 4 d 时各组各指标阳性细胞数量均多于 7 d，且无论 4 d 还是 7 d 对照组、阴性组、阳性组的阳性细胞数量均多于空白对照组。细胞数、染色细胞数及棕染强度上可见阳性组 > 阴性组 ≈ 对照组 > 空白对照组，见图 8, 9。



图注：苏木精-伊红染色结果显示，表皮的局灶性坏死伴炎性渗出物（深红色箭头）；皮下可见嗜酸性均质物（黑色箭头）；周围结缔组织增生包裹、成纤维细胞（黄色箭头）并伴有粒细胞浸润（蓝色箭头）；新生血管淤血（红色箭头）；结缔组织排列疏松和水肿现象（橙色箭头）。

图6 | 各组造模术后4 d 苏木精-伊红及 Masson 染色观察

Figure 6 | Observation of hematoxylin-eosin staining and Masson staining 4 days after modeling in each group



图注：苏木精-伊红染色结果显示，表皮的局灶性坏死伴炎性渗出物（深红色箭头）；皮下可见嗜酸性均质物（黑色箭头）；周围结缔组织增生包裹、成纤维细胞（黄色箭头）并伴有粒细胞浸润（蓝色箭头）；新生血管淤血（红色箭头）；结缔组织排列疏松和水肿现象（橙色箭头）。

图7 | 各组造模术后7 d 苏木精-伊红及 Masson 染色观察

Figure 7 | Observation of hematoxylin-eosin staining and Masson staining 7 days after modeling in each group

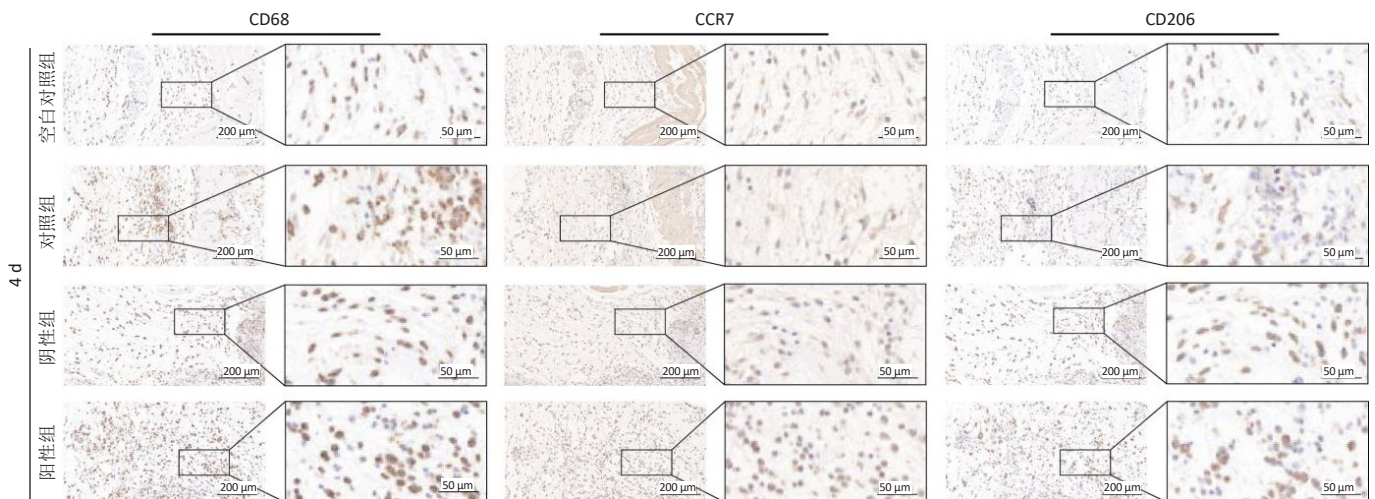


图8 | 各组造模术后4 d 免疫组化结果

Figure 8 | Immunohistochemical results 4 days after postoperative modeling in each group

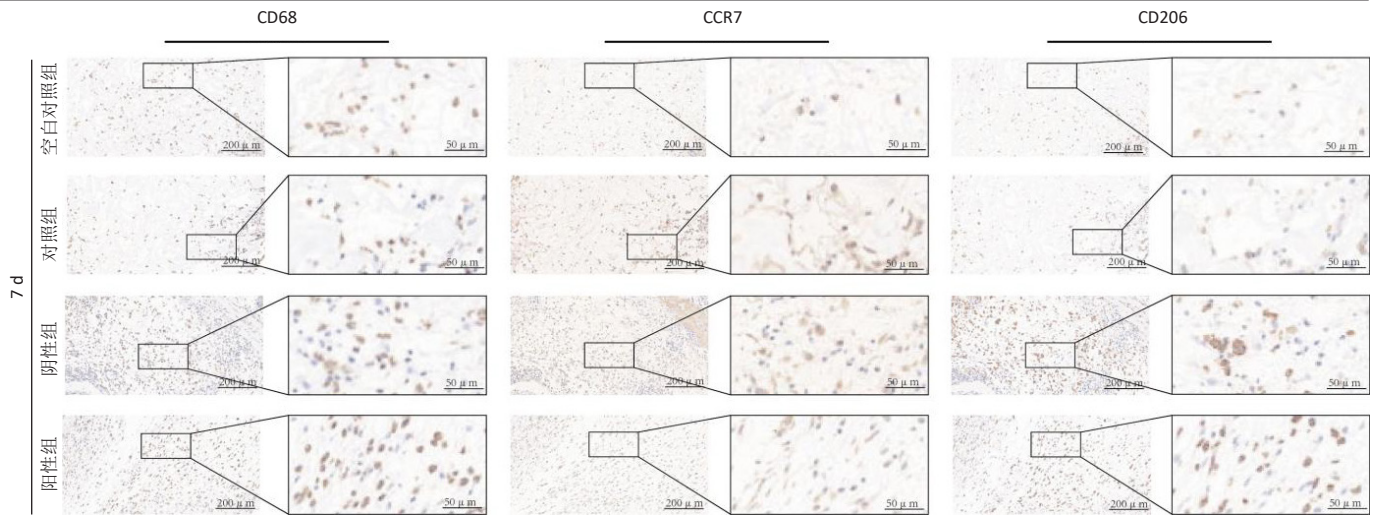


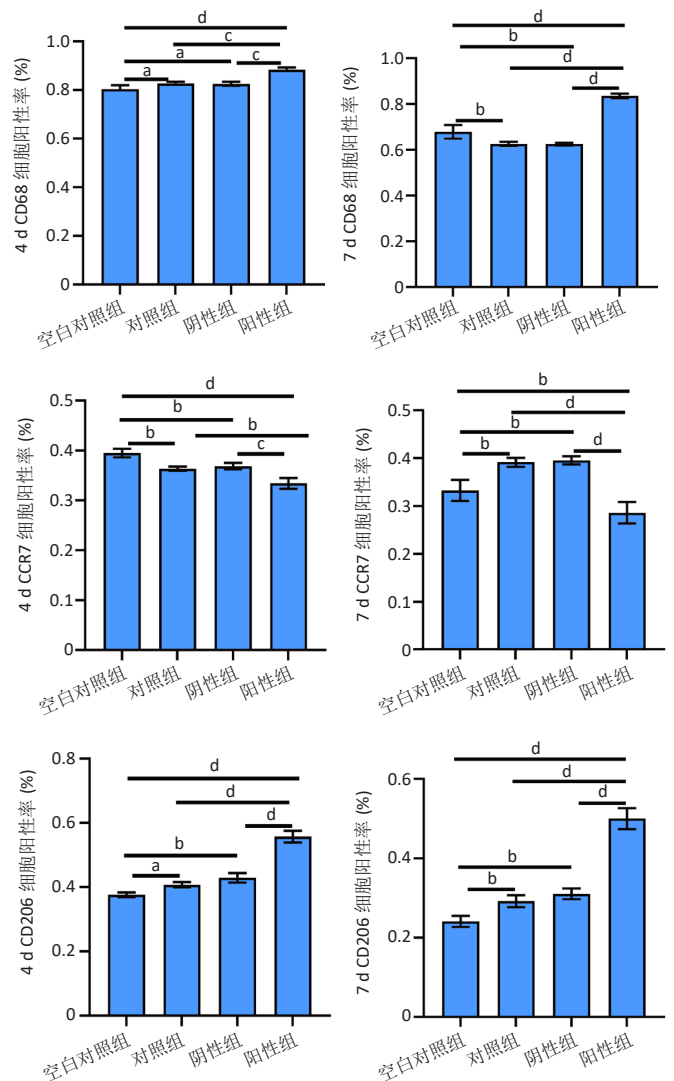
图9 | 各组造模术后7 d 免疫组化结果
Figure 9 | Immunohistochemical results 7 days after postoperative modeling in each group

定量分析结果显示，阳性组的阳性细胞率无论在4, 7 d时间节点上还是在CD68、CCR7、CD206指标上与空白对照组、对照组、阴性组相比差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)；空白对照组的阳性细胞率在4, 7 d及CD68、CCR7、CD206上与阳性组、对照组、阴性组相比差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)；而对照组的阳性细胞率在所有时间节点和指标上与阴性组相比均无统计学差异 ($P > 0.05$)。通过统计图可发现4, 7 d时阳性组的CD68(泛巨噬细胞标记物)、CD206(M2型巨噬细胞标记物)阳性细胞率为4组最高，而CCR7(M1型巨噬细胞标记物)为最低。见图10。

3 讨论 Discussion

近年来，组织工程在口腔颌面部重建中的应用受到了学者的广泛关注。组织工程最早由LANGER和VACANTI于20世纪80年代末提出并在《Science》杂志阐述相关理念，旨在通过开发恢复、维持或改善组织功能的生物替代品来修复缺损组织，重建生理功能^[20]。种子细胞、支架、生长因子为组织工程的3个基本要素，其中多孔支架在组织工程领域内应用最为广泛，在口腔颌面软组织缺损修复方面也取得了长足发展^[21-25]。例如近年来的部分热点研究方向，牙周和种植体周围重建^[26]，血管化脂肪组织工程策略^[27]，牙齿组织工程的牙本质、牙骨质再生等^[28-29]。

目前与组织工程骨免疫调节方面相关研究仍需大量探索。巨噬细胞是免疫系统的重要效应细胞，参与了一系列生物过程，包括免疫、炎症反应和稳态，其具有显著的可塑性以便适应组织中各种微环境变化^[30]。巨噬细胞广泛存在于体内，以维持体内稳态和抵抗病原体入侵。巨噬细胞具有显著的可塑性，表现在对组织中遭遇的微环



图注：^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.0001$ 。
图10 | 各组造模术后4, 7 d 免疫组化细胞阳性率定量分析
Figure 10 | Quantitative analysis of positive rate of immunohistochemical cells 4 and 7 days after modeling in each group

境刺激和信号变化做出功能性反应, 然后极化为不同的巨噬细胞表型, 以适应变化的组织微环境, 如经典的巨噬细胞 M1 型和 M2 型^[31]。随着研究的深入, 其也被细分为更多的亚类, 如有学者将 M2 型巨噬细胞细分为 M2a/M2b/M2c/M2d^[32]。当组织受损时炎症性单核细胞响应刺激从循环中迁移至组织, 然后分化为巨噬细胞。细胞因子, 如 γ 干扰素、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子 α 、脂多糖等常作为 M1 型表型的激活剂, 而 TH2 细胞分泌白细胞介素 4 和白细胞介素 13, 常驱动巨噬细胞向 M2 表型极化^[33]。巨噬细胞极化过程是复杂而连续的, 常说的巨噬细胞极化通常指某个时间点巨噬细胞的状态, 如伤口的早期阶段巨噬细胞常表现为促炎的 M1 型, 而在愈合阶段转变为抗炎的 M2 型^[34]。总之, 在整个愈合过程中合理及时地促进巨噬细胞 M1/M2 极化, 以最大程度地减少促炎、促进抗炎或组织愈合反应似乎是组织工程应用的关键^[35-38]。

miRNAs 是一类长度为 17-22 个核苷酸的非编码 RNA, 在转录后基因调控中具有关键作用, 这些主调控因子本身在转录和转录后都受到调控^[39]。一个 miRNA 可以通过与广泛的靶基因相互作用来指导整个细胞通路, 这一特性使得 miRNAs 成为一种非常有潜力的治疗工具^[40]。越来越多的证据表明, miRNAs 在转录后水平可作为对各种感染性微生物免疫应答的调节因子^[41]。最近的研究表明, miRNAs 可以作为关键的参与者来调控巨噬细胞的 M2 型极化^[42]。已有研究发现, miR-378 可能在巨噬细胞 M2 型极化的过程中起重要作用。许多研究已经确定了 M1 和 M2 极化的人和小鼠巨噬细胞中的 miRNAs 表达谱, 并且证实了一些 miRNAs 参与巨噬细胞极化的调节^[43-44]。

课题组前期实验证实, 在体外实验中通过慢病毒转染方式将 miRNA-378a 传递至小鼠腹腔巨噬细胞系 (RAW264.7), 在激光共聚焦显微镜观察下, 发现细胞株可长期稳定表达^[49]。实验结果表明, miRNA-378a 已成功传递到细胞之中, 通过 PCR 检测向 M1/M2 诱导的巨噬细胞后发现细胞内的内源性 miRNA-378a 均有所上调, 证明 miRNA-378a 确实参与巨噬细胞的极化, 并且通过再次诱导检测得知促炎因子降低及抗炎因子上调。因此, 得知 miRNA-378a 可能在免疫调节过程中促巨噬细胞 M2 表型的极化。结合 miRNA-378a 在免疫调节中的预测, 作者推测 miRNA-378a 对体内环境中的组织修复及巨噬细胞的极化作用相关, 这需要进一步实验研究分析。故而, 此次实验拟将慢病毒诱导的 miRNA-378a 巨噬细胞株复合胶原蛋白海绵回植入动物模型, 据此检测促进组织修复及免疫调节的相关指标在体内环境中的表达水平, 进一步阐明 miRNA-378a 促进巨噬细胞 M2 极化时在免疫调节及组织修复中的相关影响。

胶原蛋白是细胞外基质的主要成分, 表现出理想的特性, 如生物相容性和生物降解性, 用于体内应用^[45-50]。该胶原蛋白海绵材料三维空间结构中有诸多空隙且已经成熟运用于临床^[51], 因此以它作为载体来复合细胞株以期达到稳定回植的目的。作者课题组孙皓等^[52]已构建过表达 miR-378a 修饰的骨髓间充质干细胞复合胶原蛋白海绵支架, 并采用荧光显微镜检测转染效率及电镜观测细胞株在支架内的空间架构, 证实了胶原蛋白海绵的空间架构可以为骨髓间充质干细胞提供良好的附着环境。为阐明体内环境中 miRNA-378a 促进巨噬细胞极化方向、免疫调节及组织修复中的相关影响, 此次实验将课题组前期得到的慢病毒诱导的 miRNA-378a 巨噬细胞株扩增、筛选培养后通过荧光显微镜观察, 确认转染后的细胞株汇合度达到 80% 及通过荧光强度保证含有 miRNA-378a 的巨噬细胞株的比例基本占据所有细胞株的 80%, 以此确保后期的材料复合及动物回植时的巨噬细胞株是慢病毒诱导的 miRNA-378a 巨噬细胞株。将各组细胞与胶原蛋白海绵共培养 7 d, 随后通过荧光显微镜及扫描电镜进行观测, 发现荧光显微镜下的胶原蛋白海绵中出现密集的绿色荧光细胞, 证明慢病毒诱导的 miRNA-378a 巨噬细胞株已经进入胶原蛋白海绵材料内部。为进一步证实其是否与材料形成了附着关系, 在扫描电镜下观测到慢病毒诱导的 miRNA-378a 巨噬细胞株团块大面积、高密度的附着于胶原蛋白海绵的三维空间结构空隙中, 并极化分型、伸出伪足, 也通过各分组的扫描电镜观测发现, 空白对照组 (胶原蛋白海绵) 可见胶原蛋白海绵具有良好的三维空间结构以供细胞株附着、增殖; 对照组 (巨噬细胞组) 可见三维空间空隙中有细胞株附着, 形态基本为球形, 且密度及伪足较少; 阴性组空隙中有细胞株附着, 形态仍基本为球形, 但密度及伪足较对照组有所增加; 阳性组空隙中有细胞株附着, 形态出现球形、纺锤形及多边形分化, 且密度及伪足较对照组、阴性组有所增加。初步观测到了 miRNA-378a 阳性组与其他分组的差异, 得出通过慢病毒诱导 miRNA-378a 巨噬细胞后引起巨噬细胞表型变化以及增强了细胞的附着能力和增殖能力。

前期细胞部分实验使用的是小鼠腹腔巨噬细胞 Raw264.7, 而 C57/BL6 已是现在公认的肿瘤学、生理学、免疫学、遗传学等研究中的标准品系, 因此选用 C57/BL6 作为动物模型, 而 C57BL/6J 内的 Nlrp12C57BL/6J 基因位点发生突变致使其会降低趋化因子的产生、免疫细胞的浸润和病原体的清除, 影响先天性免疫应答反应, 可能不适合用于研究中性粒细胞对免疫系统病原体或功能的反应。因而此次实验选用亚系 C57BL/6N 小鼠作为动物模型^[53]。

BAHETI 等^[54]在小鼠背部气囊模型中回植 GO、HA、HA-2%GO、HA-5%GO、Ti 各组带有涂层的钛金属片和纯

钛金属片, 探讨实验材料对于机体巨噬细胞极化的调节, 证实了 HA-2%GO 组涂层能促进宿主体内 M2 型巨噬细胞极化, 缓解炎症反应, 降低炎症细胞的浸润及抑制纤维组织生成; 并通过苏木精 - 伊红染色、Masson 染色观察到 HA-2%GO 气囊组织炎性浸润较小, 纤维层增生不明显, 而其他实验组炎性浸润纤维层增生明显, 更加佐证了结论。此次实验选择相似的背部皮下模型, 方便观察伤口愈合情况及取材时的皮肤与材料结合情况, 且可通过随后的切片观察到完整皮肤组织内的血管增生、成纤维细胞增殖、纤维组织增生及各种炎症细胞浸润, 以此分辨各组所引起的巨噬细胞极化分型比例和其对机体免疫调节、组织修复的相关影响。回植 4, 7 d 后取材发现绝大部分模型中的复合支架已经和皮肤组织结合为一体, 修建复合支架 + 结合部分皮肤组织后通过程序脱水、石蜡包埋、苏木精 - 伊红染色、Masson 染色切片观察, 发现与大体观察相同的是, 各分组 7 d 愈合情况均好于 4 d; 而在同一时间段内, 过表达 miRNA-378a 的阳性组巨噬细胞 M2 极化比例较其他分组高, 阴性 miRNA-378a 与对照组无明显差异但均较空白对照组高, 且阳性组组织内的血管增生、成纤维细胞增殖、纤维组织增生等组织愈合修复迹象较其他组明显, 得出慢病毒介导的 miRNA-378a 巨噬细胞株在体内环境中确实对免疫调节和组织修复起到一定作用。

WEI 等^[55]在骨形态发生蛋白 2 对体内巨噬细胞募集的影响实验中发现, 皮下植入含有 20 mg/mL 骨形态发生蛋白 2 的胶原蛋白海绵支架, 能够在体内快速招募免疫细胞。巨噬细胞谱系泛标记物 CD68、M1 极化巨噬细胞标记物 CCR7 和 M2 极化巨噬细胞标记物精氨酸酶 1 胶原蛋白海绵的免疫组化染色的代表性照片也显示出促巨噬细胞募集及促 M2 极化趋势。此次实验为阐明 miRNA-378a 在体内环境中对巨噬细胞极化方向的影响, 选择 CD68(泛巨噬细胞标记物)、CD206(M2 型巨噬细胞标记物)、CCR7(M1 型巨噬细胞标记物) 作为免疫组化指标。各组 4, 7 d 免疫组化观察中, 直观地看到 4 d 时各组各指标阳性细胞数量均多于 7 d, 证实了 4 d 为巨噬细胞增殖及极化高峰期, 而细胞数、染色细胞数及棕染强度上可见阳性组 > 阴性组 ≈ 对照组 > 空白对照组这一现象, 则进一步证实了过表达 miRNA-378a 一定程度上增强了巨噬细胞及组织细胞的增殖。对各组指标的免疫组化阳性细胞率进行定量分析得出相关统计数据图, 显示阳性组的阳性细胞率无论在时间节点还是指标上都与其他组有统计学差异, 对照和阴性组间无统计学差异, 空白对照组与其他组有统计学差异, 证实了过表达 miRNA-378a 的确在体内环境中影响巨噬细胞极化; 阳性组的 CD68(泛巨噬细胞标记物)、CD206(M2 型巨噬细胞标记物) 阳性细胞率为 4 组最高, 而 CCR7(M1 型巨噬细胞标记物) 为最低。

此次实验前期体外细胞部分的 qRT-PCR 检测结果显示, 与 M1+miR-378a 组相比, M1 组的相关促炎性细胞因子肿瘤坏死因子 α 、一氧化氮合酶、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 的表达明显升高, 以上结果说明 miR-378a 抑制了 M1 型巨噬细胞相关细胞因子的表达; M2 组较 M2+miR-378a 组的相关促炎性细胞因子 CD206、白细胞介素 10、精氨酸酶 1 的表达显著升高, 说明 miR-378a 促进了 M2 型巨噬细胞相关细胞因子的表达^[49]。此次实验为进一步阐明在体内环境下是否得出相同趋势, 选择肿瘤坏死因子 α 、一氧化氮合酶、白细胞介素 6、CD206、白细胞介素 10 作为 qRT-PCR 检测指标。发现无论是在 4 d 还是 7 d 时, 对照组及阴性组肿瘤坏死因子 α 、一氧化氮合酶、白细胞介素 6、CD206、白细胞介素 10 的基因表达水平均高于空白对照组, 这一表象推测很可能是回植支架中附着有相当量的巨噬细胞, 使得其与不附着细胞的空白对照组对比表达量增加, 而 M2 型巨噬细胞相关的 CD206、白细胞介素 10 细胞因子在 4 d 时对照组及阴性组与空白对照组对比无统计学差异, 7 d 时出现差异, 也有可能是随着时间推移巨噬细胞的自然极化, 支架内相当量的巨噬细胞与不附着细胞的空白对照组对比表达量差异变大。阳性组无论是在 4 d 还是 7 d, 肿瘤坏死因子 α 、一氧化氮合酶、白细胞介素 6 等促炎细胞因子均在统计学上与其他 3 组均表现出表达水平相对降低这一差异; 而 CD206、白细胞介素 10 等促炎细胞因子也在统计学上存在差异, 与其他 3 组相比表达水平平均的相对升高。以上实验得出的结果及相应统计学差异皆指向了一个可能性, 即过表达 miRNA-378a 的巨噬细胞在体内中得出和体外一致的结论, 过表达 miRNA-378a 的巨噬细胞在体内仍促进巨噬细胞 M2 极化并抑制 M1 极化。

综上所述, 此次实验在一定程度上证实了慢病毒介导 miRNA-378a 进入巨噬细胞后, 在动物体内环境中能对免疫调节和组织修复起到一定作用, 探索了 miR-378a 作为免疫调控、组织修复治疗基因的潜力。但此次研究尚存明显的不足之处, 因研究时间限制未进行 miRNA-378a 参与免疫调控和组织修复的具体机制研究, 尚有待后续实验进一步探索。

致谢: 在此向新疆医科大学及未能署名但给予我诸多帮助的马丽莎、都曼别克·阿曼台同学表示由衷的感谢。

作者贡献: 王思凡、何惠宇、韩祥祯进行实验设计, 实验实施为王思凡、杨象, 实验各项指标测定、资料收集、成文为王思凡, 韩祥祯审核。

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。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。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。

4 参考文献 References

- [1] KALIVA M, GEORGOPOULOU A, DRAGATOIANNIS DA, et al. Biodegradable Chitosan-graft-Poly(L-lactide) Copolymers For Bone Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2020;12(2):316.
- [2] YANG P, XING J, LIU J, et al. Individual tissue-engineered bone in repairing bone defects: a 10-year follow-up study. *Tissue Eng Part A*. 2020;26(15-16):896-904.
- [3] WANG L, XU L, PENG C, et al. The effect of bone marrow mesenchymal stem cell and nano-hydroxyapatite/collagen I/poly-L-lactic acid scaffold implantation on the treatment of avascular necrosis of the femoral head in rabbits. *Exp Ther Med*. 2019;18(3):2021-2028.
- [4] CLAIR S, DE OTEYZA DG. Controlling a Chemical Coupling Reaction on a Surface: Tools and Strategies for On-Surface Synthesis. *Chem Rev*. 2019;119(7):4717-4776.
- [5] HUANG YJ, HUNG KC, HUNG HS, et al. Modulation of Macrophage Phenotype by Biodegradable Polyurethane Nanoparticles: Possible Relation between Macrophage Polarization and Immune Response of Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(23):19436-19448.
- [6] SUN J, ZHANG J, LI K, et al. Photobiomodulation Therapy Inhibit the Activation and Secretory of Astrocytes by Altering Macrophage Polarization. *Cell Mol Neurobiol*. 2020;40(1):141-152.
- [7] LUO W, AI L, WANG B, et al. Eccentric exercise and dietary restriction inhibits M1 macrophage polarization activated by high-fat diet-induced obesity. *Life Sci*. 2020;243:117246.
- [8] LIU W, MIAO Y, ZHANG L, et al. MiR-211 protects cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis. *Bioengineered*. 2020; 11(1):189-200.
- [9] TAN X, GUO W, PENG Z, et al. LncRNA-Malat1 down-regulates miR-211-5p expression to promote neuronal damage from cerebral ischemia reperfusion injury. *Biochem Pharmacol*. 2021;192:114694.
- [10] CHEN L, ZHU Q, LU L, et al. MiR-132 inhibits migration and invasion and increases chemosensitivity of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cells via targeting TGF-beta1. *Bioengineered*. 2020;11(1): 91-102.
- [11] MARTINEZ B, PELOW PV. MicroRNAs as disease progression biomarkers and therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neural Regen Res*. 2020;15(10):1831-1837.
- [12] HAN Z, ROSEN ST, QUERFELD C. Targeting microRNA in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(5):535-544.
- [13] HUPKES M, SOTOCA AM, HENDRIKS JM, et al. MicroRNA miR-378 promotes BMP2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *BMC Mol Biol*. 2014;15:1.
- [14] DONG X, LIAO B, ZHAO J, et al. METTL14 mediates m(6)a modification on osteogenic proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by regulating the processing of pri-miR-873. *Mol Med Rep*. 2023;28(3):166.
- [15] LIN S, LIU Q, LELYVELD VS, et al. Mettl1/Wdr4-Mediated m(7)G tRNA Methylome Is Required for Normal mRNA Translation and Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Mol Cell*. 2018;71(2): 244-255.
- [16] ZHU Y, ZHANG X, YANG K, et al. Macrophage-derived apoptotic vesicles regulate fate commitment of mesenchymal stem cells via miR155. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):323.
- [17] MACHADO IF, TEODORO JS, PALMEIRA CM, et al. miR-378a: a new emerging microRNA in metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(10): 1947-1958.
- [18] RUCKERL D, JENKINS SJ, LAQTOM NN, et al. Induction of IL-4Ralpha-dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Blood*. 2012; 120(11):2307-2316.
- [19] 杨泉, 何惠宇, 王思凡, 等. 过表达 miR-378a 促进巨噬细胞向 M2 极化且抑制巨噬细胞向 M1 极化 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(13):2036-2041.
- [20] LANGER R, VACANTI JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110): 920-926.
- [21] LIU X, DOU G, LI Z, et al. Hybrid Biomaterial Initiates Refractory Wound Healing via Inducing Transiently Heightened Inflammatory Responses. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(21):e2105650.
- [22] CAO L, SU H, SI M, et al. Tissue Engineering in Stomatology: A Review of Potential Approaches for Oral Disease Treatments. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:662418.
- [23] LIU S, CHEN X, YU M, et al. Applications of Titanium Dioxide Nanostructure in Stomatology. *Molecules*. 2022;27(12):3881.
- [24] CHU S, WANG J, GAO F. The Application of Chitosan Nanostructures in Stomatology. *Molecules*. 2021;26(20):6315.
- [25] HAZRATI P, MIRTALEB MH, BOROOJENI H, et al. Current Trends, Advances, and Challenges of Tissue Engineering-Based Approaches of Tooth Regeneration: A Review of The Literature. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2024;19(4):473-496.
- [26] TAVELLI L, BAROOTCHI S, RASPERINI G, et al. Clinical and patient-reported outcomes of tissue engineering strategies for periodontal and peri-implant reconstruction. *Periodontol 2000*. 2023;91(1): 217-269.
- [27] PEIRSMAN A, NGUYEN HT, VAN WAEYENBERGE M, et al. Vascularized adipose tissue engineering: moving towards soft tissue reconstruction. *Biofabrication*. 2023;15(3). doi: 10.1088/1758-5090/ acd7a5.
- [28] AZARYAN E, EMADIAN RF, HANAFI-BOJD MY, et al. Dentin regeneration based on tooth tissue engineering: A review. *Biotechnol Prog*. 2023; 39(2):e3319.
- [29] SAITO MM, ONUMA K, YAMAKOSHI Y. Cementum is key to periodontal tissue regeneration: A review on apatite microstructures for creation of novel cementum-based dental implants. *Genesis*. 2023;61(3-4): e23514.
- [30] 李军, 颜杉, 许杰, 等. IL-37 通过调控巨噬细胞极化抑制炎症性疾病研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2023, 39(20):3527-3531.
- [31] YUNNA C, MENGROU H, LEI W, et al. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol*. 2020;877:173090.
- [32] MA H, SHU Q, LI D, et al. Accumulation of Intracellular Ferrous Iron in Inflammatory-Activated Macrophages. *Biol Trace Elem Res*. 2023; 201(5):2303-2310.

- [33] BOUTILIER AJ, ELSAWA SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6995.
- [34] YANG N, SHI N, YAO Z, et al. Gallium-modified gelatin nanoparticles loaded with quercetin promote skin wound healing via the regulation of bacterial proliferation and macrophage polarization. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1124944.
- [35] WU H, ZHENG J, XU S, et al. Mer regulates microglial/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neuroinflammation following traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2021;18(1):2.
- [36] JIN GL, LIU HP, HUANG YX, et al. Koumine regulates macrophage M1/M2 polarization via TSPO, alleviating sepsis-associated liver injury in mice. *Phytomedicine.* 2022;107:154484.
- [37] WANG WB, LI JT, HUI Y, et al. Combination of pseudoephedrine and emodin ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating macrophage M1/M2 polarization through the VIP/cAMP/PKA pathway. *Chin Med.* 2022;17(1):19.
- [38] CAO L, TAN Q, ZHU R, et al. LncRNA MIR4435-2HG suppression regulates macrophage M1/M2 polarization and reduces intestinal inflammation in mice with ulcerative colitis. *Cytokine.* 2023;170:156338.
- [39] ALKAN AH, AKGUL B. Endogenous miRNA Sponges. *Methods Mol Biol.* 2022;2257:91-104.
- [40] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet.* 2022;38(6):613-626.
- [41] CUI J, LI Z, CUI K, et al. MicroRNA-20a-3p regulates the host immune response to facilitate the mycobacterium tuberculosis infection by targeting IKKbeta/NF-kappaB pathway. *Int Immunopharmacol.* 2021;91:107286.
- [42] CHEN J, HUANG ZB, LIAO CJ, et al. LncRNA TP73-AS1/miR-539/MMP-8 axis modulates M2 macrophage polarization in hepatocellular carcinoma via TGF-beta1 signaling. *Cell Signal.* 2020;75:109738.
- [43] ESSANDOH K, LI Y, HUO J, et al. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock.* 2016;46(2):122-131.
- [44] MOHAPATRA S, PIOPPINI C, OZPOLAT B, et al. Non-coding RNAs regulation of macrophage polarization in cancer. *Mol Cancer.* 2021;20(1):24.
- [45] KATRILAKA C, KARIPIDOU N, PETROU N, et al. Freeze-Drying Process for the Fabrication of Collagen-Based Sponges as Medical Devices in Biomedical Engineering. *Materials (Basel).* 2023;16(12):4425.
- [46] MARKOWICZ M, KOELLENSPERGER E, STEFFENS GC, et al. The impact of vacuum freeze-drying on collagen sponges after gas plasma sterilization. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006;17(1-2):61-75.
- [47] HE Y, WANG C, WANG C, et al. An Overview on Collagen and Gelatin-Based Cryogels: Fabrication, Classification, Properties and Biomedical Applications. *Polymers (Basel).* 2021;13(14):2299.
- [48] SINGH YP, DASGUPTA S. Gelatin-based electrospun and lyophilized scaffolds with nano scale feature for bone tissue engineering application: review. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2022;33(13):1704-1758.
- [49] SALVANTE ERG, POPOIU AV, BARB AC, et al. Artificial Intelligence (AI) Based Analysis of In Vivo Polymers and Collagen Scaffolds Inducing Vascularization. *In Vivo.* 2024;38(2):620-629.
- [50] NICOL L, SRIKANTH P, HENRIKSEN K, et al. Widespread disturbance in extracellular matrix collagen biomarker responses to teriparatide therapy in osteogenesis imperfecta. *Bone.* 2021;142:115703.
- [51] D'AMICO E, PIERFELICE TV, LEPORE S, et al. Hemostatic Collagen Sponge with High Porosity Promotes the Proliferation and Adhesion of Fibroblasts and Osteoblasts. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7749.
- [52] 孙皓, 蒲胤瑄, 刘佳林, 等. 过表达 miR-378a 修饰骨髓间充质干细胞复合胶原蛋白海绵支架对大鼠股骨缺损的修复作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2023,48(2):175-182.
- [53] MATTAPALLIL MJ, WAWROUSEK EF, CHAN CC, et al. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(6):2921-2927.
- [54] BAHETI W, LV S, MA L, et al. Graphene/hydroxyapatite coating deposit on titanium alloys for implant application. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2023;21:1597502408.
- [55] WEI F, ZHOU Y, WANG J, et al. The Immunomodulatory Role of BMP-2 on Macrophages to Accelerate Osteogenesis. *Tissue Eng Part A.* 2018;24(7-8):584-594.

(责任编辑: GD, ZN, QY, LWJ)