

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.11.004

## 血根碱通过 NF- $\kappa$ B 信号通路调控牙周膜干细胞成骨分化\*

贺莹<sup>1</sup> 杨一帆<sup>1</sup> 褚晓月<sup>2</sup> 郭静<sup>1</sup> 王家亮<sup>1Δ</sup>

(1 西安市第三医院·西北大学附属医院口腔科 陕西 西安 710018; 2 陕西省血液中心血型研究室 陕西 西安 710061)

**摘要目的:**探究血根碱(SAN)对肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )处理的人牙周膜干细胞(hPDLSCs)成骨分化的影响及机制。**方法:**将hPDLSCs分为6组:Control组、TNF- $\alpha$ 组、0.1SAN组、1SAN组、10SAN组和100SAN组,所有hPDLSCs均用成骨诱导培养液培养。除Control组外,其他组细胞培养液中均添加10 ng/mL的TNF- $\alpha$ 。0.1SAN组、1SAN组、10SAN组和100SAN组细胞培养液中分别添加0、0.1、1、10和100  $\mu$ mol/L的血根碱。各组hPDLSCs均在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养21 d。通过可见光比色法检测碱性磷酸酶(ALP)活性。通过茜素红染色观察钙化结节形成,并统计OD<sub>562nm</sub>(代表钙化结节形成量)。通过qRT-PCR检测Runx2相关转录因子2(RUNX2)、骨钙素(OCN)、osterix(OSX)、牙骨质附着蛋白(CAP)、Smad4转录水平。通过Western blot检测核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)p65磷酸化水平。**结果:**与Control组比较,TNF- $\alpha$ 组细胞的相对ALP活性降低和钙化结节形成量以及RUNX2、OCN、OSX、CAP和Smad4的mRNA相对表达量降低( $P<0.05$ ),p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65升高( $P<0.05$ )。与TNF- $\alpha$ 组比较,1SAN组、10SAN组和100SAN组的相对ALP活性和钙化结节形成量以及RUNX2、OCN、OSX、CAP和Smad4的mRNA相对表达量升高( $P<0.05$ ),p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65降低( $P<0.05$ )。**结论:**血根碱可促进TNF- $\alpha$ 处理的hPDLSCs的成骨分化,其机制可能与抑制NF- $\kappa$ B的激活有关,血根碱可能是促进炎症微环境中hPDLSCs成骨分化的候选药物。

**关键词:**血根碱;炎症微环境;牙周膜干细胞;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;核因子- $\kappa$ B;成骨分化

**中图分类号:**R-33;R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)11-2020-07

## Sanguinarine Regulates Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells through NF- $\kappa$ B Signal Pathway\*

HE Ying<sup>1</sup>, YANG Yi-fan<sup>1</sup>, CHU Xiao-yue<sup>2</sup>, GUO Jing<sup>1</sup>, WANG Jia-liang<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Stomatology, Xi'an No.3 Hospital, The Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an, Shaanxi, 710018, China;

2 Blood Group Lab, Shaanxi Blood Center, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect and mechanism of sanguinarine (SAN) on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) treated with tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). **Methods:** hPDLSCs were divided into 6 groups: Control group, TNF- $\alpha$  group, TNF- $\alpha$ +0.1SAN group, TNF- $\alpha$ +1SAN group, TNF- $\alpha$ +10SAN group and TNF- $\alpha$ +100SAN group. All hPDLSCs were cultured in osteogenic induction medium. Except Control group, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  was added to the culture medium of other groups. 0, 0.1, 1, 10, 100  $\mu$ mol/L sanguinarine were added to the culture medium of TNF- $\alpha$ +0.1SAN group, TNF- $\alpha$ +1SAN group, TNF- $\alpha$ +10SAN group and TNF- $\alpha$ +100SAN group, respectively. hPDLSCs of all groups were cultured at 37  $^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub> for 21 days. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was detected by visible light colorimetry. The formation of calcified nodules was observed by alizarin red staining, and OD<sub>562 nm</sub> (representing the amount of calcified nodules) was counted. The transcription levels of Runx2-related transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), osterix (OSX), cementum attachment protein (CAP) and Smad4 were detected by qRT-PCR. The phosphorylation level of NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 was detected by Western blot. **Results:** Compared with that in the Control group, the relative ALP activity, amount of calcified nodules, and the relative expression of RUNX2, OCN, OSX, CAP and Smad4 mRNA in TNF- $\alpha$  group decreased ( $P<0.05$ ), while p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 increased ( $P<0.05$ ). Compared with that in the TNF- $\alpha$  group, the relative ALP activity, amount of calcified nodules, RUNX2, OCN, OSX, CAP and Smad4 mRNA expression of TNF- $\alpha$ +1SAN group, TNF- $\alpha$ +10SAN group and TNF- $\alpha$ +100SAN group increased ( $P<0.05$ ), while p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Sanguinarine can promote the osteogenic differentiation of hPDLSCs treated with TNF- $\alpha$ , and the mechanism may be related to the inhibition of the activation of NF- $\kappa$ B. Sanguinarine may be a candidate drug to promote the osteogenic differentiation of hPDLSCs in inflammatory microenvironment.

**Key words:** Sanguinarine; Inflammatory microenvironment; Periodontal ligament stem cells; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Nuclear factor- $\kappa$ B; Osteogenic differentiation

\* 基金项目:陕西省重点研发项目计划(2018SF-111);陕西省卫生健康科研基金项目(2022D050)

作者简介:贺莹(1989-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:口腔内科学,E-mail: hexiaoyinger8@126.com

Δ 通讯作者:王家亮,男,硕士,主治医师,主要研究方向:口腔修复学,E-mail: ws87wangjialiang@126.com

(收稿日期:2023-11-28 接受日期:2023-12-23)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R781.4 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2024)11-2020-07

## 前言

牙周炎是一种牙周支持组织的慢性感染性疾病,其病理表现包括牙龈和牙周韧带炎症浸润、牙周袋形成、附着丧失和牙槽骨破坏。对于牙周疾病的治疗主要是促进牙周组织或牙齿支撑结构的再生,大量学者已经报道了基于干细胞的组织工程技术在治疗牙周疾病方面的重要性<sup>[1-3]</sup>。人牙周膜干细胞(Human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)是从人牙周膜组织中获得间充质干细胞。体内和体外实验证明 hPDLSCs 具有良好的增殖、自我更新和多向分化潜能<sup>[4]</sup>。干细胞的生物学行为与组织微环境密切相关,炎症微环境可能改变干细胞的分化能力,削弱其成骨分化和组织再生能力<sup>[5]</sup>。因此,需要一种有效的策略来调控 hPDLSCs 在炎症过程中的分化潜能。

血根碱(Sanguinarine, SAN)是从白屈菜、紫堇、博落回中提取的异喹啉类生物碱,已被证明具有抗微生物、抗炎和抗肿瘤活性<sup>[6-8]</sup>,在口腔疾病中通常被用作牙龈保健品的补充剂<sup>[9]</sup>。血根碱是一种有效的核因子- $\kappa$ B(Nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)抑制剂,可通过抑制 NF- $\kappa$ B 的激活来抑制破骨细胞的形成和骨吸收<sup>[10]</sup>。目前,基于 hPDLSCs 的干细胞再生疗法在治疗牙周疾病方面具有非常好的应用前景<sup>[11]</sup>,然而,牙周组织的炎症微环境削弱了 hPDLSCs 的成骨分化和再生能力,限制了其应用<sup>[5]</sup>。因此,如何提高炎症微环境中的 hPDLSCs 的成骨分化和再生能力是亟待解决的难题,然而,目前缺少相关的解决方法。血根碱不仅具有良好的抗炎作用,而且是一种牙龈保健品的补充剂<sup>[9]</sup>,本研究推测血根碱可能有助于改善炎症微环境中 hPDLSCs 的成骨分化和再生能力。基于上述研究背景,本研究考察了血根碱对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )处理的 hPDLSCs 成骨分化的影响及机制,旨在为牙周组织修复提供候选药物。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

血根碱(货号:T2781,纯度:99.18%)购自美国 TargetMol 公司。 $\alpha$ -MEM 培养液(货号:12571089)购自美国 Gibco 公司。人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )(货号:SRP3177)、茜素红染色液(货号:TMS-008)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号:C0009S)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒(货号:C3250S)、TRIzol(货号:R0016)、RIPA(货号:P0013B)购自碧云天生物技术研究所。ALP 活性测定试剂盒(货号:A059-1-1)购自南京建成生物工程研究所。cDNA 逆转录试剂盒(货号:F-K1622)购自美国 Fermentas 公司。TB Green PreMix Ex Taq II(货号:RR820A)购自日本 TAKARA 公司。p-NF- $\kappa$ B p65(Ser536)-抗(货号:3033)、NF- $\kappa$ B p65-抗(货号:8242)、HRP 偶联的 IgG 二抗(货号:7074)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 hPDLSCs 的培养和鉴定 牙周膜组织取自无牙周病病

史、牙周相对健康的正畸治疗患者,本研究已获得西安市第三医院(西北大学附属医院)医学伦理委员会审核通过(编号:SYXSLL-2020-11),牙样本采集均获得患者知晓同意。从第 3 磨牙牙根表面取出 1/3 的牙周膜,将牙周膜剪成小块,在含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 的  $\alpha$ -MEM 完全培养液中于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,每 3 天更换一次培养液。第 3 代 hPDLSCs 用于鉴定,第 3-6 代用于后续实验。将 hPDLSCs 采用胰蛋白酶消化,离心(1200 rpm, 5 min)弃上清,在 PBS 中稀释至密度为 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/mL。取 100  $\mu$ L 的 hPDLSCs 悬液分别与 1:500 稀释的 STRO-1、CD-146、CD34 和 CD45-抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,然后与 1:500 稀释的 FITC 标记的荧光二抗室温孵育 1 h。然后进行 BD Accuri C6 流式细胞仪分析。

1.2.2 hPDLSC 增殖测定 通过 MTT 法检测 hPDLSCs 增殖。将 hPDLSCs 按 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 个细胞/孔的密度加入 96 孔板,分别与不同浓度的血根碱(0、0.1、1、10、100  $\mu$ mol/L)于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 48 h。每孔加入 100  $\mu$ L 的 MTT 孵育 4 h。每孔加入 100  $\mu$ L 的 Formazan 溶解液振荡 3 min,酶标仪测定 570 nm 处的吸光度。

1.2.3 hPDLSC 分组及处理 将 hPDLSCs 分为 6 组:Control 组、TNF- $\alpha$  组、0.1SAN 组、1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组。所有 hPDLSCs 均用成骨诱导培养液( $\alpha$ -MEM 培养液中添加 10%胎牛血清、100 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、5 mg/mL 抗坏血酸和 10 nmol/L 地塞米松)培养。除 Control 组外,其他组细胞培养液中添加 10 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  <sup>[12]</sup>。0.1SAN 组、1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组细胞培养液中分别添加 0、0.1、1、10 和 100  $\mu$ mol/L 的血根碱。各组 hPDLSCs 均在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 21 d,每 3 天更换 1 次培养液。

1.2.4 碱性磷酸酶(ALP)染色和活性测定 ALP 染色: hPDLSCs 处理结束后,将 hPDLSCs 固定在 4%的多聚甲醛中处理 20 min,用 ALP 试剂室温染色 10 min,倒置显微镜观察 hPDLSCs。ALP 活性:采用 ALP 试剂盒通过可见光比色法检测 ALP 活性。

1.2.5 茜素红染色检测钙化结节 hPDLSCs 处理结束后,4%多聚甲醛固定 hPDLSCs 20 min, PBS 洗涤。使用 1 g/L 茜素红在室温下对 hPDLSCs 染色 10 min, PBS 洗涤,在显微镜下观察并拍摄钙化结节图像。使用 1 mL 1%氯化十六烷基吡啶在室温下处理 hPDLSCs 30 min,酶标仪检测 562 nm 波长处的 OD 值<sup>[13]</sup>。

1.2.6 qRT-PCR 检测成骨基因 mRNA 水平 使用 TRIzol 提取 hPDLSCs 总 RNA。用 cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA,用 TB Green PreMix Ex Taq II 在罗氏 LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR。GAPDH 作为内参基因,用 2<sup>- $\Delta$  $\Delta$ CT</sup> 法检测基因表达。使用 Primer Premier 5 设计引物,委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物, Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素(Osteocalcin, OCN)、osterix(OSX)、牙骨质附着蛋白(Cementum attachment protein, CAP)、Smad4 引物序列见表 1。实验重复 6 次。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5' -3' )
RUNX2	F: ATGTGTGTTTGTTCAGCAGCA R: TCCCTAAAGTCACTCGGTATGTGTA
OCN	F: CCCTCCTGCTTGGACACAAAG R: AGGTGACCACACCCCAAGAT
OSX	F: GCCATTCTGGGCTTGGGTATC R: GAAGCCGGAGTGCAGGTATCA
CAP	F: CTGGCTCACCTTCTACGACA R: TACCTCAAGCAAGGCAAATG
Smad4	F: CTCATGTGATCTATGCCCGTC R: AGGTGATACAACCTCGTTCGTAGT
GAPDH	F: TCAAGGCTGAGAACGGGAAG R: TGGACTCCACGACGTACTCA

1.2.7 Western blot 检测 NF-κB p65 和 p-NF-κB p65 蛋白表达水平 使用 RIPA 裂解 hPDLSCs 提取中蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白定量。将蛋白质加载到 10% SDS-PAGE 上, 通过电泳法分离。随后, 将分离的蛋白质电转移到 PVDF 膜上。室温下用 5% 脱脂牛奶封闭膜 1 h。将膜与 p-NF-κB p65 (1:1000 稀释) 和 NF-κB p65 (1:1000 稀释) 一抗 4℃ 孵育过夜。然后将膜与 HRP 偶联的 IgG 二抗 (1:1000 稀释) 室温孵育 1 h。使用 ECL 显影。使用 Image J 软件分析条带的灰度值, 计算 p-NF-κB p65/NF-κB p65 比值。

### 1.3 统计学分析

本研究所有细胞实验均设置 6 个复孔, 数据按照平均值±标准差表示。采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析和 LSD 事后检验分析组间差异。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hPDLSCs 的形态学观察和鉴定

hPDLSCs 形态主要为长梭形、纺锤形。流式细胞术检测显示, hPDLSCs 中 STRO-1 (98.95%) 和 CD146 (99.14%) 高表达, CD34 (0.13%) 和 CD45 (0.04%) 低表达。见图 1。

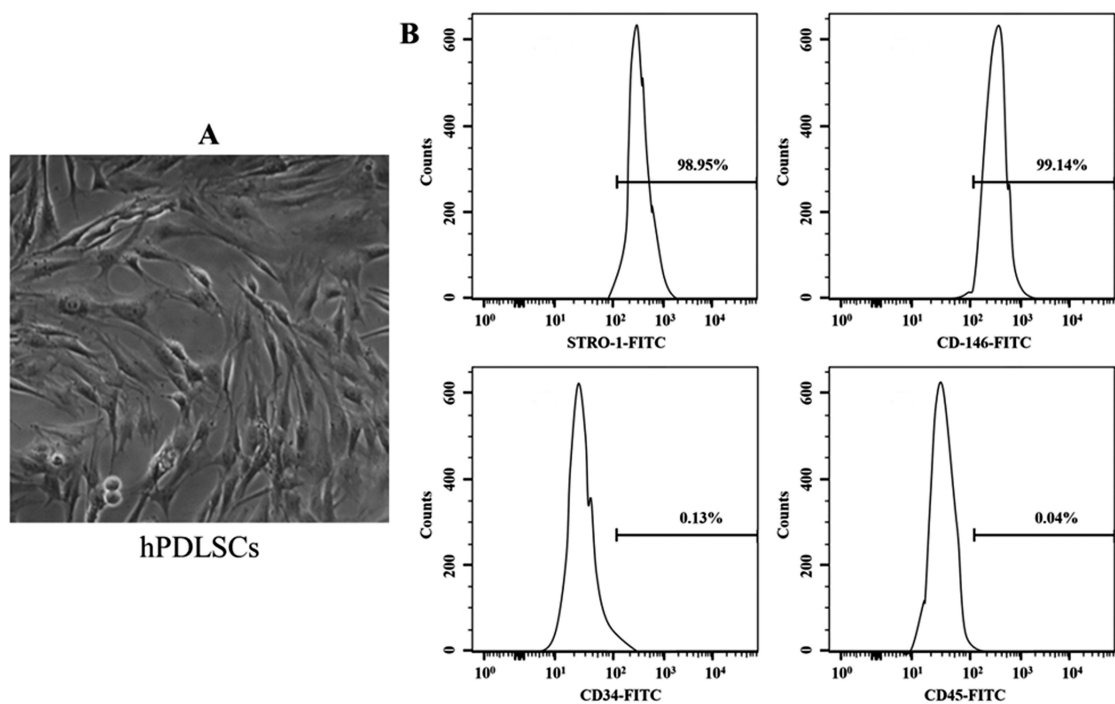


图 1 hPDLSCs 的形态学观察和鉴定

Fig. 1 Morphological observation and identification of hPDLSCs

Note: A: Morphology of hPDLSCs (×40); B: Expression of STRO-1, CD146, CD34 and CD45 in hPDLSCs

### 2.2 血根碱对 hPDLCs 增殖的影响

不同浓度的血根碱 (0、0.1、1、10、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 hPDLCs 48 h 后, 相对细胞活力差异无统计学意义 ( $F=0.222, P=0.924$ )。见图 2。

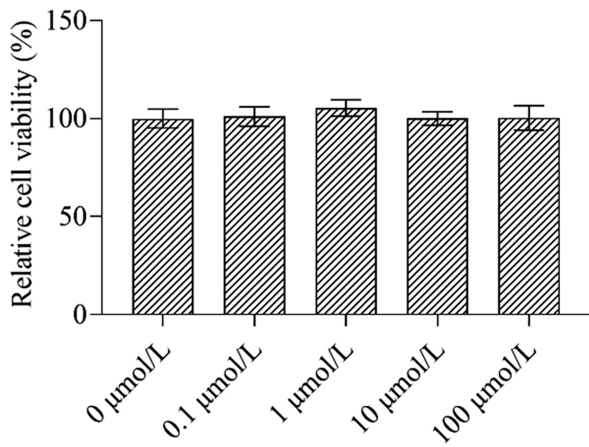


图 2 血根碱对 hPDLCs 增殖的影响

Fig. 2 Effect of sanguinarine on proliferation of hPDLCs

### 2.3 血根碱对 TNF- $\alpha$ 处理的 hPDLCs 中 ALP 的影响

Control 组、TNF- $\alpha$  组、0.1SAN 组、1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组 hPDLCs 的相对 ALP 活性比较差异有统计学意义 ( $F=521.052, P<0.001$ )。与 Control 组比较, TNF- $\alpha$  组 hPDLCs 的相对 ALP 活性降低 ( $P<0.05$ )。与 TNF- $\alpha$  组比较, 1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组 hPDLCs 的相对 ALP 活性呈血根碱剂量依赖性升高 ( $P<0.05$ )。见图 3。

### 2.4 血根碱对 TNF- $\alpha$ 处理的 hPDLCs 钙化结节形成的影响

Control 组、TNF- $\alpha$  组、0.1SAN 组、1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组 hPDLCs 的钙化结节形成量比较差异有统计学意义 ( $F=127.823, P<0.001$ )。与 Control 组比较, TNF- $\alpha$  组 hPDLCs 的钙化结节形成量降低 ( $P<0.05$ )。与 TNF- $\alpha$  组比较, 1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组 hPDLCs 的钙化结节形成量呈血根碱剂量依赖性升高 ( $P<0.05$ )。见图 4。

### 2.5 血根碱对 TNF- $\alpha$ 处理的 hPDLCs 中成骨相关基因转录的影响

Control 组、TNF- $\alpha$  组、0.1SAN 组、1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组 hPDLCs 中 RUNX2、OCN、OSX、CAP 和 Smad4

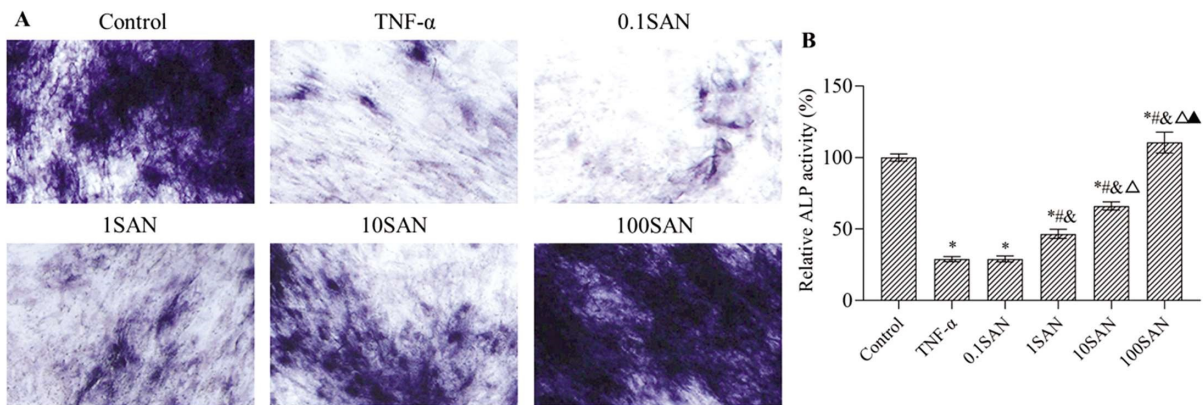


图 3 血根碱对 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLCs 中 ALP 的影响

Fig. 3 Effect of sanguinarine on ALP in TNF- $\alpha$ -treated hPDLCs

Note: A: ALP stained image ( $\times 200$ ); B: Relative ALP activity; Compared with Control group, \* $P<0.05$ ; vs Compared with TNF- $\alpha$  group, # $P<0.05$ ; Compared with 0.1SAN group, & $P<0.05$ ; Compared with 1SAN group, Δ $P<0.05$ ; Compared with 10SAN group, ▲ $P<0.05$ .

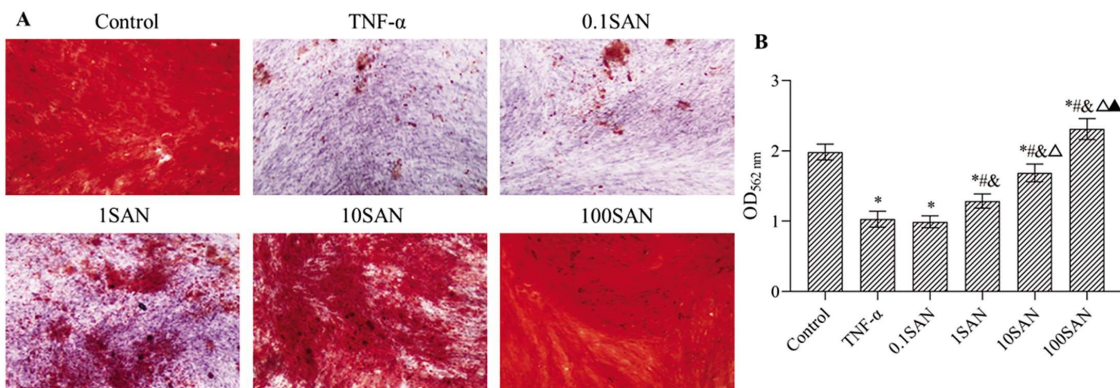


图 4 血根碱对 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLCs 钙化结节形成的影响

Fig. 4 Effect of sanguinarine on the formation of calcified nodules in TNF- $\alpha$ -treated hPDLCs

Note: A: Alizarin red staining image ( $\times 200$ ); B: Quantitative analysis of calcified nodules ( $\text{OD}_{562\text{nm}}$ ); Compared with Control group, \* $P<0.05$ ; vs Compared with TNF- $\alpha$  group, # $P<0.05$ ; Compared with 0.1SAN group, & $P<0.05$ ; Compared with 1SAN group, Δ $P<0.05$ ; Compared with 10SAN group, ▲ $P<0.05$ .

的 mRNA 相对表达量比较差异均有统计学意义 ( $F=182.952, 140.519, 90.890, 82.685, 358.035$ , 均  $P<0.001$ )。与 Control 组比较, TNF- $\alpha$  组 hPDLSCs 中 RUNX2、OCN、OSX、CAP 和 Smad4 的 mRNA 相对表达量降低 ( $P<0.05$ )。与 TNF- $\alpha$  组比较,

1SAN 组、10SAN 组、100SAN 组 hPDLSCs 中 RUNX2、OCN、OSX、CAP 和 Smad4 的 mRNA 相对表达量呈血根碱剂量依赖性升高 ( $P<0.05$ )。见图 5。

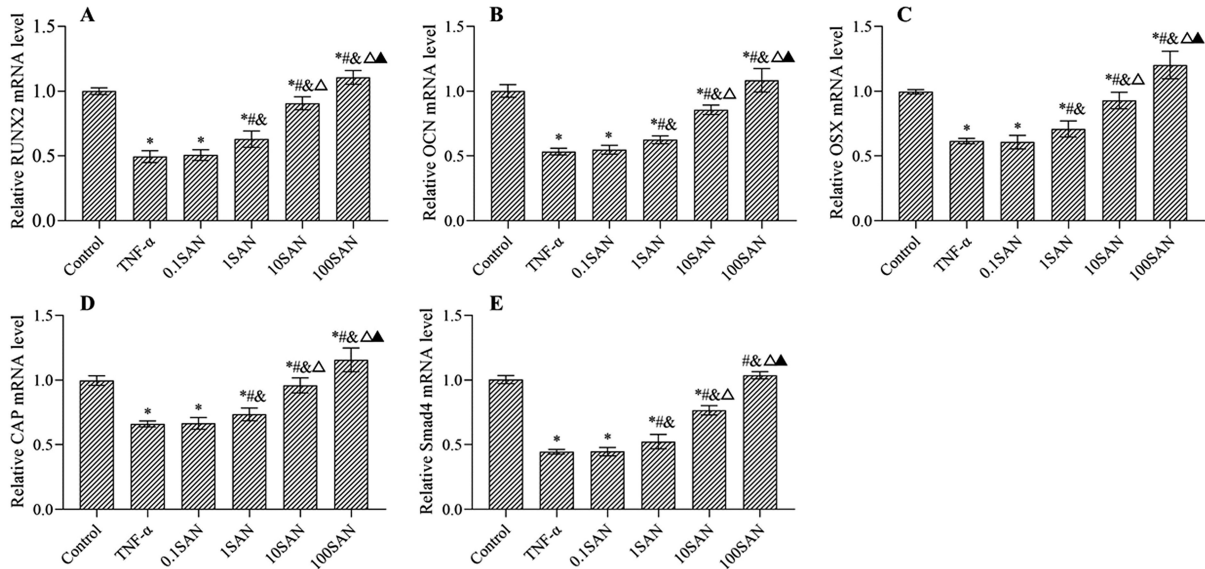


图 5 血根碱对 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 中成骨相关基因转录的影响

Fig. 5 Effect of sanguinarine on transcription of osteogenic genes in TNF- $\alpha$ -treated hPDLSCs

Note: A-E: The relative mRNA expression levels of RUNX2, OCN, OSX, CAP and Smad4, respectively; Compared with Control group,  $*P<0.05$ ; vs Compared with TNF- $\alpha$  group,  $^{\#}P<0.05$ ; Compared with 0.1SAN group,  $^{\&}P<0.05$ ; Compared with 1SAN group,  $^{\Delta}P<0.05$ ; Compared with 10SAN group,  $^{\blacktriangle}P<0.05$ .

### 2.6 血根碱对 TNF- $\alpha$ 处理的 hPDLSCs 中 NF- $\kappa$ B 激活的影响

Control 组、TNF- $\alpha$  组、0.1SAN 组、1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组 hPDLSCs 中 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值比较差异有统计学意义 ( $F=433.533, P<0.001$ )。与 Control 组比较, TNF- $\alpha$  组的 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值升高 ( $P<0.05$ )。与 TNF- $\alpha$  组比较, 1SAN 组、10SAN 组和 100SAN 组的 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 值呈血根碱剂量依赖性降低 ( $P<0.05$ )。见图 6。

### 3 讨论

本研究中分离培养的细胞符合干细胞特性, 流式细胞术检测了间充质干细胞表面抗原 STRO-1、血管周围细胞表面抗原 CD146、造血干细胞表面抗原 CD34 和 CD45<sup>[14]</sup> 的表达, 细胞鉴定为 hPDLSCs。hPDLSCs 能够分化形成牙本质, 在牙周疾病治疗方面具有巨大潜力<sup>[14]</sup>。然而, 炎性微环境会削弱 hPDLSCs 的成骨分化能力<sup>[5]</sup>; 在牙周炎中, 炎性细胞因子可破坏牙周支持组织<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  是几种促炎细胞因子的主要调节因子, 它与破骨细胞生成、牙槽骨吸收和成骨抑制有关<sup>[16]</sup>。使用抗炎药物处理 hPDLSCs 可以提高其在炎性环境中的成骨分化能力, 并抑制体内牙槽骨吸收<sup>[17]</sup>。然而, 目前临床中缺乏相关药物。血根碱是一种具有抗炎活性的生物碱, 可抑制牙龈上牙菌斑生长, 目前已被美国食品药品监督管理局批准作为牙龈保健品的补充剂进行使用<sup>[9]</sup>。此外, 血根碱可抑制破骨细胞的形成和骨吸收, 降低破骨细胞标志基因的表达, 包括抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K 和降钙素受体<sup>[10]</sup>。Yu 等人通过生物信息学分析确定血根碱是治疗骨质疏松症的潜在候选药物<sup>[18]</sup>。本研究推测血根碱

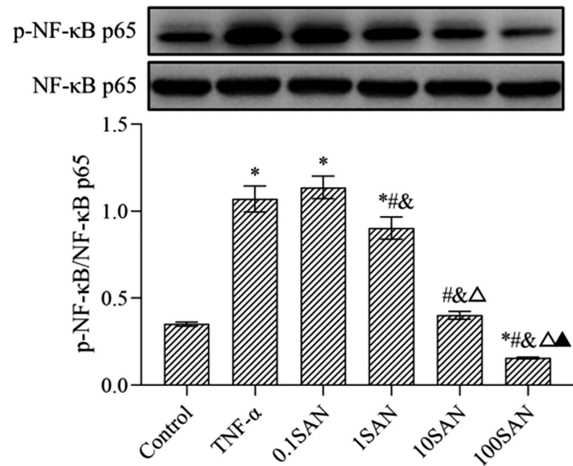


图 6 血根碱对 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 中 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 的影响

Fig. 6 Effect of sanguinarine on p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 in TNF- $\alpha$ -treated hPDLSCs

Note: Compared with Control group,  $*P<0.05$ ; vs Compared with TNF- $\alpha$  group,  $^{\#}P<0.05$ ; Compared with 0.1SAN group,  $^{\&}P<0.05$ ; Compared with 1SAN group,  $^{\Delta}P<0.05$ ; Compared with 10SAN group,  $^{\blacktriangle}P<0.05$ .

可能是提高炎性微环境中 hPDLSCs 的成骨分化能力的候选药物。

本研究考察了血根碱对 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 成骨分化的影响, 研究表明 TNF- $\alpha$  降低了 hPDLSCs 的 ALP 活性和钙化结节形成能力。然而, 1、10、100  $\mu$ mol/L 的血根碱处理升高了



TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 的 ALP 活性和钙化结节形成能力。ALP 活性与成骨分化有关,ALP 活性升高可增加细胞内游离磷酸离子浓度,促进钙盐沉积和钙化结节的形成<sup>[19]</sup>。上述结果说明,适当浓度的血根碱提高了炎性微环境中 hPDLSCs 的成骨分化能力。

成骨分化受到多种基因的调控。RUNX2 是调节包括 ALP 在内的成骨基因转录、翻译的转录因子<sup>[20,21]</sup>,RUNX2 的缺失会减弱骨形成<sup>[22]</sup>。OCN 是促进骨形成和矿化的关键基因<sup>[23]</sup>,OCN 的高表达反映了 hPDLSCs 的成骨分化能力<sup>[24]</sup>。OSX 是一种成骨细胞特异性转录因子,对骨形成和牙齿发育至关重要,位于 RUNX2 下游<sup>[25]</sup>。CAP 是一种牙骨质特异性蛋白<sup>[26]</sup>,介导牙骨质形成和牙周膜再生<sup>[27]</sup>。Smad4 是某些钙化基因的转录激活因子<sup>[28]</sup>,Smad4 的缺失通过降低 RUNX2 和 ALP 的表达减弱成骨分化<sup>[29]</sup>。本研究观察到 TNF- $\alpha$  抑制了 hPDLSCs 中成骨相关基因 RUNX2、OCN、OSX、CAP、Smad4 的转录。其他文献报道, TNF- $\alpha$  能够抑制 hPDLSCs 骨向分化,降低成骨标志基因 RUNX2、骨桥蛋白、CAP 表达<sup>[12]</sup>。与本研究结果一致。然而,血根碱剂量依赖性地升高了 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 中 RUNX2、OCN、OSX、CAP 和 Smad4 的转录。其他文献报道,血根碱处理小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 可显著增加 ALP 活性,上调成骨细胞分化调节基因骨形态发生蛋白 2、OSX 和骨保护素表达<sup>[30]</sup>。支持本研究结果。

NF- $\kappa$  B 是一种重要的核转录因子,调节细胞凋亡、炎症反应和成骨细胞分化<sup>[31]</sup>。另外,激活 NF- $\kappa$ B 抑制 hPDLSCs 的成骨分化,并促进其成脂分化<sup>[32]</sup>。机制研究显示,高水平的 TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa$ B 抑制 hPDLSCs 的成骨分化<sup>[33]</sup>。其他文献报道血根碱是一种 NF- $\kappa$ B 抑制剂。例如,血根碱通过抑制 p65 磷酸化和核转位预防吡啶类美辛诱导的大鼠肠道炎症损伤<sup>[34]</sup>。血根碱通过抑制 H9c2 心肌细胞的 NF- $\kappa$ B 的激活减轻脂多糖诱导的炎症和细胞凋亡<sup>[35]</sup>。血根碱通过抑制 NF- $\kappa$ B 的激活来缓解压力超负荷诱导的心脏重塑<sup>[36]</sup>。本研究表明, TNF- $\alpha$  上调了 hPDLSCs 中 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化水平,然而,血根碱剂量依赖性地降低了 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 中 NF- $\kappa$ B p65 的磷酸化水平,抑制了该通路的激活。其他文献也报道血根碱抑制破骨细胞的形成和骨吸收的途径与抑制 NF- $\kappa$ B 的激活有关<sup>[10]</sup>。因此,血根碱可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的激活促进 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 的成骨分化。

综上所述,本研究表明血根碱可促进 TNF- $\alpha$  处理的 hPDLSCs 的成骨分化,其机制可能与抑制 NF- $\kappa$ B 的激活有关。血根碱作为一种牙根保健成分,其安全性已被证实,且本研究未观察到血根碱对 hPDLSCs 增殖的影响,说明血根碱不影响 hPDLSCs 的正常存活。总之,血根碱可能是促进炎性微环境中 hPDLSCs 成骨分化的候选药物。

#### 参考文献(References)

- [1] Han J, Menicanin D, Gronthos S, et al. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration [J]. Aust Dent J, 2014, 59(1): 117-130.
- [2] Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal ligament stem cells: regenerative potency in periodontium [J]. Stem Cells Dev, 2019, 28(15): 974-985.
- [3] Zhang Z, Deng M, Hao M, et al. Periodontal ligament stem cells in the periodontitis niche: inseparable interactions and mechanisms [J]. J Leukoc Biol, 2021, 110(3): 565-576.
- [4] Bright R, Hynes K, Gronthos S, et al. Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review[J]. J Periodontol Res, 2015, 50(2): 160-172.
- [5] Xia Y, Tang HN, Wu RX, et al. Cell responses to conditioned media produced by patient-matched stem cells derived from healthy and inflamed periodontal ligament tissues [J]. J Periodontol, 2016, 87(5): 53-63.
- [6] Basu P, Kumar GS. Sanguinarine and its role in chronic diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 928: 155-172.
- [7] Fu C, Guan G, Wang H. The anticancer effect of sanguinarine: a review[J]. Curr Pharm Des, 2018, 24(24): 2760-2764.
- [8] Lou G, Wang J, Hu J, et al. Sanguinarine: A double-edged sword of anticancer and carcinogenesis and its future application prospect[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2021, 21(16): 2100-2110.
- [9] Grenby TH. The use of sanguinarine in mouthwashes and toothpaste compared with some other antimicrobial agents [J]. Br Dent J, 1995, 178(7): 254-258.
- [10] Li H, Zhai Z, Liu G, et al. Sanguinarine inhibits osteoclast formation and bone resorption via suppressing RANKL-induced activation of NF- $\kappa$ B and ERK signaling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(3): 951-956.
- [11] Xu XY, Li X, Wang J, et al. Concise review: periodontal tissue regeneration using stem cells: strategies and translational considerations[J]. Stem Cells Transl Med, 2019, 8(4): 392-403.
- [12] 马玉,李淑慧,丁欣欣,等.肿瘤坏死因子- $\alpha$ 对牙周膜干细胞骨向分化及 Notch 信号通路的影响[J].华西口腔医学杂志,2018,36(2): 184-189.
- [13] Meng T, Zhou Y, Li J, et al. Azithromycin promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells after stimulation with TNF- $\alpha$ [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 7961962.
- [14] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149-155.
- [15] Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease [J]. Periodontol 2000, 1997, 14: 112-143.
- [16] Yi M, Wang G, Niu J, et al. Pterostilbene attenuates the proliferation and differentiation of TNF- $\alpha$ -treated human periodontal ligament stem cells[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(4): 304.
- [17] Lai S, Liu C, Liu C, et al. Lycium barbarum polysaccharide-glycoprotein promotes osteogenesis in hPDLSCs via ERK activation [J]. Oral Dis, 2023, 29(8): 3503-3513.
- [18] Yu G, Wang L, Li Y, et al. Identification of drug candidate for osteoporosis by computational bioinformatics analysis of gene expression profile[J]. Eur J Med Res, 2013, 18(1): 5.
- [19] Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 524(3): 702-709.
- [20] Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2[J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 189-195.

- [21] Weng JJ, Su Y. Nuclear matrix-targeting of the osteogenic factor Runx2 is essential for its recognition and activation of the alkaline phosphatase gene[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(3): 2839-2852.
- [22] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. *Cell*, 1997, 89(5): 755-764.
- [23] Wei J, Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2015, 16(2): 93-98.
- [24] He Q, Yang S, Gu X, et al. Long noncoding RNA TUG1 facilitates osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via interacting with Lin28A[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 455.
- [25] Wang C, Liao H, Cao Z. Role of osterix and microRNAs in bone formation and tooth development[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2934-2942.
- [26] Schild C, Beyeler M, Lang NP, et al. Cementum attachment protein/protein-tyrosine phosphatase-like member A is not expressed in teeth[J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(2): 293-296.
- [27] Bai S, Lee JH, Son C, et al. CPNE7 regenerates periodontal ligament via TAU-mediated alignment and cementum attachment protein-mediated attachment[J]. *J Clin Periodontol*, 2022, 49(6): 609-620.
- [28] Boström KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens [J]. *Circ Res*, 2011, 109(5): 564-577.
- [29] Xu R, Zhao M, Yang Y, et al. MicroRNA-449c-5p inhibits osteogenic differentiation of human VICs through Smad4-mediated pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8740.
- [30] Zhang F, Xie J, Wang G, et al. Anti-osteoporosis activity of Sanguinarine in preosteoblast MC3T3-E1 cells and an ovariectomized rat model[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4626-4633.
- [31] Zhang W, Jia L, Zhao B, et al. Quercetin reverses TNF $\alpha$  induced osteogenic damage to human periodontal ligament stem cells by suppressing the NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4): 39.
- [32] Chen S, Wu Z, He Y, et al. Cyclic di-adenosine monophosphate regulates the osteogenic and adipogenic differentiation of hPDLSCs via MAPK and NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2023, 55(3): 426-437.
- [33] 陈小燕, 丁寅, 金岩. TNF- $\alpha$  通过 NF- $\kappa$ B 信号通路对人牙周膜干细胞成骨分化调控作用的研究 [J]. *口腔生物医学*, 2015, 6(3): 124-128.
- [34] Lin XL, Shi YN, Cao YL, et al. Sanguinarine protects against indomethacin-induced small intestine injury in rats by regulating the Nrf2/NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 960140.
- [35] Meng YY, Liu Y, Hu ZF, et al. Sanguinarine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B Pathway in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(2): 204-211.
- [36] Deng W, Fang Y, Liu Y, et al. Sanguinarine protects against pressure overload induced cardiac remodeling via inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(1): 211-216.