

- [30] 国家药品监督管理局药品审评中心. 2022 年度药品审评报告 [EB/OL]. (2023-09-06) [2023-11-21]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/849b5a642142fc00738aff200077db11>.
- [31] FDA. Risk evaluation and mitigation strategies: REMS [EB/OL]. (2023-05-16) [2023-11-21]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/risk-evaluation-and-mitigation-strategies-rems>.
- [32] HUYNH L, TOYSERKANI GA, MORRATO EH. Pragmatic applications of implementation science frameworks to regulatory science: an assessment of FDA risk evaluation and mitigation strategies (REMS) (2014-2018) [J]. BMC Health Serv Res, 2021, 21 (1): 779.
- [33] LEM J, YOUNUS M, ARAM JA, et al. Evaluation of the effectiveness of additional risk minimization measures for voriconazole in the EU: findings and lessons learned from a healthcare professional survey [J]. Pharmaceut Med, 2019, 33(2): 121-133.
- [34] IRANZO A, SERRALHEIRO P, SCHULLER JC, et al. Evaluation of the effectiveness of the risk minimization measures of sodium oxybate in the European Union [J]. Drugs Real World Outcomes, 2020, 7 (4): 307-315.

[文章编号] 1007-7669 (2024) 08-0594-06

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.08.06

## 人参皂苷 Rb1 通过 SDF-1/CXCR4 通路调节牙周膜干细胞增殖及成骨分化

吴 珊, 赵国廷, 董振耀, 马秀花, 姚毅章

(青海省第五人民医院 口腔科, 青海 西宁 810007)

[关键词] 人参皂苷 Rb1; 基质细胞衍生因子 1; CXCR4 趋化因子受体 4; 牙周组织; 间质干细胞移植; 细胞增殖

[摘要] 目的 观察人参皂苷 Rb1 (GsRb1) 对人牙周膜干细胞 (hPDLSCs) 增殖和成骨分化的影响, 及其与基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) /CXCR4 趋化因子受体 4 (CXCR4) 通路相关分子机制。方法 采用酶消化法分离、培养 hPDLSCs, 倒置显微镜下观察细胞形态, 流式细胞术检测基质细胞抗原 1 (STRO-1)、分化簇 146 (CD146) 阳性细胞比例; 分别用 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GsRb1 处理 hPDLSCs, CCK-8 法筛选最佳作用浓度。将 hPDLSCs 分为对照组、GsRb1 (4.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组、AMD3100 (5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 组、GsRb1+AMD3100 组, 比较各组细胞增殖活力和碱性磷酸酶 (ALP) 活性, RT-qPCR 检测 Runt 相关基因 2 (Runx2)、*osterix*、骨桥蛋白 (OPN) mRNA 表达情况, 茜素红染色、定量分析检测 hPDLSCs 中矿化结节形成量, Western blot 法检测 SDF-1/CXCR4 信号通路相关蛋白表达情况。结果 hPDLSCs 呈放射状排列, 形态为长梭形, 生长较为致密, STRO-1、CD146 阳性细胞比例分别为 97.19%、98.01%。随着 GsRb1 浓度的增加, hPDLSCs 增殖活力增强, 呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, GsRb1 组细胞增殖活力、ALP 活性增强, *runx2*、*osterix*、*OPN* mRNA 表达增加, 矿化结节形成量及 SDF-1、CXCR4 蛋白表达均增加 ( $P < 0.05$ ), 而 AMD3100 组与之相反 ( $P < 0.05$ )。与 GsRb1 组比较, GsRb1+AMD3100 组细胞增殖活力、ALP 活性降低, *Runx2*、*osterix*、*OPN* mRNA 表达降低, 矿化结节形成量及 SDF-1、CXCR4 蛋白表达均减少 ( $P < 0.05$ )。结论 GsRb1 能够促进 hPDLSCs 增殖及成骨分化, 可能与增加 SDF-1/CXCR4 信号通路蛋白表达有关。

[中图分类号] R285; R781

[文献标志码] A

## Ginsenoside Rb1 regulates proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by SDF-1/CXCR4 signaling pathway

[收稿日期] 2022-12-14 [接受日期] 2024-03-25

[作者简介] 吴珊, 女, 主治医师, 学士, 主要从事口腔医学的研究, E-mail: scusom@163.com。姚毅章, 男, 主任医师, 学士, 主要从事口腔医学的研究, E-mail: 2439684209@qq.com

[责任作者] 姚毅章

WU Shan, ZHAO Guo-ting, DONG Zhen-yao, MA Xiu-hua, YAO Yi-zhang

(Department of Stomatology, the Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining QINGHAI 810007, China)

[KEY WORDS] ginsenoside Rb1; stromal cell-derived factor 1; CXC chemokine receptor 4; periodontium; mesenchymal stem cells transplantation; cell proliferation

[ABSTRACT] AIM To observe the influences of ginsenoside Rb1 (GsRb1) on the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs), and its molecular mechanism related to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) pathway. METHODS hPDLSCs were isolated and cultured by enzyme digestion method. Cell morphology was observed under an inverted microscope. Flow cytometry was used to detect the proportion of stromal cell antigen 1 (STRO-1) and cluster of differentiation 146 (CD146) positive cells. hPDLSCs were treated with 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GsRb1, respectively, and the optimal concentration was screened by CCK-8 method. hPDLSCs were divided into control group, GsRb1 (4.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) group, AMD3100 (5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) group, and GsRb1+AMD3100 group, the cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of each group were compared, the mRNA expression of Runt-related gene 2 (Runx2), *osterix*, and osteopontin (OPN) were detected by qRT-PCR, and the formation of mineralized nodules in hPDLSCs was detected by alizarin red staining and quantitative analysis. Western blot was used to detect the expression of SDF-1/CXCR4 signaling pathway-related proteins. RESULTS hPDLSCs were arranged radially, with long spindles, and the growth was relatively dense. The proportions of STRO-1 and CD146 positive cells were 97.19% and 98.01%, respectively. With the increase of GsRb1 concentration, the proliferation activity of hPDLSCs was enhanced in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the cell viability and ALP activity in the GsRb1 group were enhanced, and the mRNA expression of *Runx2*, *osterix*, *OPN*, the amount of mineralized nodules, and the protein expression of SDF-1 and CXCR4 were increased ( $P < 0.05$ ), while the AMD3100 group was the opposite ( $P < 0.05$ ). Compared with the GsRb1 group, the cell viability and ALP activity in the GsRb1+AMD3100 group were decreased, and the mRNA expression of *Runx2*, *osterix*, *OPN*, the amount of mineralized nodules, and the protein expression of SDF-1 and CXCR4 were decreased ( $P < 0.05$ ). CONCLUSION GsRb1 can promote the proliferation and osteogenic differentiation of hPDLSCs, which may be related to the increased protein expression of SDF-1/CXCR4 signaling pathway.

牙周炎是一种常见的口腔疾病,以牙周支持组织的不可逆损伤或丢失为特征<sup>[1]</sup>。随着分子生物学、组织工程和干细胞技术的快速发展,牙周再生技术在牙周炎治疗中的应用得到了越来越多的探索。人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)被认为是牙周再生技术关键的种子细胞,具有良好的多向分化和自我更新能力,其成骨分化在牙周再生和修复中发挥重要作用<sup>[2,3]</sup>。

人参皂苷 Rb1 (ginsenoside Rb1, GsRb1) 是人参的主要活性成分之一,具有保护衰老神经、抗细胞凋亡、调节内皮细胞功能、促进细胞生长等作用<sup>[4]</sup>。此外,大量研究证实 GsRb1 具有良好的调节骨代谢和促进成骨分化的作用<sup>[5,6]</sup>。但 GsRb1 在 hPDLSCs 成骨分化中的作用尚不清楚。基质细胞衍生因子 1 (SDF-1)/CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4) 作为在细胞成骨分化中发挥重要作用的信号通路已被广泛研究<sup>[7]</sup>。有报道称, GsRb1 可通过激活 SDF-1/CXCR4

信号通路逆转同型半胱氨酸诱导的内皮细胞功能障碍或促进骨源间充质干细胞的迁移<sup>[8,9]</sup>。本研究通过分离培养 hPDLSCs, 观察 GsRb1 对 hPDLSCs 增殖及成骨分化的影响, 同时检测 SDF-1/CXCR4 信号通路相关作用机制, 初步验证 GsRb1 在牙周再生中的调控作用。

## 材料与方法

药物、试剂与仪器 GsRb1 (纯度 98%) 购自上海源叶生物科技有限公司, 用 DMSO 溶解成 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液, 使用时用培养基稀释至所需浓度。SDF-1/CXCR4 信号通路抑制剂 AMD3100 购自 MedChemExpress 公司, PE 标记的基质细胞抗原 1 (STRO-1)、FITC 标记的分化簇 146 (CD146) 抗体和兔源一抗 anti-SDF-1、anti-CXCR4、anti- $\beta$ -actin 购自 Abcam 公司, CCK-8 试剂盒、碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒购自碧云天生物技术公司, Runt 相关基因 2 (Runx2)、*osterix*、骨桥蛋白

(OPN)、 $\beta$ -actin 引物由北京全式金生物技术公司设计合成, 茜素红染色试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司, RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、山羊抗兔二抗购自爱必信生物技术公司。Thermo Multiskan™ FC 酶标仪 (上海联迈生物工程公司), FACSCanto II 流式细胞仪 (美国, BD), ABI 7500 RT-qPCR 仪 (美国, ABI), Tanon 4100 凝胶成像分析系统 (上海天能科技公司)。**hPDLSCs 的分离培养**<sup>[10]</sup> 经患者同意后, 收集 12~18 岁 10 例 (女性 5 例, 男性 5 例) 因正畸而拔除的完整且健康的前磨牙。采用酶消化法分离 hPDLSCs, 无菌 PBS 冲洗后刮取根中 1/3 牙周膜组织, 剪成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块, 加入  $\alpha$ -MEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素) 并移至离心管中, 加入 3 mg·mL<sup>-1</sup> 胶原酶 I、4 mg·mL<sup>-1</sup> 分散酶于 37 °C 消化 1 h, 终止消化后离心、弃上清, 用  $\alpha$ -MEM 培养基重悬并接种至培养瓶中, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行常规传代培养, 收集第 3 代细胞, 进行后续实验。

**hPDLSCs 表型鉴定** 采用流式细胞术, 将收集的 hPDLSCs 离心、弃上清后转移至流式管中 (每管 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞), 加入 PE-STRO-1、FITC-CD146 抗体, 4 °C 孵育 30 min 后采用流式细胞仪测定 STRO-1、CD146 阳性细胞比例。

**细胞增殖** 将收集的 hPDLSCs 分别用含 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> GsRb1 的  $\alpha$ -MEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素) 制备单细胞悬液, 以每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种至 96 孔板内进行培养, 48 h 后加入 CCK-8 试剂并继续培养 2 h, 酶标仪测定各孔细胞于 450 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 细胞增殖活力用 A<sub>450</sub> 值表示。

将收集的 hPDLSCs 分别用  $\alpha$ -MEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素) (对照组)、含 4.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> GsRb1 的  $\alpha$ -MEM 培养基 (GsRb1 组)、含 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> AMD3100 的  $\alpha$ -MEM 培养基<sup>[11]</sup> (AMD3100 组)、含 4.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> GsRb1+5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> AMD3100 的  $\alpha$ -MEM 培养基 (GsRb1+AMD3100 组) 制备单细胞悬液, 每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种至 96 孔板内, 培养 48 h 后 CCK-8 法检测 hPDLSCs 细胞增殖活力。

**成骨分化相关指标** hPDLSCs 以每孔 5 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种至 24 孔板内, 分组后待细胞融合至 60% 时, 更换为含 4.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> GsRb1 和 (或) 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> AMD3100 的成骨诱导液 (完全培养基 +100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 维生素 C+2 mmol·L<sup>-1</sup>  $\beta$ -甘油磷酸钠 +10<sup>-8</sup> mol·L<sup>-1</sup> 地塞米松)<sup>[10]</sup>, 每 2 日换液 1 次, 培养 14 d 后收集各组细胞。

**ALP 活性** 成骨诱导培养 14 d 后收集各组细胞, 加入 IP 细胞裂解液、离心取上清, 加入检测缓冲液于 37 °C 孵育 20 min, 随后终止反应, 借助酶标仪测定各孔细胞于 410 nm 波长处的 A 值, 严格按照说明书操作。

**Runx2、osterix、OPN mRNA 表达** 采用 RT-qPCR 法。成骨诱导培养 14 d 后收集各组细胞, 加入 Trizol 提取总 RNA, 测定浓度后经反转录合成 cDNA, 而后进行 cDNA 扩增, 分别以  $\beta$ -actin 为内参, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法分析扩增后的 Runx2、osterix、OPN mRNA 表达水平。引物序列如下, Runx2: 上游 5'-CACTGGCGCTGCAACAAGA-3', 下游 5'-CATTCGGAGCTCAGCAGAATAA-3'; osterix: 上游 5'-GGACCATTCCCACCTCTTCAC-3', 下游 5'-CC TTCTAGCCAGGCCCATTC-3'; OPN: 上游 5'-GATGAA TCTGATGAACTGGTCACTG-3', 下游 5'-GGTGATGTCC TCGTCTGTAGCA-3';  $\beta$ -actin: 上游 5'-GGCACCCAGC ACAATGAA-3', 下游 5'-TAGAAGCATTTGCGGTGG-3'。

**矿化结节形成** 采用茜素红染色后定量分析。成骨诱导 14 d 后, 每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 而后加入 0.1% 茜素红染色 5 min, PBS 冲洗后于光镜下观察、拍照。拍照后吸干各孔液体, 加入 10% 氯化烷基十六吡啶, 孵育 30 min, 而后借助酶标仪测定 562 nm 波长处 A 值。

**SDF-1/CXCR4 信号通路相关蛋白表达** 采用 Western blot 法。成骨诱导 14 d 后收集各组细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定浓度后进行定量、变性, 随后进行凝胶电泳分离蛋白、转膜、封闭, 孵育兔源一抗 anti-SDF-1 (1:1 000)、anti-CXCR4 (1:1 000)、anti- $\beta$ -actin (1:2 000) (4 °C 过夜), 次日室温孵育山羊抗兔二抗 (1:2 000) 2 h, 滴加 ECL 发光液后置于凝胶成像分析系统中拍照, 借助 Image J 软件进行灰度分析。

**统计学分析** 采用 SPSS 25.0 进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验。P<0.05 为有显著差异。

## 结 果

**hPDLSCs 的分离鉴定** 倒置显微镜观察显示, hPDLSCs 呈放射状排列, 形态为长梭形, 生长较为致密。流式细胞术检测显示, STRO-1、CD146 阳性细胞比例分别为 97.19%、98.01%, 见图 1。

**细胞增殖活力** 随着 GsRb1 浓度的增加, hPDLSCs 细胞活力增强, 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> GsRb1 的细胞增殖活力分别为 0.97 ± 0.03、1.12 ± 0.05、

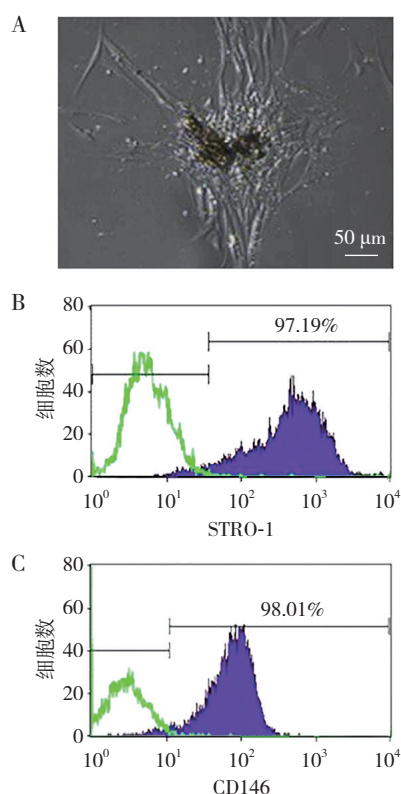


图 1 倒置显微镜下 hPDLSCs 形态 (A,  $\times 400$ ) 及流式细胞术检测 STRO-1 (B)、CD146 (C) 阳性细胞比例

$1.33 \pm 0.06$ 、 $1.61 \pm 0.08$ 、 $1.79 \pm 0.08$  和  $1.72 \pm 0.07$ , 呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ); 当 GsRb1 浓度为  $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, hPDLSCs 细胞增殖活力最强, 故选取  $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GsRb1 进行后续实验。

与对照组相比, GsRb1 组细胞增殖活力增强 ( $0.99 \pm 0.04$  vs.  $1.82 \pm 0.08$ ,  $P < 0.05$ ), AMD3100 组细胞增殖活力减弱 ( $0.57 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ); 与 GsRb1 组比较, GsRb1+AMD3100 组细胞增殖活力减弱 ( $1.45 \pm 0.06$ ,

表 1 各组人牙周膜干细胞成骨分化相关指标比较

组别	ALP 活性 / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	Runx2 mRNA	osterix mRNA	OPN mRNA
对照	$0.64 \pm 0.05$	$1.03 \pm 0.06$	$1.08 \pm 0.04$	$1.01 \pm 0.06$
GsRb1	$2.13 \pm 0.11^b$	$3.46 \pm 0.15^b$	$4.12 \pm 0.13^b$	$3.28 \pm 0.15^b$
AMD3100	$0.19 \pm 0.03^{bc}$	$0.39 \pm 0.04^{bc}$	$0.28 \pm 0.03^{bc}$	$0.31 \pm 0.04^{bc}$
GsRb1+AMD3100	$1.75 \pm 0.08^{ch}$	$2.82 \pm 0.11^{ch}$	$3.49 \pm 0.09^{ch}$	$2.62 \pm 0.09^{ch}$

ALP: 碱性磷酸酶, Runx2: Runt 相关基因 2, OPN: 骨桥蛋白, GsRb1: 人参皂苷 Rb1。经单因素方差分析: 与对照组比较,  $^b P < 0.05$ ; 与 GsRb1 组比较,  $^c P < 0.05$ ; 与 AMD3100 组比较,  $^h P < 0.05$

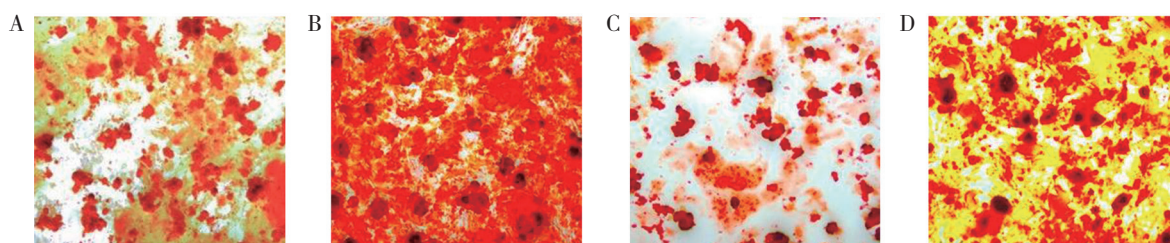


图 2 各组人牙周膜干细胞矿化结节形成茜素红染色图 ( $\times 200$ ) 组, C: AMD3100 组, D: GsRb1+AMD3100 组

$P < 0.05$ )。

**成骨分化相关指标** 与对照组比较, GsRb1 组 ALP 活性增强, Runx2、osterix、OPN mRNA 表达增加 ( $P < 0.05$ ), AMD3100 组 ALP 活性降低, Runx2、osterix、OPN mRNA 表达减少 ( $P < 0.05$ ); 与 GsRb1 组比较, GsRb1+AMD3100 组 ALP 活性减弱, Runx2、osterix、OPN mRNA 表达减少 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**矿化结节形成量** 与对照组比较, GsRb1 组 hPDLSCs 中矿化结节形成量增加 ( $0.62 \pm 0.05$  vs.  $1.71 \pm 0.09$ ,  $P < 0.05$ ), 面积大、染色深; AMD3100 组矿化结节形成量减少 ( $0.18 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ), 面积缩小, 染色变浅。与 GsRb1 组比较, GsRb1+AMD3100 组矿化结节形成量减少 ( $1.32 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ), 面积缩小, 染色变浅。见图 2。

**GsRb1 对 hPDLSCs SDF-1/CXCR4 信号通路相关蛋白表达的影响** 与对照组比较, GsRb1 组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 蛋白表达增加 ( $P < 0.05$ ), AMD3100 组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ ); 与 GsRb1 组比较, GsRb1+AMD3100 组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 蛋白表达减少 ( $P < 0.05$ )。见图 3、表 2。

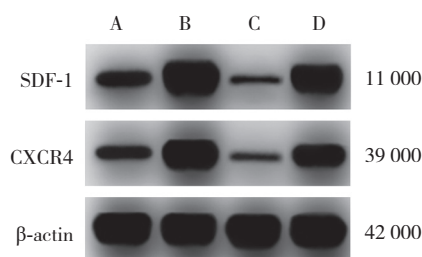


图 3 各组人牙周膜干细胞基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 和 CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4) 蛋白印迹图 A: 对照组, B: 人参皂苷 Rb1 (GsRb1) 组, C: AMD3100 组, D: GsRb1+AMD3100 组

$n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$

红色或橙黄色均是矿化结节形成。A: 对照组, B: 人参皂苷 Rb1 (GsRb1)

表 2 各组人牙周膜干细胞基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 和 CXCR4 趋化因子受体 4 (CXCR4) 蛋白表达比较  $n=4, \bar{x} \pm s$

组别	SDF-1/ $\beta$ -actin	CXCR4/ $\beta$ -actin
对照	0.46 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.04
GsRb1	1.35 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
AMD3100	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>
GsRb1+AMD3100	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>ch</sup>	0.85 $\pm$ 0.06 <sup>ch</sup>

GsRb1: 人参皂苷 Rb1。经单因素方差分析: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 GsRb1 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 AMD3100 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

牙周炎是由细菌引起的牙周组织慢性感染, 导致牙槽骨吸收, 是成人牙齿脱落的主要原因<sup>[1]</sup>。牙周炎的治疗在控制、减轻炎症的同时, 也要对缺损的牙周组织进行修复和重建, 基于牙髓干细胞的骨组织再生工程技术日益受到青睐。hPDLSCs 来源于人牙周韧带, 是高度增殖的克隆性间充质干细胞, 可分化为成骨细胞并进一步形成牙周韧带样胶原蛋白和纤维, 从而促进组织再生, 其被广泛认为是最有前景的牙周再生种子细胞<sup>[12]</sup>。此外, 许多学者通过动物实验发现, 将 hPDLSCs 植入缺损区, 可有效促进牙槽骨的再生和修复<sup>[13]</sup>。本研究结果显示, hPDLSCs 阳性表达 STOR-1、CD146 间充质干细胞表面标志物, 表明分离培养的 hPDLSCs 为间充质来源的细胞, 具有干细胞相关特性。

不理想的存活率和成骨能力是间充质干细胞移植治疗面临的主要困难, 亟待寻求有效方案以改善该问题。GsRb1 是从中草药人参的根、茎、叶中提取的活性成分。动物实验证实, GsRb1 能够改善地塞米松诱导的大鼠骨质疏松<sup>[5]</sup>; 体外实验证实, GsRb1 能够促进人脂肪干细胞、大鼠成骨细胞、大鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化<sup>[6]</sup>。但 GsRb1 是否影响 hPDLSCs 成骨分化目前仍不清楚。本研究选取 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 GsRb1 作用于 hPDLSCs, 结果显示, hPDLSCs 增殖活力增加, 表明 GsRb1 能够促进 hPDLSCs 增殖, 提示 GsRb1 可能是间充质干细胞移植治疗中能增强细胞存活率的潜在药物。本研究选择作用最明显的 4.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GsRb1 用于后续实验。ALP 活性及 Runx2、osterix、OPN 的表达水平是评估细胞成骨分化能力的常用指标, 其中 ALP 活性增加有利于钙和磷在骨组织中沉积, 进而促进骨组织矿化<sup>[14]</sup>; Runx2、osterix 能够通过激活 I 型胶原、骨钙蛋白、骨黏素等相关成骨分化基因的表达而促进成骨分化<sup>[15]</sup>; OPN 是由成骨细胞分泌的一种磷酸化糖蛋白, 其表达水平与成骨分化能力呈正相关<sup>[16]</sup>。在本研究中, GsRb1 组相比于对照组 ALP 活性增强, Runx2、

osterix、OPN mRNA 表达量明显增加, 说明 GsRb1 具有促进 hPDLSCs 成骨分化的作用, 此外矿化结节形成量明显增加, 也进一步证实 GsRb1 具有促进 hPDLSCs 成骨分化的作用。

细胞的增殖及成骨分化涉及诸多信号通路的调节, 其中 SDF-1/CXCR4 被认为发挥着关键性作用, SDF-1 与 CXCR4 相互结合后可加速钙沉积, 增强 ALP 活性, 促进多种成骨因子的表达<sup>[17]</sup>。而 GsRb1 促进 hPDLSCs 增殖及成骨分化的作用是否与激活 SDF-1/CXCR4 信号通路有关仍未可知。AMD3100 为 SDF-1/CXCR4 信号通路抑制剂, 可通过抑制 SDF-1/CXCR4 信号通路来抑制 hPDLSCs 的增殖和成骨分化, 进而抑制体内血管生成<sup>[18]</sup>。本研究发现, GsRb1 作用于 hPDLSCs 后, 不仅其增殖及成骨分化能力增强, 同时伴随着 SDF-1、CXCR4 蛋白表达增加; 在同时给予 AMD3100 干预后发现, GsRb1 对 hPDLSCs 增殖及成骨分化的促进作用被减弱, 进一步证明 GsRb1 促进 hPDLSCs 增殖及成骨分化的作用可能与增加 SDF-1/CXCR4 信号通路蛋白表达有关。

综上所述, GsRb1 能够促进 hPDLSCs 增殖及成骨分化, 可能与增加 SDF-1/CXCR4 信号通路蛋白表达有关。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] CHEN Y, YANG YC, ZHU BL, *et al.* Association between periodontal disease, tooth loss and liver diseases risk [ J ]. J Clin Periodontol, 2020, 47 ( 9 ) : 1053-1063.
- [ 2 ] LI N, LI Z, WANG Y, *et al.* CTP-CM enhances osteogenic differentiation of hPDLSCs via NF- $\kappa$ B pathway [ J ]. Oral Dis, 2021, 27 ( 3 ) : 577-588.
- [ 3 ] MA L, WU D. MicroRNA-383-5p regulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by targeting histone deacetylase 9 [ J ]. Arch Oral Biol, 2021, 129: 105166.
- [ 4 ] ZHENG Q, BAO XY, ZHU PC, *et al.* Ginsenoside Rb1 for myocardial ischemia/ reperfusion injury: preclinical evidence and possible mechanisms [ J ]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 6313625.
- [ 5 ] ZHANG D, DU J, YU M, *et al.* Ginsenoside Rb1 prevents osteoporosis via the AHR/PRELP/NF- $\kappa$ B signaling axis [ J ]. Phytomedicine, 2022, 104: 154205.
- [ 6 ] WU Y, DU J, WU Q, *et al.* The osteogenesis of Ginsenoside Rb1 incorporated silk/micro-nano hydroxyapatite/sodium alginate composite scaffolds for calvarial defect [ J ]. Int J Oral Sci, 2022, 14 ( 1 ) : 10-20.
- [ 7 ] WANG Y, BAI S, CHENG Q, *et al.* Naringenin promotes SDF-1/CXCR4 signaling pathway in BMSCs osteogenic differentiation [ J ].

- Folia Histochem Cytobiol, 2021, 59 (1): 66–73.
- [ 8 ] LAN TH, XU DP, HUANG MT, *et al.* Ginsenoside Rb1 prevents homocysteine-induced EPC dysfunction via VEGF/p38MAPK and SDF-1/CXCR4 activation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 13061–13070.
- [ 9 ] LIU Y, LIU N, LI X, *et al.* Ginsenoside Rb1 modulates the migration of bone-derived mesenchymal stem cells through the SDF-1/CXCR4 axis and PI3K/Akt pathway [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 5196682.
- [ 10 ] 李颖辉, 齐芳芳, 韩行, 等. 不同浓度钙离子干预人牙周膜干细胞的增殖和成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27 (19): 3005–3010. LI YH, QI FF, HAN X, *et al.* Different concentrations of calcium ions interfere with the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27 (19): 3005–3010.
- [ 11 ] LI G, AN J, HAN X, *et al.* Hypermethylation of microRNA-149 activates SDF-1/CXCR4 to promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (12): 23485–23494.
- [ 12 ] SUN X, LI M, BAN J, *et al.* miR-23b mediates TNF- $\alpha$ -inhibited osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by targeting Runx2 [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18 (16): 3674–3683.
- [ 13 ] YIN L, CHENG W, QIN Z, *et al.* Effects of naringin on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 758706.
- [ 14 ] 高飞, 董旋, 徐倩倩, 等. AGEs 对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化中  $\beta$ -catenin, ALP 的影响及 PTH 的干预作用 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2021, 41(3): 173–177. GAO F, DONG X, XU QQ, *et al.* Effects of AGEs on  $\beta$ -catenin and ALP in osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells and the intervention of PTH [J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2021, 41 (3): 173–177.
- [ 15 ] 邓银栓, 樊宇, 惠升明, 等. 葛根素促进体外培养大鼠颅骨成骨细胞增殖和分化过程中对 cAMP/PKA 信号通路的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2017, 29 (7): 5–9. DENG YS, FAN Y, HUI SM, *et al.* Effects of puerarin in promoting proliferation and differentiation of rats' osteoblast by culture *in vitro* on cAMP/PKA signal pathway [J]. *Med Pharm J Chin People's Liberation Army*, 2017, 29 (7): 5–9.
- [ 16 ] HA SH, CHOUNG PH. MSM promotes human periodontal ligament stem cells differentiation to osteoblast and bone regeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 528 (1): 160–167.
- [ 17 ] XIONG W, GUO X, CAI X. SDF-1/CXCR4 axis promotes osteogenic differentiation of BMSCs through the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2021, 59 (3): 187–194.
- [ 18 ] ZHANG L, HE H, ZHANG M, *et al.* Assessing the effect and related mechanism of naringenin on the proliferation, osteogenic differentiation and endothelial differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 337–342.