

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.11.012

小鼠肝再生过程中 ROS 及线粒体代谢变化规律的研究 *

李 鸽 方从文 师腾瑞 柏 桦 卢 伟 王 枫 海春旭 秦绪军[△]

(第四军医大学军事预防医学系营养与食品卫生学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:肝脏是维持人体发挥功能的重要器官,同时肝脏再生能力十分强大。本文通过部分肝切除术后小鼠肝再生模型,观察肝再生过程中氧化应激及线粒体代谢变化规律,以期将来的调控肝再生提供新的干预靶点。**方法:**选择雄性健康体重均匀的 Balb/c 小鼠,采用经典 70%肝切除模型,随机分为假手术对照组(Sham 组)以及 70%肝切除组(70%PH 组)。肝切除术后 6 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d 不同时间点取肝组织,制备冰冻切片检测活性氧(ROS)水平,Western blot 分别检测细胞增殖相关蛋白 PCNA、CyclinD1;氧化应激相关蛋白 SOD1、SOD2、CAT、GPX1;以及线粒体代谢相关蛋白 PGC-1 α 、Nrf1、TFAM、Drp1、Fis1、Mfn1、Mfn2、OPA1 的表达并分析其变化规律。**结果:**70%肝切除术后小鼠肝脏增长迅速,细胞增殖关键蛋白 PCNA 和 CyclinD1 表达显著增加;在此过程中细胞 ROS 水平呈现先升高后降低的变化,细胞主要抗氧化酶 SOD1、SOD2、CAT、Gpx1 与 ROS 相一致出现先升高后降低的变化。线粒体生物合成调控因子 PGC-1 α 、Nrf1、TFAM 呈现先降低后升高的趋势,而线粒体分裂蛋白 Drp1 和 Fis1 呈现先降低后显著升高的趋势,线粒体融合相关蛋白 Mfn1、Mfn2 和 OPA1 总体为先降低后恢复至正常水平。**结论:**在小鼠 70%肝切除再生过程中,存在着明显的氧化应激,线粒体生物合成增加,线粒体分裂/融合平衡偏向分裂,并且这些变化呈现具有一定的时间变化规律,这些变化及规律很可能作为将来调控肝再生的重要的潜在干预靶点。

关键词:肝再生;肝切除;线粒体;氧化应激;增殖

中图分类号:R-33; Q593.1; Q244; R322.47 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)11-2057-05

Study on the Metabolic Changes of ROS and Mitochondria during the Process of Liver Regeneration in Mice*

LI Ge, FANG Cong-wen, SHI Teng-rui, BAI Hua, LU Wei, WANG Feng, HAI Chun-xu, QIN Xu-jun[△]

(Department of nutrition and food hygiene, School of Public Health, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The liver plays an important role in human body. At the same time, the liver has strong ability of regeneration. In the present study, we observed the changes of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial metabolism during liver regeneration after liver partial hepatectomy in order to provide new targets for future regulation of liver regeneration. **Methods:** Using the classic mouse 70% partial hepatectomy model, the male healthy Balb/c mice were randomly divided into Sham group and 70% partial hepatectomy group (70%PH). The liver tissues were harvested at 6h, 1d, 2d, 3d, 5d and 7d. The frozen sections were used to detect the level of ROS. The expression of the cell proliferation-related proteins PCNA, CyclinD1; the cell antioxidant enzymes related proteins SOD1, SOD2, CAT, GPX1, and the mitochondrial biogenesis and dynamics regulators PGC-1 α , Nrf1, TFAM, Drp1, Fis1, Mfn1, Mfn2, OPA1 were determined by Western blot respectively. **Results:** The liver of mice regenerated rapidly after 70% hepatectomy, and the expression of the cell proliferation-related proteins PCNA and Cyclin D1 increased significantly. During the process, the level of ROS firstly increased and then decreased. The protein levels of antioxidant enzymes SOD1, SOD2, CAT, and Gpx1 were consistent with the change of ROS level. The mitochondrial biogenesis regulatory factors PGC-1 α , Nrf1 and TFAM firstly decreased and then increased. The mitochondrial fission protein levels of Drp1 and Fis1 decreased firstly and then increased significantly with the mitochondrial fusion protein levels of Mfn1, Mfn2 and OPA1 decreased and then restored to the normal level during the regeneration process. **Conclusions:** In the regeneration process after 70% liver hepatectomy in mice, the ROS level increased accompanied with the high levels of antioxidant proteins. The mitochondrial biogenesis increased while the mitochondrial fission/fusion balance moved towards fission. These changes are likely to be important potential intervention targets for the regulation of liver regeneration in the future.

Key words: Partial hepatectomy; Liver regeneration; Mitochondria; Oxidative stress; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.1; Q244; R322.47 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)11-2057-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31670863,81270417,81573127);陕西省自然科学基金重点项目(2016JZ027)

作者简介:李鸽(1993-),硕士研究生,主要研究方向:活性氧与肝再生,E-mail: 1016009751@qq.com

[△] 通讯作者:秦绪军(1976-),硕士生导师,副教授,主要研究方向:线粒体与衰老相关疾病,

E-mail: qinxujun@hotmail.com,电话:15291850398

(收稿日期:2018-01-18 接受日期:2018-02-12)

前言

肝脏作为人体重要的代谢器官,在维持正常生理功能方面发挥着重要作用,肝脏功能紊乱被认为与众多代谢性疾病发生发展密切相关^[1]。同时肝脏也是机体少有的再生能力超强的器官。各种内外损伤因素引起的肝脏损伤的恢复期常常伴随着肝再生。比如部分肝切除(PHx)后,肝会在短时间内再生恢复至与原肝相当的重量和体积。其中比较经典的是1931年由Higgins和Anderson建立的肝脏2/3(大约70%)切除模型^[2]。但需要指出的是肝部分切除后并不会出现肝叶的再生,而是剩余肝叶内的细胞增殖引起的肝体积的恢复^[3]。在此过程中细胞的增殖发挥了重要的作用,但具体调节细胞增殖从而调控肝再生的机制目前仍不清楚。

虽然肝脏具有非常强的再生能力,但在正常生理状况下,绝大多数肝脏细胞均处于静息状态,并不表现出分裂增殖的活性,而只有受到应激损伤时才会被激活进入细胞周期^[4]。众多内外因素应激均可以激活细胞周期,其中活性氧(ROS)对细胞周期的调控作用越来越受到关注^[5]。ROS是一类性质活泼的主要由含氧自由基及其产物组成的一大类分子,既有正常生理剂量下的信号转导及调控作用,也有大剂量下氧化应激损伤作用^[6]。我们前期研究发现过氧化氢(H₂O₂)参与了细胞周期的激活^[7],但在肝再生过程中ROS水平及可能的氧化应激规律及机制仍不清楚。而正常情况下线粒体是细胞ROS产生的最主要部位,线粒体的代谢状态能够直接调控ROS水平^[8]。本研究采用小鼠70%肝切除模型,系统动态观察在肝再生过程中氧化应激及线粒体代谢规律的变化,为后续的靶点干预研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级健康雄性Balb/c小鼠21只,体重18~22g,动物及饲料均来源于空军军医大学实验动物中心。动物自由饮水饮食,实验环境温度为(24±2)℃,相对湿度为50%±10%,12h/12h交替照明和避光。

1.2 主要试剂及仪器

PCNA兔单抗、CyclinD1兔单抗、SOD2兔单抗、Mfn1兔单抗、Mfn2兔单抗、OPA1兔单抗、SOD1兔单抗、CAT兔单抗均购自Abcam公司;Nrf1兔单抗和PGC-1α兔单抗购自NOVUS公司;TFAM兔单抗和Drp1兔单抗购自Cell Signaling公司;Fis1兔单抗购自Thermo Fisher公司;Actin兔单抗购自北京博奥森生物技术有限公司;RIPA裂解液购自碧云天生物技术有限公司;Hoechst、DHE染料、DTT、Protease Inhibitor Cocktail购自Sigma公司;BCA蛋白定量分析试剂盒购自Thermo Fisher公司;R510-11JJsoflurane小动物麻醉机、吸收过滤器及麻醉剂Isoflurane均为RWD公司产品;SCIENTZ-48高通量组织研磨器为SCIENTZ新芝公司产品;Universal Hood II凝胶成像系统,Mini-PROTEAN电泳系统,蛋白半干转装置,均为Bio-Rad公司产品;BX51正置荧光显微镜及fluov10i激光共聚焦显微镜为Olympus公司产品;全自动高速冷冻离心机为SIGMA公司产品;Infinite M200 PRO全波段酶标仪为Tecan产品。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和处理 将实验小鼠随机分为7组,每组3只,动物分组与处理如下:假手术组和6个不同时间点的70%肝切除术组。其中,假手术组只打开腹腔并不进行肝切除;肝切除术组行70%肝切除术,术后继续喂养,分别于术后6h、1d、2d、3d、5d、7d后处死取肝组织用于相关检测。

1.3.2 动物造模 小鼠置于小动物麻醉机中使用异氟烷吸入麻醉,参考Higgins and Aderson的大鼠肝切除模型对各组小鼠进行肝部分(70%)手术切除(Partial Hepatectomy PHx)。小鼠麻醉后备皮,酒精消毒,取上中腹切口,逐层入腹,用手轻轻将小鼠肝左侧叶挤出,再缓慢将肝脏中叶旋出,小心离断肝脏周围韧带,4-0线置于肝蒂根部并结扎肝蒂,然后切除肝脏左侧叶及肝脏中叶,剪断线头,此过程为70%肝切除术。检查无活动性出血后缝合切口,复温待动物苏醒。

1.3.3 动物处死 在异氟烷麻醉条件下处死动物,迅速摘取小鼠肝组织,保存于-80℃备用。

1.3.4 肝组织ROS水平检测 取新鲜肝叶,使用切片机制备厚度均匀的组织冰冻切片,以PBS为溶剂在避光条件下按1:1比例配置染料10 μmol/L DHE及10 μmol/L Hoechst共1 mL,快速在切片上滴加适量染料均匀覆盖在组织上,将切片置于湿盒中,迅速放入37℃孵箱中并计时,避光条件孵育30 min,之后置于摇床上使用PBS洗1 min/次,共3次后吸干水分,使用防猝灭封片胶封片,尽快于激光共聚焦显微镜下观察结果、采集图像并进行荧光定量以及统计分析。

1.3.5 肝组织蛋白提取及定量 将中等强度的RIPA裂解液,蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂按100:1:1的比例配制,在冰上充分混匀;每个样品肝组织各称取100 mg,分别加入1 mL配制好的裂解液于4 mL EP管中,每管放置3颗小钢珠,于SCI-ENTZ-48高通量组织研磨器中充分研磨,之后肝匀浆液在4℃离心机中离心2次,每次14000×g/20 min,上清为肝组织总蛋白。取10 μL蛋白用蒸馏水10倍稀释后混合均匀,按照BCA蛋白定量试剂盒给定的说明书,于透明96孔板中加样,之后放入37℃孵箱中,计时30 min,之后使用全波段酶标仪测定蛋白浓度,根据测定浓度制作标准曲线,并按稀释比例计算蛋白含量。

1.3.6 Western Blot 检测 设置总上样量为20-30 μg肝组织总蛋白,根据分子量大小,分别采用浓度7%、10%及12%的分离胶进行蛋白电泳,恒压150 V电泳60 min。裁剪适当大小的滤纸和PVDF膜分别浸泡在TB和甲醇中,之后使用BioRad转膜仪转膜30 min将蛋白转移到PVDF膜上。将脱脂奶粉用TBST按比例配成5%的封闭液,将条带浸泡在封闭液中,室温摇床上封闭2 h,之后弃封闭液,TBST洗膜5 min/次共3次。用一抗稀释液将一抗按相应的比例配好,使条带均匀覆盖在一抗中,4℃摇床低速孵育过夜。用TBST洗膜3次。5%脱脂牛奶稀释相应的辣根酶二抗,室温摇床上低速孵育2 h,TBST洗膜4次。发光液均匀覆盖膜后,使用凝胶成像系统观测并进行拍照,之后使用Quantity One软件对其进行定量分析。

1.4 统计学分析

数据采用平均数±标准差表示,数据进行方差齐性检验后采用One-way ANOVA进行组间分析,两两比较采用Dunnett-t

检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验标准,当 $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝再生过程中细胞增殖相关蛋白 PCNA 和 CyclinD1 的变化

PCNA 和 Cyclin D1 是调节细胞周期和增殖的两个重要蛋白^[9,10],但二者在本肝再生实验中的变化并不完全相同。PCNA 的表达水平在肝切除发生后先显著明显上升后下降,而 Cyclin D1 的表达水平则随着肝切除时间点的变化逐步上调,至肝切除后第 7 天仍处于非常高的水平,如图 1 所示。

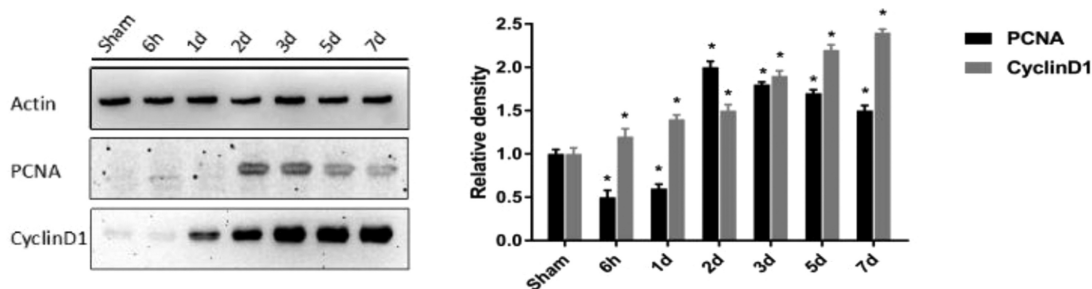


图 1 小鼠肝再生过程中 PCNA 和 Cyclin D1 的变化

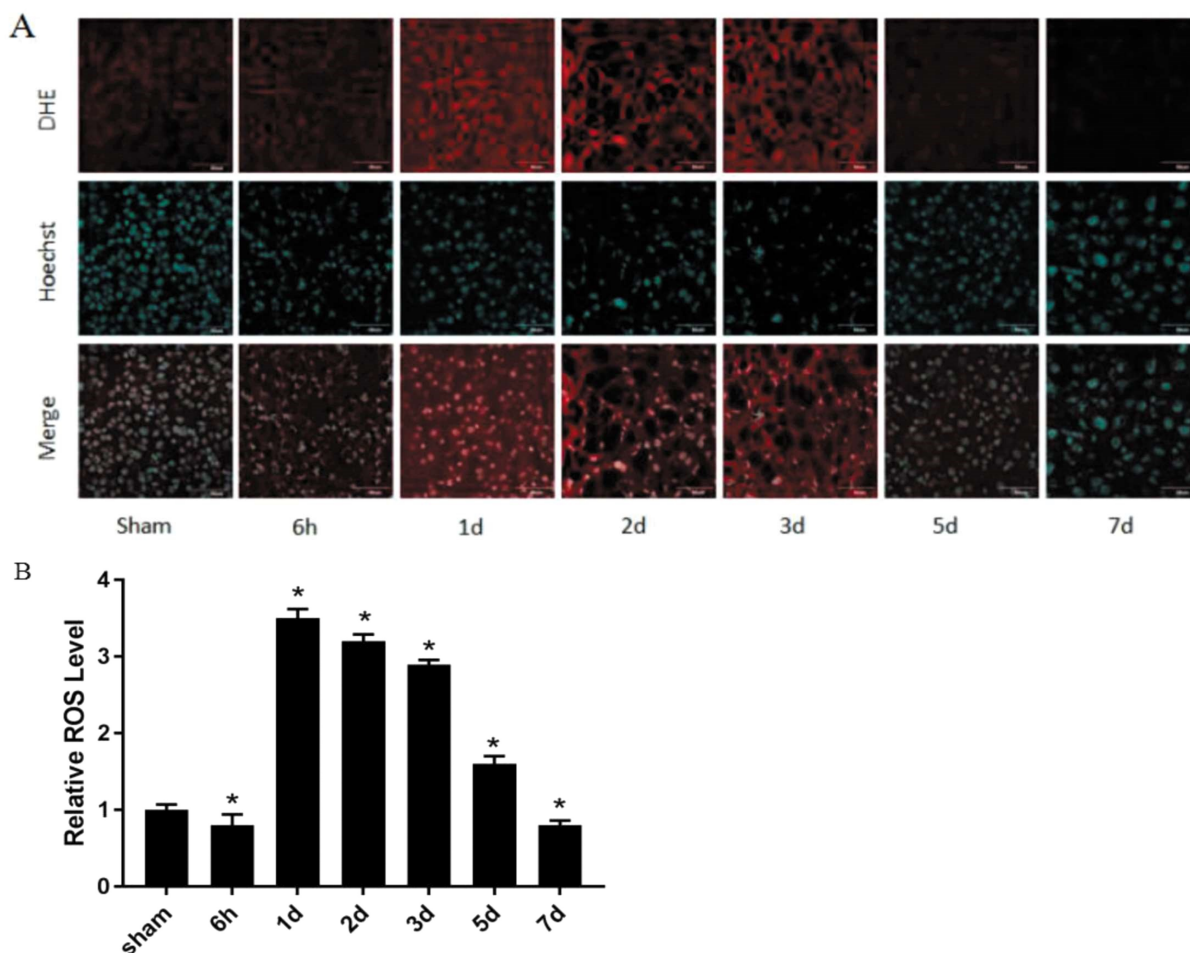
Fig.1 Changes of PCNA and Cyclin D1 during the process of liver regeneration in mice

Note: Data are expressed as Mean $\pm$ SD, n=3. * $P<0.05$, compared with group Sham.

2.2 肝再生过程中氧化应激状态的变化

检测 70% 肝切除后不同时间点的 ROS 水平发现,在肝切除后 6 h 无明显变化,第 1 d 开始 ROS 显著增加,一直持续至

第 3 d (P 均 <0.05),第 5 d 开始 ROS 水平降低,一直持续至第 7 d,恢复至正常水平,与对照组 (Sham 组) 无统计学差异 ($P>0.05$)。ROS 荧光图和 ROS 水平量化统计结果如图 2 所示。



A: DHE staining of liver tissue slices at different time points after hepatectomy;

B: Quantitative analysis of ROS level (fluorescence intensity) at different time points.

图 2 小鼠肝再生过程中 ROS 水平的变化

Fig.2 Changes of ROS level in the process of liver regeneration in mice

Note: Data are expressed as Mean $\pm$ SD, n=3. * $P<0.05$, compared with group Sham.

肝切除后抗氧化防御体系中的重要抗氧化蛋白水平也在肝再生过程中发生了显著的变化,SOD1、SOD2、CAT 和 Gpx1 的蛋白水平均出现了随着 ROS 水平升高而升高,随着 ROS 水

平降低而降低的大体一致的变化趋势,其中 SOD2 变化最为显著,如图 3 所示。

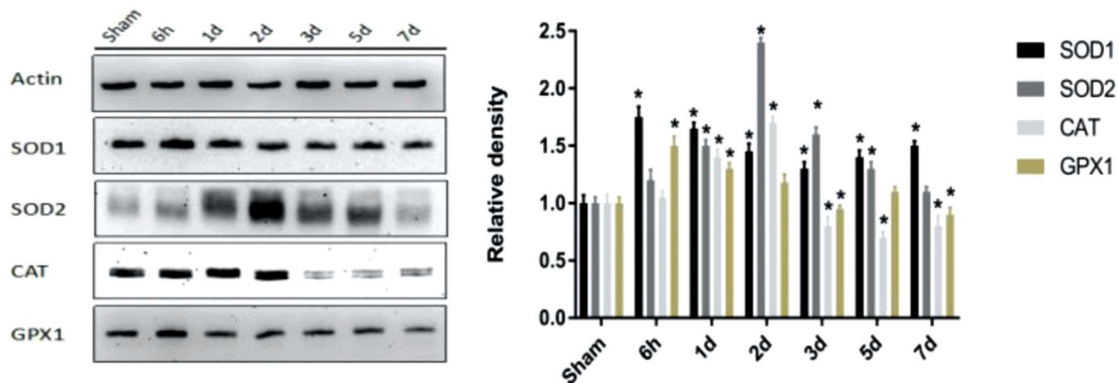


图 3 小鼠肝再生过程中 SOD1、SOD2、CAT 和 Gpx1 的变化

Fig.3 Changes of SOD1, SOD2, CAT and Gpx1 during the process of liver regeneration in mice

Note: Data are expressed as Mean± SD, n=3. *P< 0.05, compared with group Sham.

2.3 肝再生过程中线粒体生物合成的变化

线粒体生物合成主要直接受 TFAM 的调节^[11],在本实验中肝切除后 6 h 的 TFAM 水平有个短时间下降,而后显著升高。

而在 TFAM 上游又依次受 Nrf1 和 PGC-1α 的调控^[12],在本实验中,Nrf1 和 PGC-1α 的蛋白水平变化与 TFAM 基本一致,在急性期的短暂降低后明显持续升高,如图 4 所示。

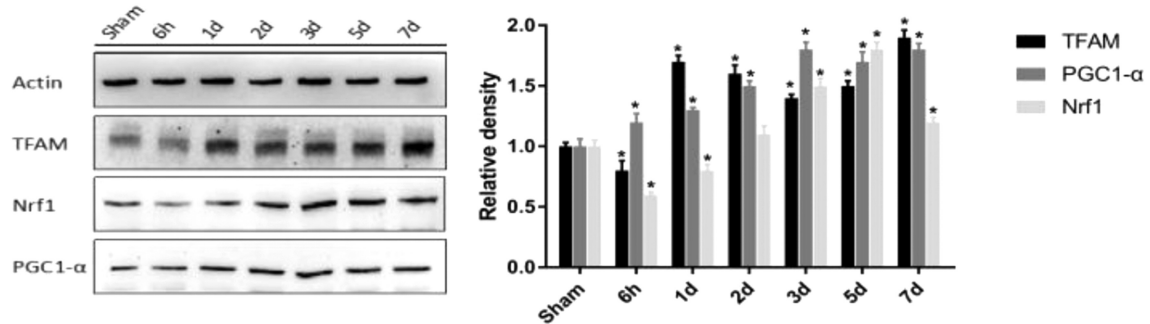


图 4 小鼠肝再生过程中 TFAM、Nrf1 和 PGC-1α 的变化

Fig.4 Changes of TFAM, Nrf1 and PGC-1α during the process of liver regeneration in mice

Note: Data are expressed as Mean± SD, n=3. *P< 0.05, compared with group Sham.

2.4 肝再生过程中线粒体分裂融合的变化

线粒体在生物合成之后,还不断进行着分裂和融合,以调整线粒体自身形态和功能^[13]。在本实验中,调控线粒体分裂的主要蛋白 Drp1 和 Fis1 在肝再生初期特别是 1 d 时有一定下降,而后显著升高,至第 7 天又有所降低。而 Mfn1, Mfn2, OPA1 作为调控线粒体融合的主要蛋白,其表达水平则在肝再生整个过程中主要以降低为主要变化趋势,至再生第 7 天时有一定的恢复,如图 4 所示。

3 讨论

肝脏强大的再生能力,不仅对于严重肝损伤,如各种因素引起的肝坏死,肝脏外科手术等的后期肝脏功能的恢复至关重要,而且对于研究成体脏器再生具有重要的理论和实际应用价值。肝脏部分切除很早就被作为研究肝再生的重要模型,其中 70 % 的肝切除模型应用最为广泛。研究发现,肝切除术后肝脏经历了早期的一个体积膨胀的时期后进入肝脏细胞分裂增殖

期,至大约一周可恢复原来肝的重量^[14]。因此我们选择术后 6 小时开始连续观察至 7 天。细胞周期由众多周期调控因子依次作用协调工作,其中 PCNA 和 Cyclin D1 是常被用于检测细胞增殖状态的关键蛋白^[9,10]。在本实验中,PCNA 和 Cyclin D1 在手术后 1 天开始明显上调,表明肝细胞分裂增殖及肝再生的开始。特别是 Cyclin D1 已经被证明与 CDK4 和 CDK6 结合促进 Rb 蛋白磷酸化是启动细胞增殖周期的最关键步骤^[15]。而至术后第 7 天肝再生基本结束时 PCNA 的水平又恢复至正常水平,而 Cyclin D1 维持高水平,其中的具体机制有待进一步深入研究。

ROS 能够调控细胞周期已经被很多文献报道。ROS 可以通过上调细胞周期的促进因子如 Cyclin D1 和 CDKs,下调周期抑制因子 CKIs 如 p27, p21, p16, 以及调控泛素化蛋白降解系统调控细胞周期及增殖^[16,17]。因此,为了探讨肝切除过程中 ROS 对肝再生的作用,我们对比观察了再生过程中 ROS 水平的变化规律,结果发现与 Cyclin D1 相吻合,ROS 水平在术后 1 天有一个显著的上升,提示 ROS 很可能在 Cyclin D1 的激活中

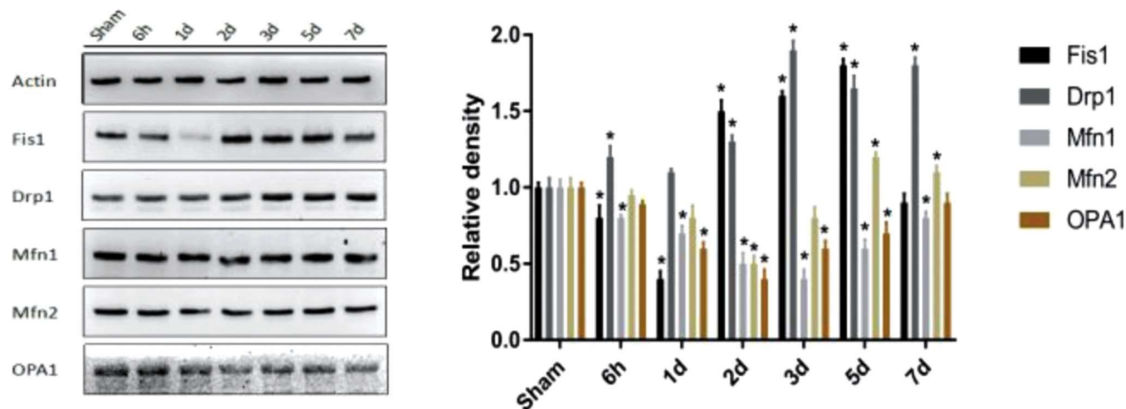


图5 小鼠肝再生过程中 Fis1、Drp1、Mfn1、Mfn2 和 OPA1 的变化

Fig.5 Changes of Changes of Fis1, Drp1, Mfn1, Mfn2 and OPA1 during the process of liver regeneration in mice

Note: Data are expressed as Mean $\pm$ SD, n=3. * $P < 0.05$, compared with group Sham.

扮演了重要角色。为了进一步验证 ROS 的变化规律,我们检测了几种主要的抗氧化酶的蛋白水平,结果发现 SOD1、SOD2、CAT 和 Gpx1 水平与 ROS 水平变化相一致,整体出现先升高后降低的趋势。这些结果表明肝切除后肝再生过程中存在着明确 ROS 和抗氧化防御体系的规律变化,这种变化与肝细胞增殖变化规律相一致,提示 ROS 很可能是调控肝再生的重要因素和潜在的调控靶点。

众多研究表明,细胞内源性 ROS 主要是由线粒体正常氧化呼吸产能过程中产生的^[8]。我们上面的抗氧化酶检测结果中,也发现线粒体特有的抗氧化酶 SOD2 变化最为显著,其变化规律与 ROS 匹配得更好,提示线粒体来源的 ROS 在肝再生的重要作用。而线粒体自身的代谢也能够显著影响 ROS 的水平^[18]。首先线粒体数量是影响 ROS 的一个重要因素,而线粒体数量主要依赖于线粒体最主要的生物合成因子 TFAM 的水平,而在 TFAM 上游,主要受 PGC-1 α 调控的 Nrf1 通路调控^[11,12]。本研究中肝切除后,TFAM 在很短时间内 6 h 出现一个短暂的降低后显著升高,相应的其上游的 Nrf1 和 PGC-1 α 变化趋势与 TFAM 相吻合,表明在肝切除后再生的过程中,线粒体数量和生物合成由短暂的降低后主要是一个持续增加的过程,线粒体生物合成的增加一方面为后续的细胞分裂做准备,另一方面很可能发挥着调控 ROS 激活细胞增殖的作用。生物合成后的线粒体并不是一成不变,而是不断地进行着分裂和融合动态变化,被称为线粒体动力学。其中线粒体分裂过程主要受蛋白 Fis1 和 Drp1 调节,而线粒体融合过程主要受 Mfn1 和 Mfn2 的调控,此外,OPA1 也参与了其过程^[19]。在本研究中,肝切除后线粒体分裂蛋白 Fis1 和 Drp1 水平也是先有一个下降的过程,然后出现明显的上升,而至第 7 天又有明显的回落。另一方面线粒体融合蛋白 Mfn1、Mfn2 和 OPA1 水平在肝切除后的再生过程中主要是以下降趋势为主,至肝再生基本完成的第 7 天又恢复至大致正常水平,这些结果表明线粒体分裂融合动态变化在肝再生过程中出现明显的偏移,分裂增加,融合减少。这些变化一方面可能为后续的细胞增殖分裂做准备,同时可能也是调节 ROS 的一种重要方式,因为文献报道,Drp1 高表达或者 Mfn1 敲低都可以引起 ROS 水平升高^[20,21],但在肝再生过程中线粒体分裂融合的偏移与 ROS 的因果调控关系有待进一步研究。

综上所述,通过小鼠部分肝切除术后的肝再生模型,我们系统观察了肝再生过程中的 ROS 和抗氧化系统以及线粒体代谢的动态变化,发现了在肝再生过程中在 ROS 和关键抗氧化酶出现规律性的先升高再降低的过程,线粒体生物合成增加,线粒体动态变化向分裂过程偏移,这些规律性的变化与肝再生过程中的细胞增殖密切相关,很可能作为潜在的靶点和靶分子,作为将来调控肝再生过程和效率的干预对象和手段,具有重要的理论和实际应用价值。

参考文献(References)

- [1] Kim D, Touros A, Kim W R. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome[J]. Clin Liver Dis, 2018, 22(1): 133-140
- [2] Forbes S J, Newsome P N. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(8): 473-485
- [3] Ito K, Yamazaki S, Yamamoto R, et al. Gene targeting study reveals unexpected expression of brain-expressed X-linked 2 in endocrine and tissue stem/progenitor cells in mice [J]. J Biol Chem, 2014, 289(43): 29892-29911
- [4] Itoh T. Stem/progenitor cells in liver regeneration [J]. Hepatology, 2016, 64(2): 663-668
- [5] 师腾瑞, 于卫华, 海春旭, 等. 活性氧调控细胞增殖的分子机制研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2015(06): 487-489
Shi Teng-rui, Yu Wei-hua, Hai Chun-xu, et al. Molecular mechanism of cell proliferation regulated by reactive oxygen species (ROS)[J]. Carcinogenesis; Teratogenesis; Mutagenesis, 2015, 27 (6): 487-489, 492
- [6] Angelova P R, Abramov A Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration[J]. FEBS Lett, 2018
- [7] Bai H, Zhang W, Qin X J, et al. Hydrogen peroxide modulates the proliferation/quiescence switch in the liver during embryonic development and posthepatectomy regeneration [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(11): 921-937
- [8] Stefanatos R, Sanz A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain[J]. FEBS Lett, 2017
- [9] Lv Q, Zhang J, Yi Y, et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen Has an Association with Prognosis and Risks Factors of Cancer Patients: a Systematic Review[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(9): 6209-6217

(下转第 2085 页)

- Best Evidence Review [J]. *Journal of periodontology*, 2017, 88(10): 978-998
- [8] Salineiro F C, Gialain I O, Kobayashi-Velasco S, et al. Detection of furcation involvement using periapical radiography and 2 cone-beam computed tomography imaging protocols with and without a metallic post: An animal study [J]. *Imaging science in dentistry*, 2017, 47(1): 17-24
- [9] Padmanabhan S, Dommy A, Guru S R, et al. Comparative Evaluation of Cone-beam Computed Tomography versus Direct Surgical Measurements in the Diagnosis of Mandibular Molar Furcation Involvement[J]. *Contemporary clinical dentistry*, 2017, 8(3): 439-445
- [10] Pinsky H M, Dyda S, Pinsky R W, et al. Accuracy of three-dimensional measurements using cone-beam CT [J]. *Dento maxillo facial radiology*, 2006, 35(6): 410-416
- [11] Rokn A R, Hashemi K, Akbari S, et al. Accuracy of Linear Measurements Using Cone Beam Computed Tomography in Comparison with Clinical Measurements [J]. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, 2016, 13(5): 333-339
- [12] Santana R B, Uzel M I, Gusman H, et al. Morphometric analysis of the furcation anatomy of mandibular molars [J]. *Journal of periodontology*, 2004, 75(6): 824-829
- [13] Walter, C, Weiger, R, Zitzmann N U. Accuracy of three-dimensional imaging in assessing maxillary molar furcation involvement [J]. *Journal of clinical periodontology*, 2010, 37(5): 436-441
- [14] Walter C, Schmidt JC, Dula K, et al. Cone beam computed tomography (CBCT) for diagnosis and treatment planning in periodontology: A systematic review [J]. *Quintessence international* (Berlin, Germany: 1985), 2016, 47(1): 25-37
- [15] Darby I, Sanelli M, Shan S, et al. Comparison of clinical and cone beam computed tomography measurements to diagnose furcation involvement [J]. *International journal of dental hygiene*, 2015, 13(4): 241-245
- [16] Pajnigara N, Kolte A, Kolte R, et al. Diagnostic accuracy of cone beam computed tomography in identification and postoperative evaluation of furcation defects [J]. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2016, 20(4): 386-390
- [17] Nikolic-Jakoba N, Spin-Neto R, Wenzel A. Cone-Beam Computed Tomography for Detection of Intrabony and Furcation Defects: A Systematic Review Based on a Hierarchical Model for Diagnostic Efficacy[J]. *Journal of periodontology*, 2016, 87(6): 630-644
- [18] Thilander-Klang A, Helmrot E. Methods of determining the effective dose in dental radiology[J]. *Radiation protection dosimetry*, 2010, 139(1-3): 306-309
- [19] Shin H S, Nam K C, Park H, et al. Effective doses from panoramic radiography and CBCT (cone beam CT) using dose area product (DAP) in dentistry [J]. *Dento maxillo facial radiology*, 2014, 43(5): 20130439
- [20] Al-Okshi A, Theodorakou C, Lindh C. Dose optimization for assessment of periodontal structures in cone beam CT examinations [J]. *Dento maxillo facial radiology*, 2017, 46(3): 20160311
- [21] Banodkar A B, Gaikwad R P, Gunjkar T U, et al. Evaluation of accuracy of cone beam computed tomography for measurement of periodontal defects: A clinical study [J]. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2015, 19(3): 285-289

(上接第 2061 页)

- [10] John R R, Malathi N, Ravindran C, et al. Mini review: Multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior [J]. *Indian J Dent Res*, 2017, 28(2): 187-192
- [11] Picca A, Lezza A M. Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies[J]. *Mitochondrion*, 2015, 25: 67-75
- [12] Islam H, Edgett B A, Gurd B J. Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1 α in human skeletal muscle: a re-evaluation [J]. *Metabolism*, 2017
- [13] Prieto J, Torres J. Mitochondrial Dynamics: In Cell Reprogramming as It Is in Cancer[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 8073721
- [14] Papanikolaou I G, Katselis C, Apostolou K, et al. Mesenchymal Stem Cells Transplantation following Partial Hepatectomy: A New Concept to Promote Liver Regeneration-Systematic Review of the Literature Focused on Experimental Studies in Rodent Models [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 7567958
- [15] VanArsdale T, Boshoff C, Arndt K T, et al. Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(13): 2905-2910
- [16] Shimura T, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1 [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(11): 1410-1414
- [17] Burhans W C, Heintz N H. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(9): 1282-1293
- [18] Li L, Tan J, Miao Y, et al. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 615-621
- [19] Sebastian D, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23(3): 201-215
- [20] Rovira-Llopis S, Banuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications [J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 637-645
- [21] Jezek J, Cooper K F, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(1)