

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.18.004

葛根素调节 Nrf2/HO-1 信号通路对脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应的影响*

曹倩¹ 王鹏来^{1,2Δ} 姜艳秋³ 李娜⁴ 倪哲⁵

(1 徐州医科大学口腔医学院 江苏 徐州 221004; 2 徐州市口腔医院口腔种植科 江苏 徐州 221002;

3 徐州矿务集团总医院口腔科 江苏 徐州 221006; 4 徐州市中心医院口腔科 江苏 徐州 221009;

5 徐州市肿瘤医院口腔科 江苏 徐州 221005)

摘要 目的:探讨葛根素(GGS)调节核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/ 血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路对脂多糖(LPS)诱导的人牙龈成纤维细胞(HGFs)炎症反应的影响。**方法:**体外培养 HGFs 细胞,将 HGFs 细胞分为空白对照(CK)组(0.9%氯化钠)、LPS 组(100 nM LPS)、LPS+GGS 低剂量(LPS+GGS-L)组(100 nM LPS+50 μM GGS)、LPS+GGS 高剂量(LPS+GGS-H)组(100 nM LPS+100 μM GGS)、LPS+GGS-H+ML385(Nrf2/HO-1 信号通路抑制剂)组(100 nM LPS+100 μM GGS+10 μM ML385)。采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞增殖能力;酶联免疫吸附法(ELISA)检测白细胞介素(IL)-6、乳酸脱氢酶(LDH)、IL-10、IL-1β 水平;试剂盒检测丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;流式细胞术检测 HGFs 细胞凋亡率;碘化丙啶(PI)染色法检测细胞膜孔的形成;Western blot 法检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、Nrf2、HO-1 蛋白表达。**结果:**与 CK 组相比,LPS 组 HGFs 细胞 OD₄₅₀(24, 48 h)值、IL-10 水平、GSH-Px 和 SOD 活性、Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著降低,IL-6、LDH、IL-1β 水平、MDA 含量、细胞凋亡率、细胞 PI 染色阳性率、Bax 和 NLRP3 蛋白表达显著升高($P<0.05$);与 LPS 组相比,LPS+GGS-L 组和 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 OD₄₅₀(24, 48 h)值、IL-10 水平、GSH-Px 和 SOD 活性、Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著升高,IL-6、LDH、IL-1β 水平、MDA 含量、细胞凋亡率、细胞 PI 染色阳性率、Bax 和 NLRP3 蛋白表达显著降低($P<0.05$);ML385 可减轻 GGS 对 LPS 诱导的 HGFs 细胞炎症损伤的改善作用($P<0.05$)。**结论:**GGS 可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 LPS 诱导的 HGFs 细胞炎症和氧化应激反应,降低细胞凋亡。

关键词:葛根素;Nrf2/HO-1 信号通路;脂多糖;人牙龈成纤维细胞;炎症反应

中图分类号:R-33;R781.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)18-3422-07

Effect of Puerarin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts by Regulating Nrf2/HO-1 Signaling Pathway*

CAO Qian¹, WANG Peng-lai^{1,2Δ}, JIANG Yan-qiu³, LI Na⁴, NI Zhe⁵

(1 School of Stomatology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221004, China; 2 Department of Dental Implant, Xuzhou Stomatological Hospital, Xuzhou, Jiangsu, 221002, China; 3 Department of Stomatology, Xuzhou Mineral Group General Hospital, Xuzhou, Jiangsu, 221006, China; 4 Department of Stomatology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu, 221009, China; 5 Department of Stomatology, Xuzhou Cancer Hospital, Xuzhou, Jiangsu, 221005, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of puerarin (GGS) on lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammatory response in human gingival fibroblasts (HGFs) by regulating nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods:** HGFs cells were cultured in vitro, HGFs cells were divided into blank control (CK) group (0.9% sodium chloride), LPS group (100 nM LPS), LPS+GGS low dose (LPS+GGS-L) group (100 nM LPS+50 μM GGS), LPS+GGS high dose (LPS+GGS-H) group (100 nM LPS+100 μM GGS), LPS+GGS-H+ML385 (Nrf2/HO-1 signaling pathway inhibitor) group (100 nM LPS+100 μM GGS+10 μM ML385). The cell proliferation ability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). The levels of interleukin (IL) -6, lactate dehydrogenase (LDH), IL-10 and IL-1β were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) were detected by kits. The apoptosis rate of HGFs was detected by flow cytometry. The formation of cell membrane pores was detected by propidium iodide (PI) staining. The expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), Nrf2 and HO-1 were detected by Western blot. **Results:** Compared with CK group, the OD₄₅₀ (24 and 48 h) value, IL-10 level, GSH-Px and SOD activity, Bcl-2, Nrf2 and HO-1 protein expression of HGFs cells in LPS group were significantly decreased, and the levels of IL-6, LDH, IL-1β, MDA content,

* 基金项目:江苏省基础研究计划青年基金项目(BK20210080)

作者简介:曹倩(1986-),女,在读硕士研究生,研究方向:口腔医学,E-mail:caoqian20200425@163.com

Δ 通讯作者:王鹏来(1964-),男,硕士,主任医师,研究方向:口腔医学,E-mail:wpl0771@163.com

(收稿日期:2024-02-28 接受日期:2024-03-24)

apoptosis rate, positive rate of PI staining, Bax and NLRP3 protein expression were significantly increased ($P<0.05$). Compared with LPS group, the OD_{450} (24 and 48 h) value, IL-10 level, GSH-Px and SOD activity, Bcl-2, Nrf2 and HO-1 protein expression of HGFs cells in LPS+GGs-L group and LPS+GGs-H group were significantly increased, and the levels of IL-6, LDH, IL-1 β , MDA content, apoptosis rate, positive rate of PI staining, Bax and NLRP3 protein expression were significantly decreased ($P<0.05$). ML385 could reduce the improvement of GGS on LPS-induced inflammatory injury in HGFs cells ($P<0.05$). **Conclusion:** GGS may alleviate LPS-induced inflammation and oxidative stress in HGFs cells by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway, and reduce cell apoptosis.

Key words: Puerarin; Nrf2/HO-1 signaling pathway; Lipopolysaccharide; Human gingival fibroblasts; Inflammatory response

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

Article ID: 1673-6273(2024)18-3422-07

前言

牙周炎是临床常见的由局部因素引起的牙周组织慢性炎症,临床主要表现为牙齿红肿、牙槽骨吸收,情况严重可使患者牙齿松动和脱落^[1]。研究显示,细菌感染是引起牙周炎的主要因素,牙龈卟啉单胞菌为主要致病菌之一,可释放炎症因子,脂多糖(LPS)是其细胞壁的主要构成成分,刺激宿主免疫反应,对牙周组织造成损伤和破坏^[2,3]。人牙龈成纤维细胞(HGFs)是牙周组织的重要组成部分,在牙周组织形成、再生和修复过程中发挥重要作用,还可调节炎症细胞的浸润并清除浸润的炎症细胞,其功能失调则可导致炎症加剧,促进牙周炎进展^[4]。葛根素(GGS)是一种从植物葛根中提取的异黄酮类衍生物,具有抗炎、骨保护、促进干细胞分化等药理特性,可促进人牙周膜干细胞增殖和分化^[5],还可降低LPS诱导的人牙髓干细胞炎症反应,促进细胞增殖和分化^[6]。Nrf2/HO-1信号通路是一条抗炎症和抗氧化的通路,激活该通路可抑制炎症因子释放,降低氧化损伤,研究显示,褪黑素衍生碳点可通过Nrf2/HO-1途径有效治疗牙周炎^[7]。相关报道证实,激活Nrf2/HO-1信号通路可降低LPS诱导的HGFs细胞炎症小体依赖性焦亡^[8]。另有研究显示,GGS可激活Nrf2/HO-1信号通路抑制炎症和氧化应激^[9]。本研究探讨GGS调节Nrf2/HO-1信号通路对LPS诱导的HGFs炎症反应的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要细胞与试剂

1.1.1 实验细胞 HGFs细胞购自于中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM培养基和胎牛血清购自南京广兰生物科技有限公司;Nrf2/HO-1信号通路抑制剂-ML385组购自美国MCE公司;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒和丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均购自上海恒远生物科技有限公司;白细胞介素(IL)-6、乳酸脱氢酶(LDH)、IL-10、IL-1 β 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自上海科培瑞生物科技有限公司;胰蛋白酶和蛋白提取试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司;B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)、NOD样受体蛋白3(NLRP3)、核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、 β -actin一抗和二抗均购自英国Abcam公司;HBS-1096B型酶标仪购自上海寰熙医疗器械有限公司;Sparrow1040流式细胞仪购自赛雷纳(中国)医疗科技有限公司;RG-5000T紫外分光光度计购自天津诺雷信达科技有限

公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HGFs细胞培养及分组 将HGFs株传代培养5代,制备成 4.0×10^4 个/mL的细胞悬浮液,恒温箱过夜。取等量HGFs悬浮液接种于6孔板上培养,直到融合至约80%,加入含有FBS的DMEM培养基继续培养,取培养对数期的细胞。将培养的对数期的HGFs细胞分为空白对照(CK)组、LPS组、LPS+GGs低剂量(LPS+GGs-L)组、LPS+GGs高剂量(LPS+GGs-H)组、LPS+GGs-H+ML385组,CK组给予0.9%氯化钠,除CK组外其余各组细胞均加入100 nM的LPS干预^[10],LPS+GGs-L组和LPS+GGs-H组细胞再分别添加50 μ M和100 μ M的GGs干预^[5],LPS+GGs-H+ML385组添加100 μ M的GGs和10 μ M的ML385干预细胞^[11],各组细胞培养24 h进行后续试验。

1.2.2 CCK-8法检测HGFs细胞增殖能力 将各组HGFs细胞以每孔 5×10^4 个接种到96孔板中,在培养24 h、48 h的时间点,弃去细胞上清液,向各孔中加入含有10 μ L CCK-8溶液的100 μ L完全培养基,孵育2 h后,使用酶标仪测定其波长450 nm处的吸光度(OD_{450} 值)。

1.2.3 ELISA检测HGFs细胞IL-6、LDH、IL-10、IL-1 β 水平 将各组培养的HGFs细胞于离心机中4000 r/min离心10 min收集上清液,按照ELISA试剂盒说明书步骤检测IL-6、LDH、IL-10、IL-1 β 水平,依次加入试剂盒中的反应试剂、终止试剂和显色试剂,酶标仪检测吸光值,根据标线计算相应指标水平。

1.2.4 检测HGFs细胞MDA、GSH-Px和SOD水平 用细胞裂解液将各组HGFs细胞裂解,按照试剂盒说明书检测SOD、GSH-Px、MDA水平。

1.2.5 流式细胞术检测HGFs细胞凋亡 取各分组HGFs细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,加入500 μ L结合缓冲液沉淀细胞并收集,然后加入Annexin V-FITC与碘化丙啶(PI)试剂,黑暗环境反应15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.6 PI染色检测HGFs细胞膜孔的形成 收集各组培养的细胞,PBS冲洗,按试剂盒要求向各孔中添加PI和4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液,在37 $^{\circ}$ C培养箱中避光孵育30 min,PBS清洗,在荧光显微镜下观察染色结果并拍照,红色荧光信号为PI染色(表示细胞膜孔的形成),蓝色荧光信号为DAPI染色(表示细胞核),PI阳性细胞比率(%)=死亡细胞数/总细胞数。

1.2.7 Western blot检测Bcl-2、Bax、NLRP3、Nrf2、HO-1蛋白表达 离心收集各组细胞,提取细胞总蛋白并定量检测,热水浴

将蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,封闭 2 h,加入 Bcl-2、Bax、NLRP3、Nrf2、HO-1、 β -actin 一抗 4℃ 孵育,洗膜,二抗孵育 2 h,ECL 试剂显色,分析蛋白质灰度值用 Image-Pro Plus 软件。

1.3 统计学方法

GraphPad Prism 8.0.1 软件分析数据。计量资料表示为 ($\bar{x} \pm s$),单因素方差分析用于组间比较,用 SNK-q 检验组内两两差异。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GGS 对各组 HGFs 细胞增殖的影响

LPS 组 HGFs 细胞 $OD_{450}(24,48 h)$ 值显著低于 CK 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-L 组和 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 $OD_{450}(24,48 h)$ 值显著高于 LPS 组,且 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 $OD_{450}(24,48 h)$ 值显著高于 LPS+GGS-L 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-H+ML385 组 HGFs 细胞 $OD_{450}(24,48 h)$ 值显著低于 LPS+GGS-H 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 HGFs 细胞增殖能力比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of proliferation ability of HGFs cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	OD ₄₅₀ values	
	24 h	48 h
CK group	0.41 ± 0.03	0.79 ± 0.05
LPS group	0.17 ± 0.02 ^a	0.38 ± 0.03 ^a
LPS+GGS-L group	0.26 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.04 ^b
LPS+GGS-H group	0.35 ± 0.03 ^{bc}	0.72 ± 0.05 ^{bc}
LPS+GGS-H+ML385 group	0.28 ± 0.03 ^d	0.53 ± 0.05 ^d

Note: Compared with CK group, ^a $P < 0.05$. Compared with LPS group, ^b $P < 0.05$. Compared with LPS+GGS-L group, ^c $P < 0.05$. Compared with LPS+GGS-H group, ^d $P < 0.05$.

2.2 GGS 对各组 HGFs 细胞 IL-6、LDH、IL-10、IL-1 β 水平的影响

LPS 组 HGFs 细胞 IL-6、LDH、IL-1 β 水平显著高于 CK 组,IL-10 水平显著低于 CK 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-L 组和 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 IL-6、LDH、IL-1 β 水平显著低于

LPS 组,IL-10 水平显著高于 LPS 组,且 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 IL-6、LDH、IL-1 β 水平显著低于 LPS+GGS-L 组,IL-10 水平显著高于 LPS+GGS-L 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-H+ML385 组 HGFs 细胞 IL-6、LDH、IL-1 β 水平显著高于 LPS+GGS-H 组,IL-10 水平显著低于 LPS+GGS-H 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 HGFs 细胞上清 IL-6、LDH、IL-10、IL-1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of IL-6, LDH, IL-10 and IL-1 β levels in the supernatant of HGFs cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	IL-6(pg/mL)	LDH(U/mL)	IL-10(pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
CK group	28.56 ± 3.14	112.78 ± 14.39	93.64 ± 11.32	51.62 ± 6.84
LPS group	114.87 ± 13.76 ^a	295.32 ± 30.84 ^a	24.76 ± 2.87 ^a	167.54 ± 19.16 ^a
LPS+GGS-L group	85.34 ± 9.47 ^b	226.54 ± 21.27 ^b	49.38 ± 6.24 ^b	124.86 ± 15.72 ^b
LPS+GGS-H group	53.72 ± 6.81 ^{bc}	168.41 ± 19.58 ^{bc}	75.64 ± 9.53 ^{bc}	82.29 ± 10.37 ^{bc}
LPS+GGS-H+ML385 group	84.25 ± 9.32 ^d	231.67 ± 25.43 ^d	46.13 ± 5.68 ^d	126.31 ± 14.53 ^d

Note: Consistent with Table 1.

2.3 GGS 对各组细胞 MDA、GSH-Px 和 SOD 水平的影响

LPS 组 HGFs 细胞 GSH-Px 和 SOD 活性显著低于 CK 组,MDA 含量显著高于 CK 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-L 组和 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 GSH-Px 和 SOD 活性显著高于 LPS 组,MDA 含量显著低于 LPS 组,且 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 GSH-Px 和 SOD 活性显著高于 LPS+GGS-L 组,MDA 含量显著低于 LPS+GGS-L 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-H+ML385 组 HGFs 细胞 GSH-Px 和 SOD 活性显著低于 LPS+GGS-H 组,MDA 含量显著高于 LPS+GGS-H 组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 GGS 对各组细胞细胞凋亡的影响

LPS 组 HGFs 细胞凋亡率显著高于 CK 组 ($P < 0.05$);

LPS+GGS-L 组和 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞凋亡率显著低于 LPS 组,且 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞凋亡率显著低于 LPS+GGS-L 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-H+ML385 组 HGFs 细胞凋亡率显著高于 LPS+GGS-H 组 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 1。

2.5 GGS 对各组细胞焦亡的影响

LPS 组 HGFs 细胞 PI 染色阳性率显著高于 CK 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-L 组和 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 PI 染色阳性率显著低于 LPS 组,且 LPS+GGS-H 组 HGFs 细胞 PI 染色阳性率显著低于 LPS+GGS-L 组 ($P < 0.05$); LPS+GGS-H+ML385 组 HGFs 细胞 PI 染色阳性率显著高于 LPS+GGS-H 组 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 2。

表 3 各组 HGFs 细胞 MDA、GSH-Px 和 SOD 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of MDA, GSH-Px and SOD levels in HGFs cells of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)
CK group	102.51± 14.39	8.43± 1.07	47.26± 5.18
LPS group	26.68± 3.73 ^a	34.74± 3.56 ^a	13.51± 1.63 ^a
LPS+GGs-L group	53.71± 8.42 ^b	23.38± 2.79 ^b	25.74± 3.41 ^b
LPS+GGs-H group	76.32± 9.54 ^{bc}	14.57± 1.68 ^{bc}	38.61± 4.37 ^{bc}
LPS+GGs-H+ML385 group	48.26± 6.87 ^d	26.25± 3.11 ^d	26.83± 3.74 ^d

Note: Consistent with Table 1.

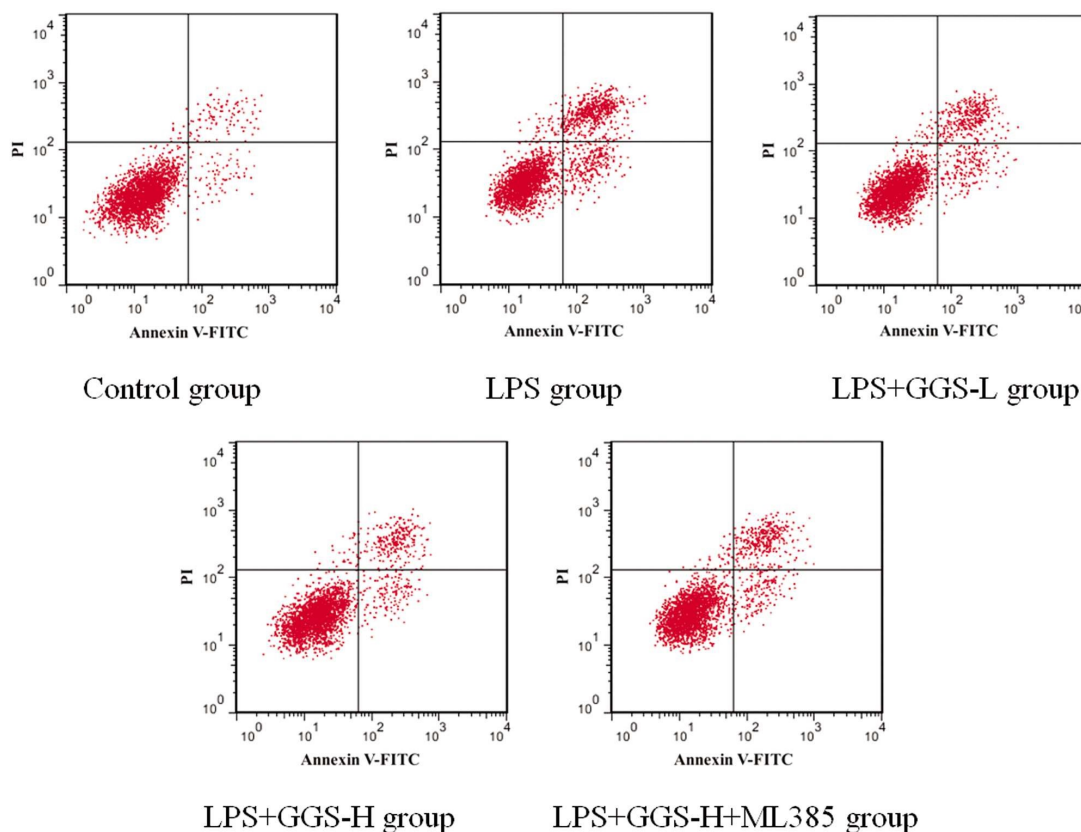


图 1 各组 HGFs 细胞凋亡率

Fig.1 Apoptosis rate of HGFs in each group

表 4 各组 HGFs 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of apoptosis rate of HGFs in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Apoptosis rate(%)
CK group	5.86± 0.73
LPS group	36.28± 3.52 ^a
LPS+GGs-L group	27.43± 3.18 ^b
LPS+GGs-H group	14.71± 1.84 ^{bc}
LPS+GGs-H+ML385 group	28.39± 3.46 ^d

Note: Consistent with Table 1.

2.6 GGS 对各组 HGFs 细胞 Bcl-2、Bax、NLRP3、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响

LPS 组 HGFs 细胞 Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著低于 CK 组, Bax 和 NLRP3 蛋白表达显著高于 CK 组($P < 0.05$); LPS+GGs-L 组和 LPS+GGs-H 组 HGFs 细胞 Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著高于 LPS 组, Bax 和 NLRP3 蛋白表达显著

低于 LPS 组, 且 LPS+GGs-H 组 HGFs 细胞 Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著高于 LPS+GGs-L 组, Bax 和 NLRP3 蛋白表达显著低于 LPS+GGs-L 组($P < 0.05$); LPS+GGs-H+ML385 组 HGFs 细胞 Bcl-2、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著低于 LPS+GGs-H 组, Bax 和 NLRP3 蛋白表达显著高于 LPS+GGs-H 组($P < 0.05$)。见表 6 和图 3。

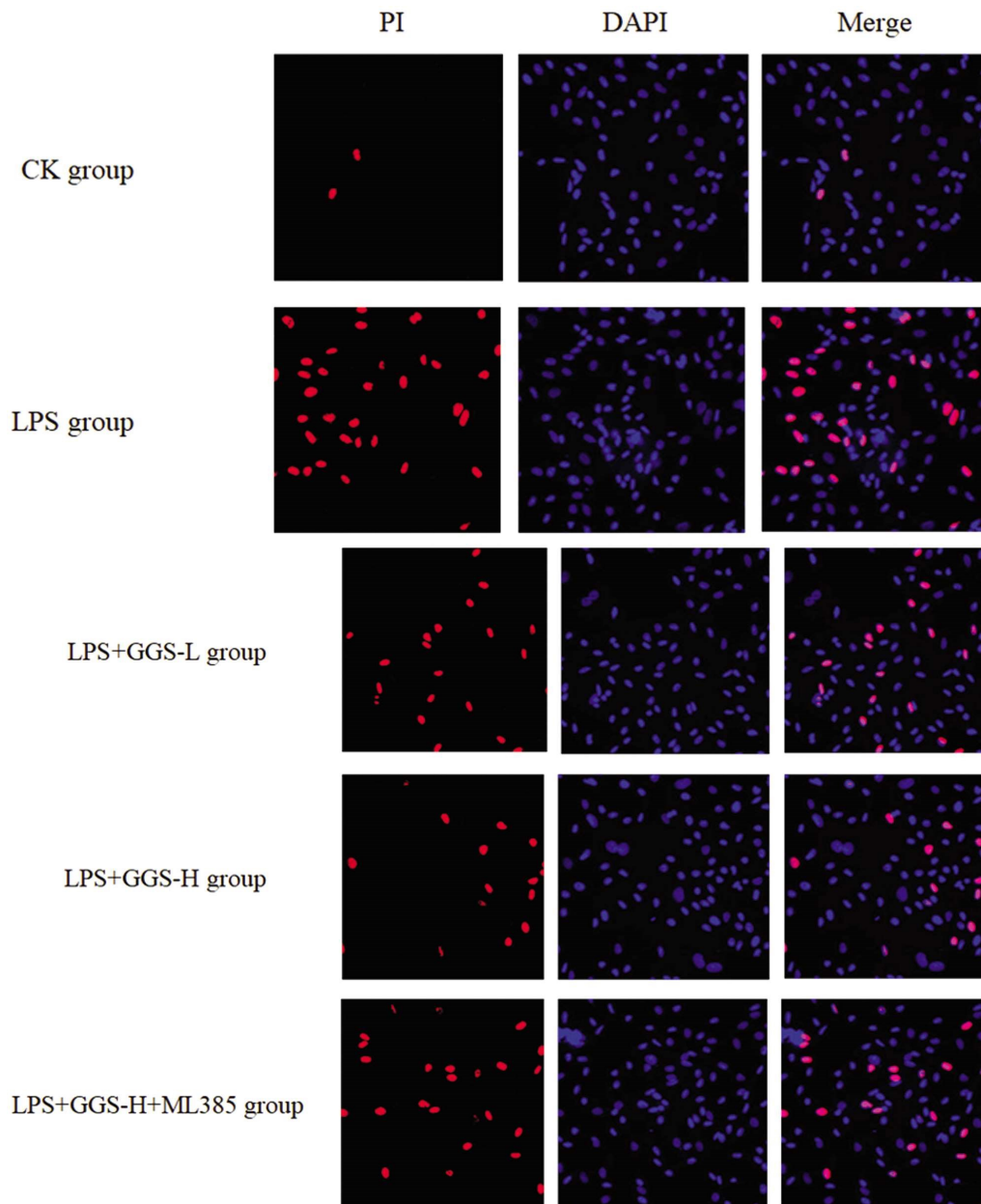


图2 各组细胞 PI 染色结果

Fig.2 PI staining results of cells in each group

表5 GGS 对各组细胞焦亡的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effects of GGS on pyroptosis in each group of cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	PI positive cell rate(%)
CK group	2.74± 0.31
LPS group	26.53± 2.82 ^a
LPS+GGS-L group	18.95± 2.24 ^b
LPS+GGS-H group	11.62± 1.57 ^{bc}
LPS+GGS-H+ML385 group	20.37± 2.68 ^d

Note: Consistent with Table 1.

3 讨论

牙周炎是一种常见的口腔疾病,主要由于牙周支持组织被细菌感染后引起牙周组织破坏,牙槽骨吸收,严重时造成牙齿脱落,据统计我国成年人牙周炎发病率超过 80%,已成为严重

影响人民生活的疾病之一^[12,13]。牙龈卟啉单胞菌是引发牙周炎的主要致病菌,而其分泌的 LPS 是主要致病因子,可引起机体免疫反应,促进炎症反应发生,破坏牙周组织,加速牙周炎发展^[4]。HGFs 细胞是牙龈结缔组织的重要成分,直接受到细菌及其代谢产物影响,具有清除炎症细胞的作用,HGFs 细胞功能受

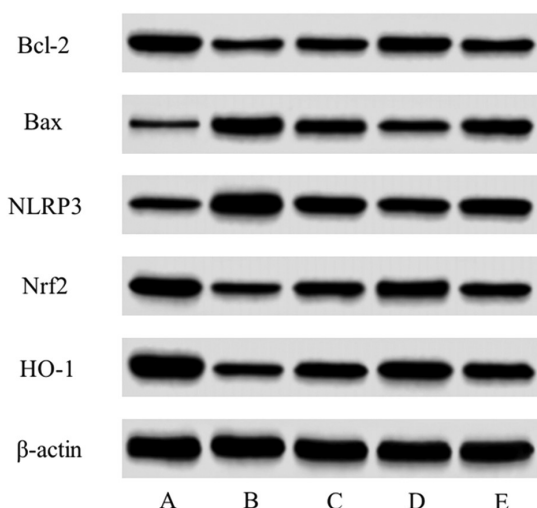


图3 各组细胞 Bcl-2、Bax、NLRP3、Nrf2、HO-1 蛋白表达

Fig.3 The protein expression of Bcl-2, Bax, NLRP3, Nrf2 and HO-1 in each group of cells

Note: A: CK group; B: LPS group; C: LPS+GGs-L group.
D: LPS+GGs-H group. E: LPS+GGs-H+ML385 group.

表 6 各组 HGFs 细胞 Bcl-2、Bax、NLRP3、Nrf2、HO-1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Comparison of Bcl-2, Bax, NLRP3, Nrf2 and HO-1 protein expression in HGFs cells of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	Bcl-2	Bax	NLRP3	Nrf2	HO-1
CK group	0.86 \pm 0.10	0.23 \pm 0.04	0.37 \pm 0.05	0.93 \pm 0.11	1.14 \pm 0.15
LPS group	0.29 \pm 0.04 ^a	0.78 \pm 0.09 ^a	1.08 \pm 0.13 ^a	0.32 \pm 0.05 ^a	0.43 \pm 0.06 ^a
LPS+GGs-L group	0.47 \pm 0.06 ^b	0.59 \pm 0.07 ^b	0.82 \pm 0.10 ^b	0.57 \pm 0.08 ^b	0.68 \pm 0.09 ^b
LPS+GGs-H group	0.72 \pm 0.09 ^{bc}	0.41 \pm 0.06 ^{bc}	0.59 \pm 0.07 ^{bc}	0.76 \pm 0.10 ^{bc}	0.91 \pm 0.12 ^{bc}
LPS+GGs-H+ML385 group	0.46 \pm 0.07 ^d	0.63 \pm 0.08 ^d	0.84 \pm 0.11 ^d	0.54 \pm 0.07 ^d	0.65 \pm 0.08 ^d

Note: Consistent with Table 1.

NLRP3, 经过一系列级联反应可引起细胞膜上寡聚形成微孔,使细胞膜出现孔洞,导致细胞肿胀破裂并释放内容物,进而诱使细胞凋亡;LDH 是一种糖酵解酶,可以透过破损的细胞膜孔释放到胞外,LDH 升高时反应细胞损伤,常用于细胞损伤的检测指标 [20,21]。本研究结果显示,LPS 可造成 HGFs 细胞 NLRP3 蛋白和 LDH 水平升高,提示 LPS 可能通过细胞焦亡造成细胞损伤。经 GGS 干预后可降低 NLRP3 蛋白和 LDH 水平,降低细胞损伤。进一步通过细胞膜孔实验证实,GGS 可降低 HGFs 细胞 PI 染色阳性率。研究显示 LPS 可诱导细胞产生活性氧聚集,引起细胞氧化损伤,活性氧还可促进炎症因子释放加重炎症损伤。MDA 为脂质氧化损伤产物,是细胞氧化损伤的标志,GSH-Px 和 SOD 为抗氧化酶,可清除体内活性氧,降低氧化损伤 [22]。本研究结果显示,LPS 可造成 HGFs 细胞氧化损伤,细胞内抗氧化酶活性显著降低,经 GGS 干预后可显著降低氧化损伤,提高抗氧化能力。进一步通过细胞增殖和凋亡实验发现,GGS 可增强 HGFs 细胞活性,促进细胞增殖,降低细胞凋亡。提示 GGS 可减轻 LPS 诱导的 HGFs 细胞炎症和氧化应激,促进细胞增殖,降低细胞凋亡。

Nrf2/HO-1 信号通路参与调控机体氧化应激和炎症反应,Nrf2 是一种细胞中广泛存在的重要的转录因子,属于内源性抗氧化防御的重要调控因子,正常状态下以复合体形式存,激活

损或失调会导致炎症时间延长,因此 HGFs 细胞对保护牙周组织发挥积极作用 [15]。GGS 是中药天然植物葛根的主要活性成分,具有降血脂、抗炎、抗肿瘤等生活活性 [16]。朱智芸等 [17] 研究显示 GGS 可降低 LPS 诱导的细胞炎症因子分泌。詹乐等 [18] 研究显示 GGS 可降低牙周炎大鼠炎症反应和牙槽骨吸收,调节细胞免疫平衡,改善牙周组织损伤。推测 GGS 具有降低炎症和改善牙周炎的作用。

牙周炎是一种免疫炎性破坏性疾病,前期表现为牙龈组织慢性炎症,主要是牙龈卟啉单胞菌产生代谢物 LPS,作用于牙周组织诱发免疫炎症,进而产生多种炎症因子如 IL-6、IL-1 β 等,形成炎症微环境,对牙周组织造成损伤,最终引起牙齿脱落 [19]。本研究结果显示,LPS 可抑制 HGFs 细胞增殖,经 GGS 干预后可改善 HGFs 细胞增殖的抑制情况。提示 GGS 可有效调节 HGFs 细胞增殖。本研究结果显示,LPS 可促进 HGFs 细胞产生大量炎症因子 IL-6、IL-1 β ,而抑制抗炎因子 IL-10 释放,造成 HGFs 细胞炎症,经 GGS 干预后可显著抑制炎症因子 IL-6、IL-1 β 释放,提高抗炎因子 IL-10 水平,降低炎症反应。细胞焦亡是一种炎症依赖性细胞凋亡,细胞被感染后激活炎症小体

的 Nrf2 进入细胞核与 ARES 结合并启动下游 HO-1 的表达,HO-1 是血红素降解的限速酶,可抑制炎症反应和氧化应激 [23]。Sun 等 [24] 研究表明激活 Nrf2/HO-1 信号通路可抑制炎症小体信号通路,减轻 LPS 诱导的心肌细胞炎症和氧化应激,降低细胞损伤。Kang 等 [25] 研究表明激活 Nrf2/HO-1 信号通路可降低 LPS 诱导的细胞炎症、氧化应激和细胞焦亡。本研究结果显示,LPS 组 HGFs 细胞 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著降低,Nrf2/HO-1 信号通路被抑制。经 GGS 干预后可提高 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达,激活 Nrf2/HO-1 信号通路。推测 Nrf2/HO-1 信号通路可能是 GGS 的作用靶点,为进一步验证该结论,本研究在 GGS 干预基础上用 Nrf2/HO-1 信号通路抑制剂 ML385 进行干预,结果显示 ML385 可减轻 GGS 对 LPS 诱导的 HGFs 细胞炎症损伤的改善作用。综合以上结果得出结论,GGS 可能是通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路来减轻 LPS 诱导的 HGFs 细胞炎症。

综上所述,GGS 可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路来减轻 LPS 诱导的 HGFs 细胞炎症和氧化应激,降低细胞凋亡。引起 HGFs 细胞炎症的因素较多,可能还存在其他通路,还需进一步深入研究。

参考文献(References)

[1] Chen Y, Liu Y, Li H, et al. C5aR antagonist inhibits LPS-induced inflammation in human gingival fibroblasts via NF- κ B and MAPK

- signaling pathways [J]. *J Appl Oral Sci*, 2023, 31 (2): e20220404-e2022415.
- [2] Qiu W, Wang Z, Chen Z, et al. The adiponectin receptor agonist AdipoAI attenuates periodontitis in diabetic rats by inhibiting gingival fibroblast-induced macrophage migration[J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(18): 2436-2451.
- [3] 俞梅, 李娜, 喻锦娴, 等. 牙龈卟啉单胞菌脂多糖通过 TXNIP/Nlrp3 炎症通路对小鼠牙周膜成纤维细胞迁移的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2022, 22(5): 832-836, 862.
- [4] Huang RY, Chang HY, Chih SM, et al. Silibinin alleviates inflammation-induced bone loss by modulating biological interaction between human gingival fibroblasts and monocytes[J]. *J Periodontol*, 2023, 94(7): 905-918.
- [5] Li J, Peng Y. Effect of puerarin on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48 (4): 51641-51652.
- [6] 支旺, 温惠慧, 崔志强. 葛根素通过抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路调节 LPS 诱导的人牙髓干细胞的炎症损伤和成骨分化[J]. *实用口腔医学杂志*, 2023, 39(5): 648-654.
- [7] Xin X, Liu J, Liu X, et al. Melatonin-Derived Carbon Dots with Free Radical Scavenging Property for Effective Periodontitis Treatment via the Nrf2/HO-1 Pathway[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(11): 8307-8324.
- [8] Huang C, Zhang C, Yang P, et al. Eldecalcitol Inhibits LPS-Induced NLRP3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis in Human Gingival Fibroblasts by Activating the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14(2): 4901-4913.
- [9] 陈鸿, 阮红日, 马天文, 等. 葛根素干预软骨氧化应激和 Nrf2/HO-1 通路改善 PTOA 大鼠软骨退变的机制[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (9): 3951-3963.
- [10] 高娟, 伍燕, 郑之峻, 等. 黄芩苷对脂多糖诱导人牙龈成纤维细胞表达炎症因子的影响[J]. *中华全科医学*, 2022, 20(12): 2002-2005.
- [11] 侯玮琛, 张桂美, 张舒石. 姜酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 OGD/R 后氧化应激损伤对 HT22 细胞凋亡的抑制作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(1): 97-105.
- [12] Zhang K, Chen X, Zhou R, et al. Inhibition of gingival fibroblast necroptosis mediated by RIPK3/MLKL attenuates periodontitis [J]. *J Clin Periodontol*, 2023, 50(9): 1264-1279.
- [13] 季明辉, 谭选平, 徐婷, 等. 牙周炎影响下口腔微生物群落的变化及检测技术的研究进展[J]. *江苏医药*, 2021, 47(3): 308-312.
- [14] Qiao S, Li B, Cai Q, et al. Involvement of ferroptosis in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated periodontitis in vitro and in vivo[J]. *Oral Dis*, 2023, 29(8): 3571-3582.
- [15] Li L, Sun W, Yu J, et al. Effects of titanium dioxide microparticles and nanoparticles on cytoskeletal organization, cell adhesion, migration, and proliferation in human gingival fibroblasts in the presence of lipopolysaccharide [J]. *J Periodontal Res*, 2022, 57 (3): 644-659.
- [16] 曹盼, 张樱山, 魏学明, 等. 葛根素药理作用研究新进展[J]. *中成药*, 2021, 43(8): 2130-2134.
- [17] 朱智芸, 王自梁, 车彦云, 等. 葛根中 3 个异黄酮类化合物对 ox-LDL 诱导的脂质沉积和 LPS 诱导的炎症的影响 [J]. *海峡药学*, 2023, 35(7): 17-21.
- [18] 詹乐, 马瑞靖, 万妮, 等. 葛根素对牙周炎大鼠 Th17/Treg 细胞免疫平衡及相关转录因子表达的影响[J]. *昆明医科大学学报*, 2022, 43 (11): 36-43.
- [19] Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(7): 426-440.
- [20] Leng S, Xu W, Wu L, et al. NLRP3 Disturbs Treg/Th17 Cell Balance to Aggravate Apical Periodontitis [J]. *J Dent Res*, 2023, 102 (6): 656-666.
- [21] 胡文龙, 谢雨瑶, 杨新霞, 等. 氧化苦参碱对脂多糖诱导星形胶质细胞炎症因子释放的影响[J]. *锦州医科大学学报*, 2022, 43(5): 1-5.
- [22] Xie M, Tang Q, Nie J, et al. BMAL1-Downregulation Aggravates *Porphyromonas Gingivalis*-Induced Atherosclerosis by Encouraging Oxidative Stress[J]. *Circ Res*, 2020, 126(6): e15-e29.
- [23] Jiang Y, Yang P, Li C, et al. Periostin regulates LPS-induced apoptosis via Nrf2/HO-1 pathway in periodontal ligament fibroblasts [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(5): 2188-2204.
- [24] Sun F, Xu K, Zhou J, et al. Allicin protects against LPS-induced cardiomyocyte injury by activating Nrf2-HO-1 and inhibiting NLRP3 pathways[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2023, 23(1): 410-412.
- [25] Kang JY, Xu MM, Sun Y, et al. Melatonin attenuates LPS-induced pyroptosis in acute lung injury by inhibiting NLRP3-GSDMD pathway via activating Nrf2/HO-1 signaling axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 109(2): 108782-108793.