

木犀草素对铜绿假单胞菌上清液诱导 RAW264.7 炎症反应的作用

耿亚飞^{1,2}, 杨成^{1,2}, 赵炳天^{1,2*}

(1. 江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学合成与生物胶体教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: **目的** 研究木犀草素对铜绿假单胞菌上清液 (PA-SUP) 诱导巨噬细胞 RAW264.7 炎症反应的作用。**方法** 采用 MTT 法测定细胞毒性, 荧光酶标仪测定细胞内 ROS 水平, ELISA 法测定炎症因子 NO、iNOS、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 COX-2 水平, Western blot 法检测 NF- κ B p65 蛋白相对表达。**结果** 与对照组比较, PA-SUP 和 5、10、20 μ mol/L 木犀草素对 RAW264.7 细胞均无毒性 ($P>0.05$)。与 PA-SUP 刺激组比较, 不同浓度木犀草素均可以下调 PA-SUP 诱导产生的 ROS、NO、iNOS、IL-6、IL-1 β 和 COX-2 ($P<0.05$), 10、20 μ mol/L 木犀草素可以抑制炎症因子 TNF- α 的分泌和 NF- κ B p65 的核移位 ($P<0.05$)。**结论** 木犀草素可以抑制 PA-SUP 所诱导的巨噬细胞 RAW264.7 的炎症反应, 下调细胞氧化应激水平。

关键词: 木犀草素; 铜绿假单胞菌; RAW264.7; 炎症; 氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1686-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.053

铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*, PA) 是一种医院内常见的条件致病菌, 占院内感染的 57%, 可导致免疫缺陷性囊性纤维化和烧伤患者的致命感染^[1]。铜绿假单胞菌也可以通过调控毒力因子 (绿脓菌素、外毒素 A、弹性蛋白酶、蛋白酶等) 的合成增强其毒力和致病性^[2]。Rashid 等^[3]研究表明, 注射绿脓菌素后, 小鼠多个器官的氧化应激水平显著上升。Holt 等^[4]研究也表明, 外毒素 A 可以影响小鼠的免疫应答。此外, 铜绿假单胞菌分泌的信号分子 3-oxo-C12-HSL 也可以诱导小鼠巨噬细胞的凋亡和吞噬作用^[5]。

在机体感染期间, 巨噬细胞作为免疫的重要组成, 除了直接吞噬病原体外, 还可以激活诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和环氧合酶 (COX-2) 的表达, 产生多种炎症因子促进病原体的清除^[6]。但过度的炎症反应可能会导致脓毒症或中毒性休克综合征的发生。铜绿假单胞菌的上清液中富含其分泌的毒力因子和信号分子, 可以诱导小鼠产生较高的炎症反应^[7], 从而逐渐诱发慢性感染。

木犀草素作为一种天然黄酮类化合物, 具有抑菌、抗炎等药理活性^[8]。但目前对木犀草素在细胞水平的抗炎活性研究, 主要集中在脂多糖 (LPS)、干扰素- γ (IFN- γ) 刺激的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 模型^[9], 尚未有文献报道木犀草素对铜绿假单胞菌上清液诱导 RAW264.7 炎症反应的作用。本研究旨在探究木犀草素对铜绿假单胞菌上清液诱导 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型的抗炎活性, 以期 为木犀草素在铜绿假单胞菌临床感染治疗中的应用提供依据。

1 材料

1.1 实验细胞及菌株 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 (目录号 BNCC342033); 铜绿假单胞菌标准菌株 (货号 ATCC27853), 购自苏州北纳创联生物技术有限公司。

1.2 仪器 SW-CJ-1FD 型超净操作台 (苏州安泰空气技术有限公司); MPW-352R 型高速离心机 [谱驰科技 (上海) 有限公司]; Cytation5 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Mshot-MF52-LED 型倒置显微镜 (广州市明美光电技术有限公司); Steri-Cycle i160 型细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DYCZ-24KI/Kt 型电泳仪、DYCZ-40K 型转印仪 (北京六一生物技术有限公司); ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 试剂与药物 木犀草素 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 纯度 98%, 货号 L107328)。酵母提取物、浆蛋白与核蛋白提取试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号 2046857-02、VG297271); 胰蛋白胍、氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20191203、20201019); 磷酸盐缓冲液 (PBS)、DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司, 批号 AF29496678、AF29449021); 青霉素-链霉素双抗 (美国 Gibco 公司, 货号 15140-122); 胎牛血清 (澳大利亚 Ausgenex 公司, 批号 FBSSA00616-1); 噻唑蓝 (MTT)、2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) (美国 Sigma 公司, 货号 M2128、D6883); 二甲亚砜 (DMSO) (上海泰坦化学有限公司, 批号 P1744117); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 酶联免疫吸附剂

收稿日期: 2021-10-10

作者简介: 耿亚飞 (1996—), 女, 硕士生, 从事天然研究。Tel: 15061886060, E-mail: gengyafei6060@163.com

* 通信作者: 赵炳天 (1984—), 男, 博士, 副研究员, 从事天然产物研究。Tel: 13606171006, E-mail: btzhao@jiangnan.edu.cn

(ELISA) 检测试剂盒 (美国 R&D 公司, 批号 P228039、P247148); IL-1 β ELISA 检测试剂盒 [爱必信 (上海) 生物科技有限公司, 货号 abs520001]; 一氧化氮 (NO)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶 (COX-2) ELISA 检测试剂盒、Lamin B 一抗 (英国 Abcam 公司, 货号 ab65328、ab178945、ab159279、ab32535); NF- κ B p65 一抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 8242S); RIPA 细胞裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、 β -actin 一抗、BCA 蛋白浓度试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、超敏 ECL 发光液、PVDF 膜 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 P0013B、P1045、AF0003、P0010S、P0688、P0018S、FFP24); 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 P1015)。

2 方法

2.1 铜绿假单胞菌上清液的制备 制备方法参照姚富荣等^[10] 研究报道, 并稍作改动。将对数生长期的铜绿假单胞菌接种于细菌液体培养基 (胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、去离子水 1 L, pH 7.2) 中, 于 37 $^{\circ}$ C 摇床中培养 16 h, 1 600 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤, 获得铜绿假单胞菌上清液 (PA-SUP), 并于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2 细胞培养 将 RAW264.7 巨噬细胞置于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 完全培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 在倒置显微镜下观察细胞密度, 每隔 1~2 d 传代 1 次。

2.3 实验分组 将 RAW264.7 细胞分为 3 组, 对照组细胞用 DMEM 培养基培养 (不含 PA-SUP 和木犀草素); 刺激组用含 0.025% PA-SUP 的 DMEM 培养基处理细胞; 给药组用含 5、10、20 μ mol/L 木犀草素的 0.025% PA-SUP DMEM 培养基中分别培养细胞。

2.4 细胞毒性实验 将 RAW264.7 细胞悬液按每孔 1 $\times$ 10⁴ 个的密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 贴壁后, 轻轻吸去上清液, 按 “2.3” 项下分组培养 24 h, 每组设置 6 个复孔。孵育结束后, 吸去上清液并用 PBS 轻洗 3 次, 每孔加入 100 μ L 0.5 mg/mL MTT 溶液, 于培养箱中避光继续孵育 4 h, 加入 100 μ L DMSO, 37 $^{\circ}$ C 振荡 10 min, 酶标仪测定 490 nm 处的吸光度, 计算细胞活力。

2.5 细胞内 ROS 水平检测 取对数生长期的 RAW264.7 细胞悬液, 按每孔 5 $\times$ 10⁴ 个的密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 贴壁后, 向对照组和刺激组中加入 DMEM 培养基, 给药组加入含不同浓度 (5、10、20 μ mol/L) 木犀草素的 DMEM 培养基预处理 3 h, 再分别向刺激组和给药组加入 PA-SUP 培养 24 h。培养结束后, 每孔加入 150 μ mol/L DCFH-DA 溶液, 避光孵育 30 min, 用多功能荧光酶标仪以激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm 的条件测定荧光强度。

2.6 细胞上清液 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平检测 将 RAW264.7 细胞悬液按每孔 5 $\times$ 10⁶ 个的密度接种于 6 孔板中, 按 “2.5” 项下方法分组、给药, 培养结束后, 收集

细胞上清液, 参照 ELISA 试剂盒说明书检测 RAW264.7 细胞上清液 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平。

2.7 细胞 iNOS、COX-2 水平检测 按 “2.6” 项下方法分组、给药处理细胞, 培养结束后, 吸去上清液并用 PBS 轻洗细胞 3 次, 加入细胞裂解液于 4 $^{\circ}$ C 裂解细胞, 4 $^{\circ}$ C、16 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书对各组样品的蛋白浓度进行测定并稀释至相同质量浓度 (2 mg/mL), 参照 ELISA 试剂盒说明书检测 iNOS 和 COX-2 水平。

2.8 Western blot 法检测细胞 NF- κ B p65 蛋白表达 将 RAW264.7 细胞悬液按每孔 2 $\times$ 10⁷ 个的密度接种于 6 孔板中, 培养 12 h 贴壁后, 按 “2.5” 项下方法处理细胞, 培养结束后, 轻轻吸去细胞上清液, 用 PBS 轻洗 3 次后, 按照试剂盒说明书分别提取细胞质与细胞核蛋白, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组样品蛋白浓度, 调整各组样品蛋白的上样量为 20 μ g, 与蛋白上样缓冲液混合后, 沸水浴加热 3 min 使蛋白变性, 样品冷却后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 待目的蛋白条带电泳分离后, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 将膜用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 90 min, 之后依次用一抗、二抗孵育, 孵育结束后, 使用 ECL 超敏发光液, 将膜置于凝胶成像系统显影, 获取蛋白印迹图片, 并用 Image J 软件分析目的蛋白与内参蛋白的灰度值比, 分析各组细胞 NF- κ B p65 蛋白相对表达。细胞核内 NF- κ B p65 表达以 Lamin B 为内参, 细胞质内 NF- κ B p65 表达以 β -actin 为内参。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理, 实验结果以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 木犀草素及 PA-SUP 对 RAW264.7 细胞毒性的影响 由图 1 可知, 与对照组比较, PA-SUP 和 5、10、20 μ mol/L 木犀草素对 RAW264.7 细胞均无毒性 (*P*>0.05)。

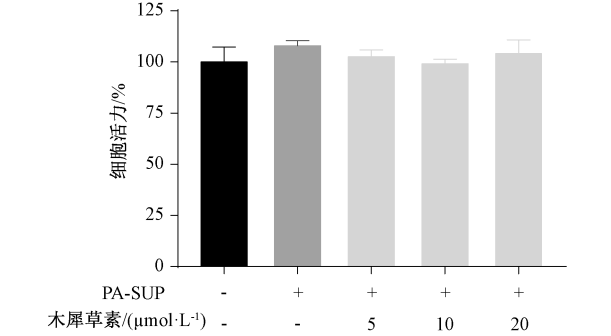
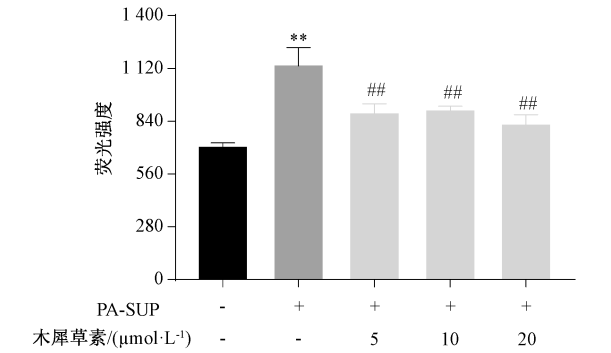


图 1 木犀草素及 PA-SUP 对 RAW264.7 细胞毒性的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n*=3)

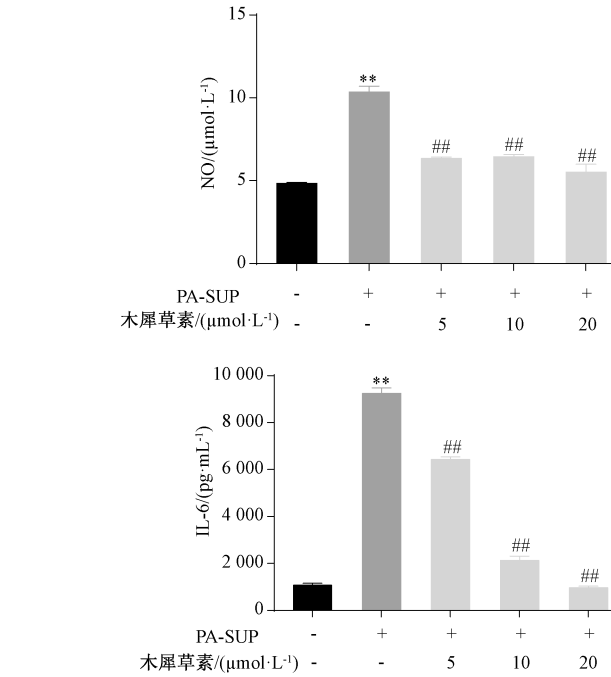
3.2 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响 由图 2 可知, 与对照组比较, 经 PA-SUP 刺激后, RAW264.7 细胞上清液中 ROS 水平升高 (*P*<0.01), 这可能是由于 PA-SUP 中绿脓菌素诱导 RAW264.7 细胞氧化应

激水平上升；与刺激组比较，5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素均可降低细胞上清液中 ROS 水平 ($P<0.01$)。



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与刺激组比较，## $P<0.01$ 。
图 2 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、

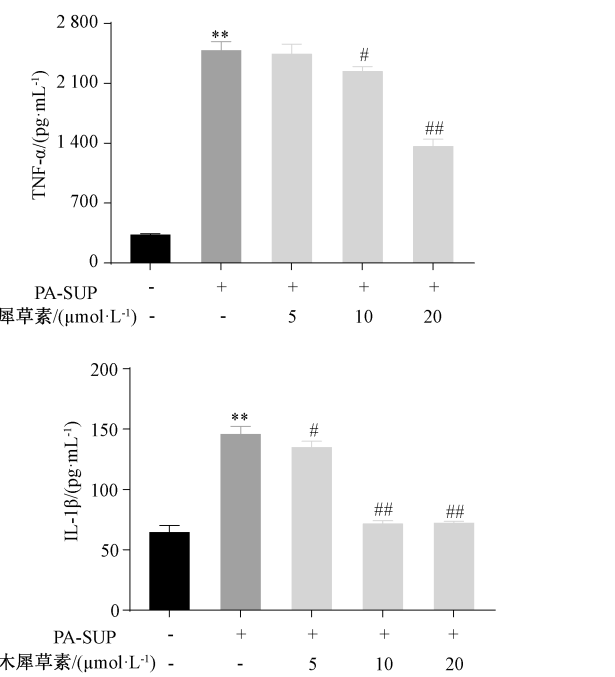


注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与刺激组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 3 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

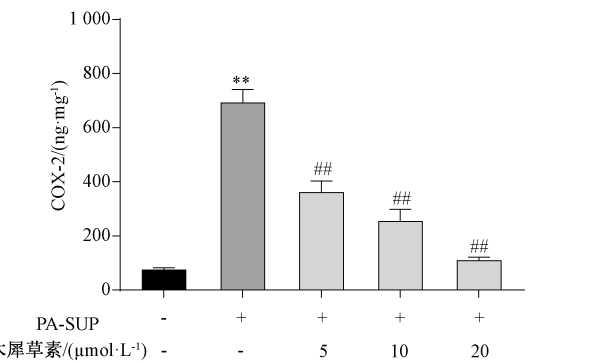
TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响 由图 3 可知，与对照组比较，PA-SUP 刺激可以诱导 RAW264.7 细胞产生炎症反应，使得 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平升高 ($P<0.01$)；与刺激组比较，给药组细胞上清液中 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.4 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 水平的影响 由图 4 可知，与对照组比较，经 PA-SUP 刺激后，RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 水平升高 ($P<0.01$)；与刺激组比较，给药组细胞 iNOS、COX-2 水平降低 ($P<0.01$)。

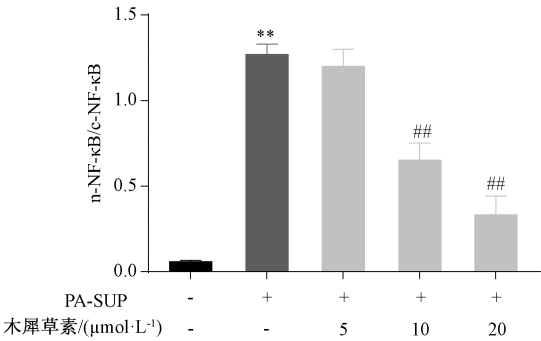
3.5 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 由图 5 可知，与对照组比较，PA-SUP 刺激后，细胞核中 p65 表达增加 ($P<0.01$)；与刺激组比较，10、20 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素组均可抑制 p65 的核移位 ($P<0.01$)，表明木犀草素是通过抑制 p65 进入细胞核来发挥其抗炎活性的。



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与刺激组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 3 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与刺激组比较，## $P<0.01$ 。
图 4 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：n-NF-κB 表示细胞核内 NF-κB p65；c-NF-κB 表示细胞质内 NF-κB p65。与对照组比较，** $P<0.01$ ；与刺激组比较，## $P<0.01$ 。

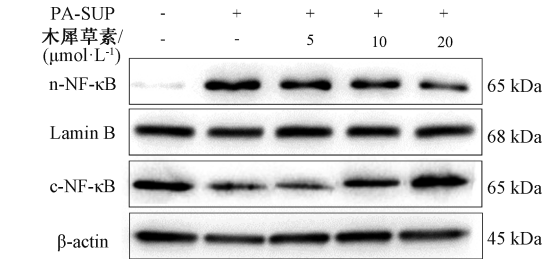
图 5 木犀草素对 PA-SUP 诱导的 RAW264.7 细胞中 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

近年来，PA 耐药菌株频繁出现，其自身分泌的毒力因子和信号分子等又可以增强其毒力和致病性^[2]，从而使得被感染患者的临床治疗愈发困难，因此迫切需要寻找新的治疗方案。国内外的研究表明，PA-SUP、PA 活菌、其毒力因子及信号分子等可以诱导巨噬细胞炎症产生及细胞凋亡；还可以诱导小鼠氧化应激水平上升，产生较高的炎症反应^[3-5]。因此，通过解决 PA-SUP 在 PA 感染中所带来的炎症问题，降低 PA 致病性，可以为治疗 PA 临床感染的治疗提供新方法。

木犀草素作为一种天然黄酮类化合物，近年来的研究表明，其具有抑制 PA 群体感应^[11]、抗菌、抗氧化、抗炎等功效^[7-8]，但目前尚未报道其在 PA-SUP 诱导 RAW264.7 炎症反应中作用。本实验用 PA-SUP 诱导 RAW264.7 细胞，探究木犀草素在其中发挥的作用。结果表明，0.025% PA-SUP 和 5、10、20 μmol/L 木犀草素对 RAW264.7 细胞均无细胞毒性。

氧化应激与炎症反应是相互关联的，细胞受到氧化损伤后释放的 ROS 可以进一步作为刺激物诱发细胞炎症反应^[12]。NO 是一种自由基，其产生受到 iNOS 的调控^[13]，TNF-α、IL-6、IL-1β 作为 NF-κB 的下游炎症因子，在细胞的炎症反应中发挥着至关重要的作用^[14]。通常在正常生理状态下的细胞中，iNOS 和 COX-2 的表达极少，当细胞受到刺激时，iNOS 和 COX-2 表达上调，从而进一步调控炎症因子 NO 和前列腺素 E₂ (PGE₂) 的产生，加剧炎症反应^[15]。NF-κB 信号通路的调控在机体炎症反应和免疫应答中发挥着至关重要的作用，通常在未经刺激的细胞中，NF-κB 二聚体通过与 IκB 抑制因子结合被隔离在细胞质中，当细胞受到胞内外的刺激后，IκB 蛋白被降解，NF-κB 二聚体得到释放后从细胞质转移至细胞核中，激活与炎症相关的基因转录，调控相关炎症因子的分泌，如 IL-6、IL-1β、TNF-α 等^[16]。本研究发现，与未经处理的对照组比较，PA-SUP 刺激组细胞内 ROS 水平、炎症因子 NO、TNF-α、IL-6、IL-1β 水平及 iNOS、COX-2 水平均升高，PA-SUP 可以活化 NF-κB 通路，使得 p65 由细胞质转移至细胞核内。经木犀草素处理后，与 PA-SUP 刺激组比较，RAW264.7 细胞 ROS 水平、炎症因子 NO、TNF-α、IL-6、IL-1β 水平及 iNOS、



COX-2 水平均降低，且木犀草素可以通过降低 p65 的核移位，抑制 p65 进入细胞核来发挥其抗炎功效。

综上所述，PA-SUP 在 PA 感染中发挥着重要作用，其可以上调 RAW264.7 细胞的氧化应激水平和炎症反应，增加 PA 感染治疗的难度；而木犀草素可以抑制 PA-SUP 所诱导的炎症反应，下调细胞氧化应激水平，有望作为治疗 PA 临床耐药感染的新药物，应用于临床中，发挥其多重功效。

参考文献：

[1] Sarabhai S, Sharma P, Capalash N. Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53441.

[2] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Protein Cell*, 2015, 6 (1): 26-41.

[3] Rashid M I, Andleeb S, Ali A. Evaluation of pyocyanin induced systemic pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2020, 33(3): 915-922.

[4] Holt P S, Misfeldt M L. Alteration of murine immune response by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A [J]. *Infect Immun*, 1984, 45(1): 227-233.

[5] Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(10): 5785-5793.

[6] 刘文强, 张懿玲, 熊 华, 等. 基于 LPS 诱导 RAW 264.7 巨噬细胞炎症模型的榴莲壳多酚抗炎作用及其分子机制 [J]. *食品与机械*, 2020, 36(4): 15-20; 50.

[7] Ramos A N, Gobbato N, Rachid M, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Pseudomonas aeruginosa* culture supernatants on polymorphonuclear damage and inflammatory response[J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(2): 247-251.

[8] Li Z Y, Zhou Y M, Zhang N, et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models [J]. *Planta Med*, 2007, 73(3): 221-226.

[9] 王书侠, 张家明, 姚孝明, 等. 木犀草素对活化的 RAW264.7 巨噬细胞分泌炎症因子的影响[J]. *医学研究生*

学报, 2017, 30(1): 31-35.

[10] 姚富荣, 柴文成, 刘梦茹, 等. TLR4 在铜绿假单胞菌上清液诱导 RAW264. 7 巨噬细胞凋亡中的作用[J]. 免疫学杂志, 2019, 35(11): 941-947.

[11] Rivera M L C, Hassimotto N M A, Bueris V, *et al.* Effect of *Capsicum frutescens* extract, capsaicin, and luteolin on quorum sensing regulated phenotypes[J]. *J Food Sci*, 2019, 84(6): 1477-1486.

[12] Seo M, Kim H, Lee J H, *et al.* Pelargonidin ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by inhibiting the ROS-induced inflammatory apoptotic response[J]. *Biochimie*, 2020, 168: 10-16.

[13] Novichkova E, Chumin K, Eretz-Kdosha N, *et al.* DGLA from the microalga *Lobosphaera Incsa* P127 modulates inflammatory response, inhibits *iNOS* expression and alleviates NO secretion in RAW264. 7 murine macrophages[J]. *Nutrients*, 2020, 12(9): 2892.

[14] 葛建彬, 卢红建, 宋新建, 等. 枸杞多糖对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其抑制 NF- κ B, TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 表达的机制[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 326-331.

[15] Singh G, Kaur J, Kaur M, *et al.* Anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of imperatorin: evidences for involvement of COX-2, iNOS, NF κ B and inflammatory cytokines[J]. *Int J Neurosci*, 2020, 130(2): 176-185.

[16] Sahu B D, Mahesh Kumar J, Sistla R. Baicalein, a bioflavonoid, prevents cisplatin-induced acute kidney injury by up-regulating antioxidant defenses and down-regulating the MAPKs and NF- κ B pathways[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134139.

蛇床子素通过调控 *miR-26a* 表达对人牙周膜干细胞生物学特性的影响

陈亚琼, 高 鹏, 沈 慧
(青海红十字医院口腔科, 青海 西宁 810000)

摘要: 目的 探究蛇床子素通过调控 *miR-26a* 表达对人牙周膜干细胞 (PDLSCs) 生物学特性的影响及其相关机制。
方法 体外培养 PDLSCs 细胞, 以不同浓度蛇床子素 (0、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L) 进行干预, 筛选适宜浓度; 另将细胞分为蛇床子素 (1×10^{-5} mol/L) +anti-*miR*-NC 组、蛇床子素 (1×10^{-5} mol/L) +anti-*miR*-26a 组。采用甲基噻唑基四唑 (MTT) 法检测细胞活力和增殖能力, Transwell 实验检测细胞迁移能力, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *miR*-26a 表达, 蛋白质印迹 (Western blot) 法检测细胞增殖核抗原 Ki67 (Ki-67)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、基质金属蛋白酶 (MMP2)、基质金属蛋白酶 (MMP9) 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素组细胞 OD 值、迁移数、*miR*-26a 表达和 Ki-67、PCNA 蛋白表达升高 ($P<0.05$), MMP2、MMP9 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。与蛇床子素+anti-*miR*-NC 组比较, 蛇床子素+anti-*miR*-26a 组细胞 OD 值、迁移数、*miR*-26a 表达和 Ki-67、PCNA 蛋白表达降低 ($P<0.05$), MMP2、MMP9 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。**结论** 蛇床子素可能通过上调 *miR*-26a 表达促进 PDLSCs 细胞的增殖和迁移。

关键词: 蛇床子素; 人牙周膜干细胞 (PDLSCs); *miR*-26a; 增殖; 迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1690-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2023. 05. 054

牙 周 膜 干 细 胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) 是在人牙周组织中可分离得到多种具有再生潜能的成体干细胞, 能产生特定表型和功能的成熟细胞, 并在组织损伤、修复中发挥重要作用, 在体外微环境刺激下可分化成为成骨细胞、成牙骨质细胞以及成纤维细胞等^[1-3]。近年来, 大量研究证明传统中药材对 PDLSCs 细胞增殖分化有显著的影响^[4-6]。蛇床子素是从蛇床、欧前胡等传统中草药中提取的香豆素类化合物, 研究发现其具有促进细胞增殖和分化的能力, 还具有抗炎、抗凋亡、调节免疫等功

能^[7-8]。本实验主要探究蛇床子素通过调控 *miR*-26a 表达对 PDLSCs 细胞生物学特性的影响及其相关机制, 以期中药小分子化合物用于加速牙周细胞治疗的临床转化提供依据。

1 材料

人牙周膜干细胞 (PDLSCs) 购于美国菌种保藏中心 ATCC 库。蛇床子素购于中国食品药品检定研究院, 纯度 99.90%, 批号 30531。DMEM 培养基、青链霉素、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国 Gibco 公司; MTT 检测试剂盒购于北京博奥森生物技术公司; Transwell 小室购于美国