

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research川陈皮素对脂多糖诱导下牙周膜细胞的
抗炎作用与细胞焦亡的研究

Research on the anti-inflammatory effects and pyroptosis of nobiletin on lipopolysaccharide-induced periodontal ligament cells

李淑华¹, 刘安东²

(1. 安徽医科大学 附属巢湖医院 口腔科, 安徽 巢湖 238000; 2. 安徽省第二人民医院 口腔科, 安徽 合肥 230000)

LI Shu-hua¹, LIU An-dong²

(1. Department of Stomatology, Chaohu Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Chaohu 238000, Anhui Province, China; 2. Department of Stomatology, The Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei 230000, Anhui Province, China)

基金项目: 安徽省高校自然科学研究一般项目
基金资助项目 (ZR2022B008)

作者简介: 李淑华 (1982-), 女, 副主任医师, 主要从事口腔医学方向的相关研究

通信作者: 李淑华

MP: 13866994169

E-mail: 1611367468@qq.com

摘要:目的 探讨川陈皮素 (NOB) 介导环状 RNA RAS p21 蛋白激活因子 2 (circRASA2) 对脂多糖 (LPS) 诱导下牙周膜细胞 hPDLcs 的作用及其机制。
方法 将 hPDLcs 细胞分为对照组、模型组 (hPDLcs 细胞以 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处理 24 h)、NOB-H 组 (基于模型组, 给予 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NOB 处理 24 h)、NOB + oe-NC 组 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NOB 处理转染 oe-NC 的模型组 hPDLcs 细胞) 和 NOB + oe-circRASA2 组 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NOB 处理转染 oe-circRASA2 的模型组 hPDLcs 细胞)。用实时定量反转录聚合酶链反应法检测 circRASA2 的相对表达水平, 用酶联免疫吸附试验法检测炎症相关因子的分泌水平, 用蛋白质印迹法检测 SLIT 同源物 2 (Slit2)/丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路相关蛋白相对表达水平。
结果 对照组、模型组和 NOB-H 组的 circRASA2 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.83 ± 0.50 和 1.36 ± 0.27 。对照组、模型组、NOB-H 组、NOB + oe-NC 组和 NOB + oe-circRASA2 组的白细胞介素-1 β 水平分别为 (144.82 ± 24.89)、(367.54 ± 65.73)、(228.51 ± 40.24)、(219.78 ± 36.94) 和 (324.25 ± 61.57) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 白细胞介素-18 水平分别为 (167.50 ± 27.33)、(394.68 ± 74.96)、(212.47 ± 39.51)、(205.93 ± 41.18) 和 (358.11 ± 66.27) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Slit2 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 2.35 ± 0.41 、 1.61 ± 0.29 、 1.57 ± 0.27 和 2.14 ± 0.38 , 磷酸化-p38 丝裂原活化蛋白激酶/p38 丝裂原活化蛋白激酶蛋白比值分别为 1.00 ± 0.16 、 2.08 ± 0.37 、 1.39 ± 0.25 、 1.33 ± 0.21 和 1.92 ± 0.34 。模型组的上述指标与对照组比较, NOB-H 组的上述指标与模型组比较, NOB + oe-circRASA2 组的上述指标与 NOB + oe-NC 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。
结论 NOB 通过抑制 circRASA2 表达, 减轻 LPS 诱导的 hPDLcs 细胞炎症水平, 抑制细胞焦亡, 可能是通过抑制 Slit2/MAPK 信号通路实现的。

关键词: 川陈皮素; 环状 RNA RAS p21 蛋白激活因子 2; 牙周膜细胞; 细胞焦亡; SLIT 同源物 2/丝裂原活化蛋白激酶信号通路

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.006

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)06-0777-07

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of circular RNA RAS p21 protein activator 2 (circRASA2) mediated by nobiletin (NOB) on lipopolysaccharide (LPS)-induced hPDLcs in periodontal ligament cells. **Methods** hPDLcs cells were divided into control group, model group (hPDLcs cells were treated with $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS for 24 h), NOB-H group (Based on the model group, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NOB was given for 24 h), NOB + oe-NC group (hPDLcs cells transfected with oe-NC were treated with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NOB) and NOB +

oe - circRASA2 group (hPDLs cells transfected with oe - circRASA2 were treated with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NOB). Quantitative real time polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression levels of *circRASA2*. The secretion levels of inflammation - related factors were detected by enzyme - linked immunosorbent assay. Western blot analysis of slit homolog 2 (Slit2)/mitogen - activated protein kinase (MAPK) signaling pathway related protein expression levels. **Results** The relative expression levels of *circRASA2* in control group, model group and NOB - H group were 1.00 ± 0.15 , 2.83 ± 0.50 and 1.36 ± 0.27 , respectively. The levels of interleukin - 1β in control group, model group, NOB - H group, NOB + oe - NC group and NOB + oe - circRASA2 group were (144.82 ± 24.89), (367.54 ± 65.73), (228.51 ± 40.24), (219.78 ± 36.94) and (324.25 ± 61.57) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; interleukin - 18 levels were (167.50 ± 27.33), (394.68 ± 74.96), (212.47 ± 39.51), (205.93 ± 41.18) and (358.11 ± 66.27) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of Slit2 protein were 1.00 ± 0.18 , 2.35 ± 0.41 , 1.61 ± 0.29 , 1.57 ± 0.27 and 2.14 ± 0.38 , respectively; the ratios of phospho - p38 mitogen - activated protein kinase/p38 mitogen - activated protein kinase protein were 1.00 ± 0.16 , 2.08 ± 0.37 , 1.39 ± 0.25 , 1.33 ± 0.21 and 1.92 ± 0.34 , respectively. The above indexes in the model group were compared with the control group, the NOB - H group was compared with the model group, and the NOB + oe - circRASA2 group was compared with the NOB + oe - NC group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** NOB alleviates LPS - induced inflammation and inhibits pyroptosis in hPDLs cells by inhibiting *circRASA2* expression, possibly by inhibiting Slit2/MAPK signaling pathway.

Key words: nobiletin; circular RNA RAS p21 protein activator 2; periodontal ligament cell; pyroptosis; slit homolog 2/mitogen - activated protein kinase pathway

牙周炎由菌斑微生物等多因素共同导致,是成年人牙齿松动和脱落的主要原因,被认为是世界上最常见且严重的口腔疾病之一。促炎细胞因子在细菌刺激和组织破坏中起着重要作用^[1]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为菌斑微生物的主要成分之一,能够诱导牙周膜细胞产生炎症反应,进而促进牙周炎的发展。近年来,有研究指出,环状RNA(circular RNA, circRNA)作为一类具有共价闭合结构的非编码RNA分子,在牙周炎病理过程中参与炎症反应、细胞凋亡及骨代谢失衡的调控^[2]。川陈皮素(nobiletin, NOB)是一种主要存在于柑橘类水果中的多甲氧基黄酮,近年来因其显著的抗氧化、抗炎及抗癌等活性而备受瞩目^[3]。有研究表明,NOB能够抑制多种炎症介质的释放,减轻组织损伤,其抗炎作用机制与抑制核因子 κB 和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen - activated protein kinase, MAPK)等信号通路的活化密切相关^[4]。本研究旨在探讨NOB通过介导circRAS p21蛋白激活因子2(RAS p21 protein activator 2, RASA2)调控SLIT同源物2(slit homolog 2, Slit2)/MAPK信号通路对LPS诱导下牙周膜细胞的抗炎作用与细胞焦亡的机制,以期为牙周炎的防治提供新的策略和思路。

材料与方法

1 材料

细胞 人牙周膜细胞hPDLs,购自武汉赛奥斯生物科技有限公司。

药品与试剂 NOB,规格:每瓶50 mg,批号:87257,纯度:98.29%,美国MedChemExpress公司生产。LPS,规格:每瓶10 mg,批号:123322,美国MedChemExpress公司生产。细胞计数试剂-8(cell counting kit -8, CCK -8)试剂盒,上海吉至生化科技有限公司生产;SYBR Green 实时定量反转录聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT - PCR)试剂盒,北京百奥莱博科技有限公司生产;白细胞介素- 1β (interleukin - 1β , IL - 1β)酶联免疫吸附试验(enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,上海原鑫生物科技有限公司生产;白细胞介素-18(interleukin - 18, IL - 18)ELISA试剂盒,上海研玑生物技术有限公司生产;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)ELISA试剂盒,常达恩生物科技(上海)有限公司生产;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH - DA)活性氧(reactive oxygen species, ROS)荧光探针,上海贝博生物科技有限公司生产;Gasdermin D - N端片段

(Gasdermin D *N*-terminal domain, GSDMD-NT)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、磷酸化-p38 丝裂原活化蛋白激酶(phospho-p38 mitogen-activated protein kinase, p-P38 MAPK)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体,均为英国 Abcam 公司生产。

仪器 SPectra Max M2 多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司产品;CFX96 荧光定量分析仪,美国 Bio-Rad 公司产品;CKX41SF 生物显微镜,日本 Olympus 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[5]、细胞分组与给药方法

用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养基在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内常规培养 hPDLcs 细胞。将 hPDLcs 细胞分为对照组、模型组、NOB-L 组、NOB-M 组、NOB-H 组、NOB+oe-NC 组和 NOB+oe-circRASA2 组。对照组 hPDLcs 细胞正常培养,不做处理;模型组 hPDLcs 细胞以 10 μg·mL⁻¹ LPS 处理 24 h;NOB-L 组在模型组的基础上,给予 5 μmol·L⁻¹ NOB 处理 24 h;NOB-M 组在模型组的基础上,给予 10 μmol·L⁻¹ NOB 处理 24 h;NOB-H 组在模型组的基础上给予 20 μmol·L⁻¹ NOB 处理 24 h;NOB+oe-NC 组用 20 μmol·L⁻¹ NOB 处理转染 oe-NC 的模型组 hPDLcs 细胞;NOB+oe-circRASA2 组用 20 μmol·L⁻¹ NOB 处理转染 oe-circRASA2 的模型组 hPDLcs 细胞。

2.2 CCK-8 法检测各组细胞存活率^[6]

将 hPDLcs 细胞按 3 000 个的密度接种于 96 孔板,置于含 10% 胎牛血清的培养基中,在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,各组细胞分别用 5、10、20 μmol·L⁻¹ NOB 处理,继续培养 24 h。每组设 6 个复孔。培养完成后,吸弃原培养基,每孔中加入 10% CCK-8 工作液 100 μL,37 ℃ 避光孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度(optical density, OD),并以空白组(无细胞孔)调零。细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空白 OD 值)/(对照组 OD 值-空白 OD 值)×100%。

2.3 qRT-PCR 法检测 circRASA2、炎症、氧化应激和焦亡相关 mRNA 的表达情况^[6]

收集各组细胞,裂解并提取总 RNA,逆转录为 cDNA,然后进行扩增反应。扩增程序:预变性,95 ℃,2 min;变性,95 ℃,15 s,退火/延伸 95 ℃,20 s,45 个

循环。以 GAPDH 为内参,用 2^{-ΔΔCT} 法计算 circRASA2、Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR-2)、TLR-4、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)、含 CARD 的凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、胱天蛋白酶-1、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)相对表达水平。

2.4 ELISA 法检测炎症相关因子与 LDH 的分泌水平^[6]

将各组 hPDLcs 细胞以 1.2×10⁴ r·min⁻¹ 离心 10 min,去除细胞碎片及杂质,吸取上清液分装冻存于-80 ℃ 备用。按照相应 ELISA 试剂盒检测 IL-1β、IL-18 与 LDH 的水平:预先用标准品稀释液配制浓度梯度,随后进行加样,37 ℃ 避光孵育 45 min。洗涤液清洗 5 次后,每孔加入显色底物,室温避光反应 15 min,终止液终止反应,用酶标仪在 450 nm 处测定 OD,通过标准曲线计算样本中炎症因子及 LDH 浓度。

2.5 DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 水平^[7]

将 hPDLcs 细胞以每孔 5×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板,于在 37 ℃、5% CO₂ 在含 10% 胎牛血清的培养基中培养 24 h 至细胞贴壁。弃去培养基,每孔加入含 10 μmol·L⁻¹ DCFH-DA 荧光探针的无血清培养基,37 ℃ 避光孵育 30 min。弃去探针溶液,用预冷磷酸盐缓冲溶液轻柔洗涤 3 次以去除未内化探针。用荧光显微镜观察,随机选取 5 个视野拍摄绿色荧光图像。用 Image J 软件定量分析荧光强度。

2.6 蛋白质印迹法检测 GSDMD-NT、Slit2/MAPK 信号通路相关蛋白表达水平^[8]

将各组 hPDLcs 细胞弃去培养基,预冷洗涤 3 次后,加入裂解液冰上裂解 30 min。提取总蛋白,定量总蛋白浓度。取等量蛋白(30 μg)经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,湿转法转至聚偏二氟乙烯膜。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入一抗 4 ℃ 孵育过夜,洗膜 3 次,加入二抗室温孵育 1 h。化学发光显影,用 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参计算各蛋白的相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 NOB 对各组 hPDLCs 细胞活性的影响

对照组 hPDLCs 细胞正常培养,不做处理;模型组 hPDLCs 细胞以 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 处理 24 h;NOB-L 组基于模型组,给予 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB 处理 24 h;NOB-M 组基于模型组,给予 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB 处理 24 h;NOB-H 组基于模型组,给予 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB 处理 24 h。

模型组与对照组相比,细胞存活率显著降低($P<0.01$);不同浓度 NOB 处理下,与模型组相比,药物处理各组细胞存活率不同程度升高,其中 NOB-H 组差异最为显著($P<0.05,P<0.01$),见表 1。

表 1 不同浓度川陈皮素(NO B)处理下各组细胞存活率的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the cell survival rate of each group treated with different concentrations of nobiletin (NOB; $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Cell survival rate(%)
Control	6	100.00 $\pm$ 1.19
Model	6	60.17 $\pm$ 8.32 ^{**}
NOB-L	6	71.95 $\pm$ 9.16 [#]
NOB-M	6	80.24 $\pm$ 12.65 ^{##}
NOB-H	6	90.12 $\pm$ 16.04 ^{##}

Control group: hPDLCs cells were cultured normally without treatment; Model group: hPDLCs cells were treated with $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ lipopolysaccharide for 24 h; NOB-L group: Based on the model group, $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB was given for 24 h; NOB-M group: Based on the model group, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB was given for 24 h; NOB-H group: Based on the model group, $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB was given for 24 h; Compared with the control group, ^{**} $P<0.01$; Compared with the model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

表 2 各组细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18 和乳酸脱氢酶(LDH)水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-18 and lactate dehydrogenase (LDH) in cells of each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	IL-1 β (mg $\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-18(mg $\cdot\text{mL}^{-1}$)	LDH(ng $\cdot\text{mL}^{-1}$)
Control	6	144.82 $\pm$ 24.89	167.50 $\pm$ 27.33	45.61 $\pm$ 8.45
Model	6	367.54 $\pm$ 65.73 ^{**}	394.68 $\pm$ 74.96 ^{**}	112.36 $\pm$ 20.65 ^{**}
NOB-H	6	228.51 $\pm$ 40.24 ^{##}	212.47 $\pm$ 39.51 ^{##}	50.59 $\pm$ 9.18 ^{##}
NOB+oe-NC	6	219.78 $\pm$ 36.94	205.93 $\pm$ 41.18	47.32 $\pm$ 9.26
NOB+oe-circRASA2	6	324.25 $\pm$ 61.57 ^{$\Delta\Delta$}	358.11 $\pm$ 66.27 ^{$\Delta\Delta$}	96.17 $\pm$ 15.23 ^{$\Delta\Delta$}

NOB+oe-NC group: hPDLCs cells transfected with oe-NC in model group were treated with $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB; NOB+oe-circRASA2 group: hPDLCs cells transfected with oe-circRASA2 in model group were treated with $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB; Compared with control group, ^{**} $P<0.01$; Compared with the model group, ^{##} $P<0.01$; Compared with NOB+oe-NC group, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$.

2 NOB 对各组 hPDLCs 细胞中 circRASA2 表达水平的影响

对照组、模型组、NOB-L 组、NOB-M 组和 NOB-H 组的 circRASA2 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.83 ± 0.50 、 2.25 ± 0.39 、 1.67 ± 0.32 和 1.36 ± 0.27 。模型组与对照组相比,circRASA2 相对表达水平显著升高;与模型组相比,不同浓度 NOB 处理下,各组中 circRASA2 相对表达水平均显著降低(均 $P<0.05$),其中 NOB-H 组差异最显著,故选用 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB 进行后续实验。

3 NOB 通过 circRASA2 影响各组 hPDLCs 细胞炎症水平

NOB+oe-NC 组用 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB 处理转染 oe-NC 的模型组 hPDLCs 细胞;NOB+oe-circRASA2 组用 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NOB 处理转染 oe-circRASA2 的模型组 hPDLCs 细胞。

模型组与对照组相比,IL-1 β 、IL-18 与 LDH 水平均显著升高(均 $P<0.01$);NOB-H 组与模型组相比,IL-1 β 、IL-18 与 LDH 水平均显著降低(均 $P<0.01$);NOB+oe-circRASA2 组与 NOB+oe-NC 组相比,IL-1 β 、IL-18 与 LDH 水平均显著升高(均 $P<0.01$),见表 2。

模型组、对照组、NOB-H 组、NOB+oe-NC 组和 NOB+oe-circRASA2 组的 TLR-2 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 3.83 ± 0.70 、 2.05 ± 0.36 、 1.97 ± 0.3 和 3.59 ± 0.67 ,TLR-4 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.16 、 3.27 ± 0.59 、 1.82 ± 0.34 、 1.74 ± 0.31 和 2.91 ± 0.54 。模型组与对照组相比,TLR-2、TLR-4 mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P<0.01$);NOB-H 组与模型组相比,TLR-2、TLR-4 mRNA 相对表达水平均显著降低(均 $P<0.001$);NOB+oe-circRASA2 组与 NOB+oe-NC 组相比,

TLR-2、*TLR-4* mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$)。

4 NOB 通过 circRASA2 影响各组 hPDLCs 细胞氧化应激水平

模型组与对照组相比,ROS 荧光强度显著升高,*SOD* mRNA 相对表达水平显著降低(均 $P < 0.01$); NOB-H 组与模型组相比,ROS 荧光强度显著降低,*SOD* mRNA 相对表达水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); NOB + oe - circRASA2 组与 NOB + oe - NC 组相比,ROS 荧光强度显著升高,*SOD* mRNA 相对表达水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果见表 3。

5 NOB 通过 circRASA2 影响各组 hPDLCs 细胞焦亡水平

模型组与对照组相比,*NLRP3*、*ASC*、胱天蛋白酶-1 mRNA 相对表达水平显著升高; NOB-H 组与模型组相比,*NLRP3*、*ASC*、胱天蛋白酶-1 mRNA 相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$); NOB + oe - circRASA2 组与 NOB + oe - NC 组相比,*NLRP3*、*ASC*、胱天蛋白酶-1 mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.01$),见表 4。

模型组与对照组相比,GSDMD-NT 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.01$); NOB-H 组与模型组相比,GSDMD-NT 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.01$); NOB + oe - circRASA2 组与 NOB + oe - NC 组相比,GSDMD-NT 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.01$),见表 4。

6 川陈皮素通过 circRASA2 介导 Slit2/MAPK 信号通路

模型组、对照组、NOB-H 组、NOB + oe - NC 组和

NOB + oe - circRASA2 组的 Slit2 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 2.35 ± 0.41 、 1.61 ± 0.29 、 1.57 ± 0.27 和 2.14 ± 0.38 , p - P38 MAPK/P38 MAPK 分别为 1.00 ± 0.16 、 2.08 ± 0.37 、 1.39 ± 0.25 、 1.33 ± 0.21 和 1.92 ± 0.34 。模型组与对照组相比,Slit2 蛋白相对表达水平和 p - P38 MAPK/P38 MAPK 比值均显著升高(均 $P < 0.01$); NOB-H 组与对照组相比,Slit2 蛋白相对表达水平和 p - P38 MAPK/P38 MAPK 比值均显著降低(均 $P < 0.01$); NOB + oe - circRASA2 组与 NOB + oe - NC 组相比,Slit2、p - P38 MAPK/P38 MAPK 比值均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 1。

表 3 各组细胞中活性氧(ROS)相对荧光强度和超氧化物歧化酶(SOD) mRNA 相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the relative fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS) and relative expression level of superoxide dismutase (SOD) mRNA in cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Relative fluorescence intensity of ROS	SOD mRNA
Control	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.17
Model	$1.78 \pm 0.32^{**}$	$0.64 \pm 0.08^{**}$
NOB-H	$1.31 \pm 0.25^{\#}$	$0.91 \pm 0.15^{\#\#}$
NOB + oe - NC	1.26 ± 0.22	0.93 ± 0.12
NOB + oe - circRASA2	$1.72 \pm 0.30^{\Delta}$	$0.70 \pm 0.11^{\Delta\Delta}$

Dose and *n* refer to tablet 2; Compared with control group, $^{**}P < 0.01$; Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with NOB + oe - NC group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

表 4 各组细胞中焦亡相关基因 mRNA 相对表达水平和 Gasdermin D-N 端片段(GSDMD-NT)蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative mRNA expression levels of pyroptosis related genes and Relative expression levels of Gasdermin D N-terminal domain (GSDMD-NT) protein in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>NLRP3</i> mRNA	<i>ASC</i> mRNA	<i>caspase-1</i> mRNA	GSDMD-NT
Control	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.20
Model	$3.71 \pm 0.63^{**}$	$4.96 \pm 0.91^{**}$	$4.53 \pm 0.85^{**}$	$1.71 \pm 0.28^{**}$
NOB-H	$1.95 \pm 0.37^{\#\#}$	$2.11 \pm 0.38^{\#\#}$	$1.64 \pm 0.27^{\#\#}$	$1.13 \pm 0.20^{\#\#}$
NOB + oe - NC	2.04 ± 0.34	2.15 ± 0.42	1.71 ± 0.31	1.10 ± 0.17
NOB + oe - circRASA2	$3.58 \pm 0.69^{\Delta\Delta}$	$4.74 \pm 0.87^{\Delta\Delta}$	$4.19 \pm 0.74^{\Delta\Delta}$	$1.67 \pm 0.31^{\Delta\Delta}$

Dose and *n* refer to tablet 2; *NLRP3*: NOD-like receptor family pyrin domain containing 3; *ASC*: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$; Compared with the model group, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with NOB + oe - NC group, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$.

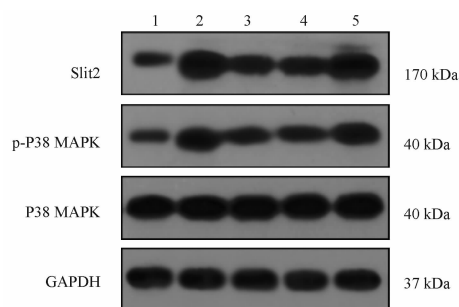


图1 各组细胞中SLIT同源物2(Slit2)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路蛋白水平的比较

Figure 1 Comparison of slit homolog 2 (Slit2)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway protein levels in each group

Slit2: Slit homolog 2; p-P38 MAPK/P38 MAPK: Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase/p38 mitogen-activated protein kinase; 1: Control group; 2: Model group; 3: NOB-H group; 4: NOB+oe-NC group; 5: NOB+oe-circRASA2 group.

讨论

牙周炎是由口腔细菌感染引起的牙周组织炎症性疾病,这些细菌诱导产生的活性氧及自由基不仅会引发炎症反应,还会促使破骨细胞活化增殖,最终导致牙周组织退化、牙槽骨吸收、牙齿松动,甚至脱落^[9]。有研究发现,circRASA2在牙周炎患者的牙周组织中表达上调,促进了牙周炎的进展^[10]。NOB是传统中药陈皮的活性成分之一,有抗炎和抗糖尿病的作用,还可以减轻细胞氧化应激损伤^[11]。本研究发现,不同浓度NOB处理后,各组细胞存活率不同程度升高,circRASA2相对表达水平均显著降低,提示NOB可能通过抑制circRASA2表达,进而改善LPS诱导的hPDLs细胞损伤,提高细胞活性。分析其作用可能是NOB通过抑制circRASA2表达,阻断其介导的下游信号通路,从而减轻炎症反应,促进牙周组织细胞的修复和再生。

当炎症反应发生时,细胞脂质以及蛋白质代谢异常,LDH水平升高^[12]。有研究发现,TLR-4在牙周炎中高表达,其介导的炎症通路参与牙周炎的发病机制^[13]。此外,牙周炎患者的牙龈组织中产生的大量ROS导致氧化还原失衡,引起组织破坏,加剧氧化应激,进而加重炎症反应^[14]。NLRP3炎症小体复合物是宿主先天免疫的关键组成部分,包含NLRP3、ASC及胱天蛋白酶-1前体蛋白,在炎症反应的多个环节中发挥作用,能够触发白细胞介素等炎症细胞因子的表达,加剧机体的炎症反应,从而加速牙周组织的损

伤及牙槽骨的吸收过程^[15-17]。王晓雨等^[18]研究发现,慢性牙周炎牙周组织的细胞焦亡水平高于健康人,GSDMD-NT、胱天蛋白酶-1、NLRP3、IL-1 β mRNA的表达量明显上调。董传莹等^[19]研究发现,NOB处理能降低IL-1 β 、胱天蛋白酶-1、NLRP3、ASC水平,改善hPDLs细胞损伤。本研究发现,NOB-H组的IL-1 β 、IL-18、LDH、ROS、GSDMD-NT水平和TLR-2、TLR-4、NLRP3、ASC、胱天蛋白酶-1 mRNA相对表达水平均较模型组显著降低,说明NOB能够抑制炎症反应,减轻氧化应激水平,并通过抑制NLRP3炎症小体,改善LPS诱导的hPDLs细胞损伤。分析其调控机制可能是NOB通过直接抑制NLRP3炎症小体的组装和激活,减少炎症细胞因子的释放,从而减轻牙周组织的炎症反应。此外,NOB对NLRP3炎症小体的抑制作用可能与其抗氧化活性有关,通过清除ROS,减轻氧化应激,间接抑制NLRP3的激活。

MAPK是重要的炎症调控信号。有研究发现,雷公藤甲素能通过抑制P38 MAPK等通路减轻大鼠牙周炎症,改善骨吸收^[20]。Slit2在炎症环境中进一步上调,其过表达可增加炎症介质表达,加重牙周炎。代喆颖等^[21]发现,大豆异黄酮能通过抑制Slit2/P38 MAPK信号通路,减少牙周炎大鼠牙周组织炎症反应和牙槽骨吸收。本研究发现,NOB可能通过抑制Slit2/MAPK信号通路,减少炎症介质的释放,从而发挥抗炎和保护作用。值得注意的是,NOB对Slit2/MAPK信号通路的抑制作用可能与其对circRASA2的调控密切相关,circRASA2可能作为上游调控因子,影响Slit2的表达和活性,进而影响MAPK通路的激活状态。因此,深入研究circRASA2、Slit2和MAPK之间的相互作用关系,将有助于更全面地理解NOB在牙周炎治疗中的作用机制。

本研究提示:NOB通过抑制circRASA2表达,减轻LPS诱导的hPDLs细胞炎症水平,抑制细胞焦亡,可能是通过抑制Slit2/MAPK信号通路实现的。

参考文献:

- [1] 邱枫,杜宇,罗惠冰,等. SOCS6通过JAK2/STAT3信号通路对人牙周膜成纤维细胞炎症及凋亡的影响[J]. 口腔医学研究, 2023,39(9):815-820.
- [2] 沈想,王陈飞,张敏,等. CircRNA-TRMP7靶向调控NLRP3炎症小体在小鼠Ⅱ型糖尿病牙周组织炎症中的作用机制[J]. 实用口腔医学杂志, 2023,39(5):607-611.
- [3] 曹雯,徐玉祥,范丽,等. 川陈皮素通过激活SIRT1/FOXO3a信号来减轻肾缺血再灌注损伤[J]. 世界中医药, 2023,18(15):2134-2141.

- [4] 迟文鑫,张存鑫,高凯,等. 川陈皮素抑制 BV2 小胶质细胞炎症反应的机制[J]. 中国组织工程研究,2025,29(7):1321—1327.
- [5] 郑广明,张健,张文怡. 低频磁刺激对高糖诱导人牙周膜细胞损伤的保护作用[J]. 口腔医学研究,2019,35(12):1177—1181.
- [6] 万芳,马利方. 叶黄素通过 SIRT1/NLRP3 信号通路提高人视网膜色素上皮细胞存活率的机制研究[J]. 天津医药,2021,49(2):131—135.
- [7] 王浩宇,王宇琪,王冰倩,等. 美沙拉嗪对 RAW264.7 细胞中促炎因子和过氧化物的抑制作用及其对牙周炎模型大鼠的治疗作用[J]. 吉林大学学报(医学版),2024,50(5):1250—1258.
- [8] 谢丛蔓,林敏,田浩楠,等. 虾青素抑制脂多糖诱导人牙周膜细胞炎症反应[J]. 中南大学学报(医学版),2021,46(3):227—233.
- [9] 苏娟娟,朱永翠,张文玲. 连翘苷对牙周炎大鼠 p38 MAPK/c-Fos 信号通路及破骨细胞活化的影响[J]. 口腔医学研究,2021,37(1):33—38.
- [10] 谢冰,杨振宇,汤旭娜. circRASA2 靶向 miR-543/TRAF6 轴对 LPS 诱导的牙周膜细胞增殖和成骨分化的影响[J]. 上海口腔医学,2023,32(2):147—153.
- [11] 罗丹,王燕,丁旭,等. 川陈皮素调节 AMPK/NLRP3 信号通路对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞炎症损伤的影响[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(2):224—229.
- [12] 杨婷婷,黄一丹,杨蓉蓉,等. 2 型糖尿病合并慢性牙周炎患者血清 LRG1/LDH 与牙周指标和牙周病变程度的关系[J]. 实用医学杂志,2024,40(16):2250—2255.
- [13] 王丹,刘雨笛,邵丽萍,等. 黄芪甲苷抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路对牙周炎正畸大鼠牙周组织重塑的影响[J]. 实用口腔医学杂志,2023,39(6):722—729.
- [14] 潘璇,徐正茂,向国林,等. 南蛇藤素调节 HMGB1-RAGE 信号通路对牙周炎大鼠牙周组织损伤的影响[J]. 口腔医学研究,2024,40(9):827—833.
- [15] 黎乃维,钟雨芬,熊林欣,等. 黄芩苷调控 NLRP3 炎症小体活化在牙周炎性骨吸收治疗中的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(19):2866—2870.
- [16] 蔡红宣,王正安,张赞,等. 巴戟天多糖通过上调沉默信息调节因子 1 抑制炎症牙周膜细胞 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 的表达及活性[J]. 华西口腔医学杂志,2023,41(6):662—670.
- [17] 翟浩嫣,赵圆,范登莹,等. 活性氧影响牙周炎发生发展及牙周组织再生[J]. 中国组织工程研究,2024,28(14):2254—2260.
- [18] 王晓雨,叶庆元,张曦戈,等. 牙周炎和健康人牙周组织中细胞焦亡水平的比较研究[J]. 实用口腔医学杂志,2023,39(2):181—186.
- [19] 董传莹,薛飞,郝瑞,等. 川陈皮素对脂多糖诱导的牙周膜细胞损伤和 NOD 样受体蛋白 3 炎性通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(17):2013—2017.
- [20] 蔡烨华,李星,赵艳霞,等. 雷公藤甲素调控 p38 MAPK/ERK/JNK 信号通路对正畸牙移动模型大鼠牙周炎症及破骨细胞的影响[J]. 口腔医学研究,2024,40(11):978—984.
- [21] 代喆颖,郭怡,刘阳,等. 大豆异黄酮抑制 Slit2/MAPK 信号通路对牙周炎大鼠牙槽骨吸收和炎症反应的影响[J]. 中国免疫学杂志,2024,40(6):1131—1136. (收稿日期 2024-10-25)

· 信息 · 书讯 · 其他 ·

作者更正

刘姚姚,季萍,李耘,崔兰卿于 2022,38(7):688—692,698 发表的《无乳链球菌的耐药性及对利奈唑胺不敏感的机制分析》,现增补基金项目,基金项目为国家自然科学基金资助项目(81702039)。