

[J]. *Nature*, 2018, 558(7708): 136-140.

[23] Shim M S, Nettesheim A, Hirt J, *et al.* The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1248-1261.

[24] Singh A K, Kashyap M P, Tripathi V K, *et al.* Neuroprotection through rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against amyloid- β -induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(8): 5815-5828.

[25] Liu J, Long S Y, Wang H, *et al.* Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 336.

[26] Wang F F, Cao M, Fan M J, *et al.* AMPK-mTOR-ULK1 axis activation-dependent autophagy promotes hydroxycamptothecin-induced apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4302-4315.

美洲大蠊提取物对脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞炎症的抑制作用

陆西星^{1,2}, 施正梅^{2#}, 祁 麟¹, 何俊丽¹, 王家云¹, 周翠玲¹, 何丽明^{1,2,*}, 张成桂^{2,3*}
(1. 大理大学第一附属医院口腔科, 云南 大理 671000; 2. 大理大学云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000; 3. 药用昆虫资源开发与综合利用工程研究中心, 云南 大理 671000)

摘要: **目的** 探究美洲大蠊提取物对脂多糖 (LPS) 刺激人牙周膜成纤维细胞 (HPDLFs) 炎症的抑制作用。**方法** 采用原代培养法获得 HPDLFs 细胞, 经免疫组化鉴定为牙周膜成纤维细胞。分别以 600、300、150、75、37.5、18.25 $\mu\text{g/mL}$ 美洲大蠊水提物和醇提物进行处理, 采用 MTT 法检测 12、24、36、48 h HPDLFs 细胞存活率, 选择合适的实验时间及剂量。建立 LPS 诱导牙周膜成纤维细胞炎症模型, 相应剂量药物给药, RT-qPCR 法检测 *IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 相对表达, ELISA 法检测 *IL-1 β* 、*IL-6*、TNF- α 、iNOS 水平, Western blot 法检测 p-NF- κB 、NF- κB 、p-p38、p38 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 在 36 h、150 $\mu\text{g/mL}$ 剂量以下, 美洲大蠊水提物、醇提物组细胞存活率随剂量升高而增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 LPS 组比较, 美洲大蠊水提物和醇提物组细胞 *IL-6*、*IL-1 β* mRNA 表达, TNF- α 、*IL-6* 水平, p-NF- κB 、NF- κB 、p-p38、p38 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 美洲大蠊提取物可能通过抑制 NF- κB 活化, 从而抑制 LPS 诱导的 HPDLFs 细胞释放 *IL-6*、TNF- α 等炎症因子, 进而抑制炎症反应, 且美洲大蠊水提物效果优于醇提物。

关键词: 美洲大蠊; 牙周膜成纤维细胞; 牙周炎; 脂多糖; 炎症; NF- κB

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1314-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.049

牙周炎是一种以牙周结缔组织破坏及牙槽骨吸收为特点的慢性炎症性口腔疾病, 它也是造成牙齿缺失并影响口腔健康的主要因素^[1]。牙菌斑生物膜中的细菌及其产物是牙周病的始动因子, 细菌分泌的脂多糖 (LPS) 激活宿主的免疫炎症反应, *IL-1 β* 、TNF- α 等表达升高, 并引起 MMPs 过度表达, 导致牙周软、硬组织逐渐形成不可逆性的破坏, 因此抑制炎症及促进牙周膜组织的再生是逆转牙周炎的关键^[2-3]。有关文献及课题组前期研究发现, 美洲大蠊乙醇提取物和水提物均有抗炎及促进口腔溃疡、胃溃疡和结肠黏膜损伤愈合的作用^[4-6]。本研究构建了人源性牙周

膜成纤维细胞的炎症模型, 进一步评价美洲大蠊提取物的抗炎作用, 以期为美洲大蠊应用于口腔牙周炎疾病的原位治疗提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人源性牙周膜成纤维细胞为原代培养细胞。

1.2 药物

1.2.1 美洲大蠊水提物 取美洲大蠊成虫的干燥全体 (1.2 kg), 粉碎后加 10 倍量纯水, 95 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 3 次, 每次 2 h, 收集提取液, 浓缩至 1.15 g/mL 左右, 加入 95% 乙醇, 调整含醇量为 50% ~ 70%, 搅拌 30 min, 冷藏室中静

收稿日期: 2022-09-09

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2020J0581); 云南省地方本科高校基础研究联合专项 (202001BA070001-044)

作者简介: 陆西星 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15087477213, E-mail: LXX15087477213@163.com

#共同第一作者: 施正梅 (1997—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 18214194674, E-mail: szm18214194674@163.com

*通信作者: 何丽明 (1975—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事中药抗牙周炎研究。Tel: 13987228988, E-mail: 1962334769@qq.com

张成桂 (1978—), 男, 博士, 教授, 研究方向免疫药理学。Tel: 18608729395, E-mail: chenggui_zcg@163.com

置 48 h, 过滤, 浓缩至 1.05~1.10 g/mL, 冷藏室中静置 24 h, 弃去上层油脂, 下层溶液过滤, 减压浓缩至 1.20~1.30 g/mL, 冷冻干燥后即得美洲大蠊水提取物。由大理大学昆虫生物医药研究院刘衡老师提供, 批号 20210513。取水提物 5.00 mg, 加入适量 PBS 充分溶解, 制备 1.0 mg/mL 母液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 于 4 ℃ 冰箱中保存, 临用时配成实验所需浓度。

1.2.2 美洲大蠊醇提物 取美洲大蠊成虫的干燥全体 (1.2 kg), 粉碎后加 4 倍量 95% 乙醇, 75 ℃ 回流提取 3 次, 每次 2 h, 收集提取液后过滤, 减压浓缩回收乙醇, 加入纯水搅拌 30 min, 冷藏室中静置 24 h, 过滤, 浓缩至 1.05~1.10 g/mL, 冷冻干燥, 即得, 由大理大学昆虫生物医药研究院刘衡老师提供, 批号 20210512。取 5.00 mg, 加入适量 PBS 充分溶解, 制成 1.0 mg/mL 母液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 于 4 ℃ 冰箱中保存, 临用时配成实验所需浓度。

1.3 试剂 DMEM 低糖培养基、胎牛血清 (批号 8121436、2158738P, 美国 Gibco 公司); RNA 易分离试剂、RT SuperMix Perfect for qRCR、SYBR qPCR Master Mix (批号 7E503D1、7E591D1、7E501K1, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 胰蛋白酶、PBS 粉末、胶原酶 I、青-链霉素混合液、脂多糖、甘氨酸、三 (羟甲基) 氨基甲烷、十二烷基硫酸钠 (批号 PB180225、P1010、225V061、P1400、325D038、126X062、203T072、526K031, 北京索莱宝科技有限公司); 小鼠抗人 Vimentin、pan-cytokerain 抗体 (批号 ab254015、ab213135, 英国 Abcam 公司); Envision 免疫组化试剂盒 (批号 Z25355, 美国赛默飞世尔科技有限公司); 脱脂奶粉 (批号 0252038, 美国 BD 公司); IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS ELISA 试剂盒 (批号 20210602, 南京建成生物工程研究所有限公司); 彩虹 180 光谱蛋白 marker、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、5×蛋白上样缓冲液 (批号 P0071、P0012A、70060100, 上海碧云天生物技术有限公司); ECL 发光液、PVDF 膜 (批号 P90319、32031602, 美国 Millipore 公司); NF-κB、p-NF-κB、p38、p-p38、GAPDH、anti-rabbit IgG 抗体 (批号 8242S、3033S、8690、4511S、5174T、7074P2, 美国 CST 公司)。二甲基亚砜、无水乙醇、异丙醇 [批号 20200501、1703113601、20200720, 福晨 (天津) 化学试剂有限公司]。

1.4 仪器 HC-3018R 型高速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); SPectra Max M2 型多功能酶标仪 [美谷分子仪器 (上海) 有限公司]; CKX41SF 型倒置生物显微镜 (日本 Olympus 公司); HVE-50 型自动高压灭菌器 (日本 Hirayama 公司); SERIES II 型二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 微量紫外分光光度计 (德国 Implen 公司); GET96-PLUS 型基因扩增仪、CFX96 型荧光定量分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); Tanon 5200 型化学发光成像分析仪 (上海天能科技有限公司); WIX-miniPRO2 型电泳仪 [韦克斯科技 (北京) 有限公司]。

2 方法

2.1 牙周膜成纤维细胞的分离与培养 2021 年 3 月至 2021 年 5 月收治于大理大学第一附属医院口腔科室的 13~25 岁正畸患者, 一般要求患者无全身系统性疾病, 牙齿牙根发育完整, 无龋坏、充填体、修复体, 无牙周病、根尖病变等^[7-9]。牙齿拔除后, 先用生理盐水冲洗牙根上的血渍, 于含 1% 双抗的 PBS 溶液中清洗 2~3 次。从牙根 1/3 处刮取牙周韧带组织, 置于含 0.04% I 型胶原酶和 1% 双抗 PBS 溶液的离心管中, 于 37 ℃ 恒温水浴锅中消化 30 min, 1 000 r/min 离心, 弃上清, 加入适量含 20% FBS 的培养基吹打混匀, 将其贴附在培养瓶底部, 放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。待组织贴壁后, 在培养瓶中加入 3~5 mL 含 20% FBS 的培养基, 使液面没过牙周膜组织, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养。每 3 d 更换 1 次培养基, 当细胞长至培养瓶底部 80% 时可进行传代培养。

2.2 牙周膜成纤维原代细胞的鉴定

2.2.1 细胞形态学观察 连续培养 7 d 后, 可观察到组织周围有少量细胞爬出。14 d 后, 待细胞长满时可进行消化传代, 取第 5 代细胞接种在有玻片的板中, 待细胞长至 60% 时取出, 进行常规 HE 染色, 在光学显微镜下观察细胞形态。

2.2.2 免疫组化鉴定 牙周膜成纤维原代细胞免疫组化鉴定方法参考文献 [7-9] 报道, 将染色后的玻片置于显微镜下观察染色情况, 并拍照记录。

2.3 MTT 法检测细胞存活率 参考文献 [10] 报道, 取第 5 代处于对数生长期的细胞, 调整密度为 2×10⁵/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 更换含 2% FBS 的 DMEM 低糖培养基培养 12 h, 空白组、阴性对照组加入等体积培养基, 美洲大蠊醇提物、水提物组分别加入 100 μL 600、300、150、75、37.5、18.25 μg/mL 美洲大蠊醇提物、水提物, 分别培养 12、24、36、48 h 每孔加入 5 mg/mL MTT 试剂 10 μL, 孵育 4 h 后, 弃上清, 加入 150 μL DMSO 溶液, 振荡 8~10 min, 于 490 nm 波长处测定光密度 (OD) 值, 计算细胞存活率, 重复 3 次。

2.4 ELISA 法检测 HPDLFs 细胞 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS 水平 参考文献 [11] 报道, 取第 5 代处于对数生长期的细胞, 调整密度为 2×10⁵/mL, 接种于 12 孔板中, 每孔 1 mL, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 更换含 2% FBS 的 DMEM 低糖培养基培养 12 h, 随机分为空白组、LPS 组 (100 ng/mL) 和美洲大蠊醇提物、水提物组 (150、75、37.5 μg/mL 美洲大蠊醇提物、水提物预先孵育 12 h 后, 再用 LPS 与药物共孵育 24 h), 按“2.3”项下方法给药, 每组 3 个复孔, 收集细胞上清, 根据 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1β、IL-6、TNF-α、iNOS 水平。

2.5 RT-qPCR 法检测 HPDLFs 细胞 *IL-1β*、*IL-6* mRNA 表达 收集“2.4”项下各组细胞, 加入 RNA-easy 试剂, 冰上裂解 5 min, 收集裂解液, 12 000 r/min 离心 15 min, 加

入等体积异丙醇静置 10 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清 (通常可见白色沉淀), 加入预冷 75% 乙醇, 8 000 r/min 离心 5 min, 重复洗 2~3 次, 晾干沉淀, 加入适量 ddH₂O 溶解 RNA, 测定 RNA 质量及浓度。根据逆转录试剂盒说明书, 使用 HiScript cDNA 合成试剂逆转录为 cDNA, 然后进行扩增反应, 条件为 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 重复 40 个循环。以 β -actin 为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算 *IL-1 β* 、*IL-6* mRNA 表达, 引物序列见表 1。

| 表 1 引物序列 | |
|-------------------------------|---------------------------|
| 基因 | 序列(5'→3') |
| <i>IL-1β</i> | 正向 GCGGCATCCAGCTACGAATCTC |
| | 反向 GCGGCATCCAGCTACGAATCTC |
| <i>IL-6</i> | 正向 GGGACTGGCAGAAAACAACC |
| | 反向 GCTCTGGCTTGTCCTCACT |
| β -actin | 正向 ACTGGGACGACATGGAGAAA |
| | 反向 CTGGATAGCAACGTACATGG |

2.6 Western blot 法检测 HPDLFs 细胞 NF- κ B、p-NF- κ B、p38、p-p38 蛋白表达 取对数生长期的细胞, 调整密度为 2×10⁵/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 按“2.4”项下方法分组、给药、培养, 收集各组细胞, 加入蛋白裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加入 5×蛋白上样缓冲

液, 95 ℃ 水浴 10 min 进行变性。蛋白样品上样 10 μ L, 凝胶电泳分离后转移到 PVDF 膜上, 用 5.0% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 NF- κ B、p-NF- κ B、p38、p-p38、GAPDH 一抗 (1: 1 000) 4 ℃ 摇床孵育过夜, 次日二抗山羊抗兔 IgG (1: 3 000) 孵育 1 h, 显影, Image J 软件分析条带灰度值, 用磷酸化蛋白与总蛋白的比值来反映目的蛋白活化水平。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 人牙周膜成纤维原代细胞的培养与鉴定

3.1.1 细胞形态学观察 牙周组织培养 7 d 时, 有少量细胞爬出, 细胞呈长梭形和星形, 见图 1A (×100), 胞体圆满, 核仁清晰可见; 随着培养时间延长, 细胞数量不断增加, 细胞呈放射状排列, 培养 15 d 时细胞长满, 似蜂窝状, 则进行传代培养, 见图 1B (×100)。HE 染色显示, 细胞形状呈长梭形, 细胞质为伊红, 细胞核为圆形或椭圆形, 位于细胞中央, 内含有 1-2 个核仁, 见图 1C (×200)。

3.1.2 免疫组化染色 抗波形蛋白染色阳性, 细胞质呈棕色, 细胞核浅蓝色, 见图 1D (×200); 抗角蛋白染色阴性, 细胞质无染色, 细胞核呈浅蓝色, 见图 1E (×200), 表明细胞属于中胚层来源, 结合采集部位为牙根根中 1/3 部位, 可证明分离培养的细胞为牙周膜成纤维细胞。

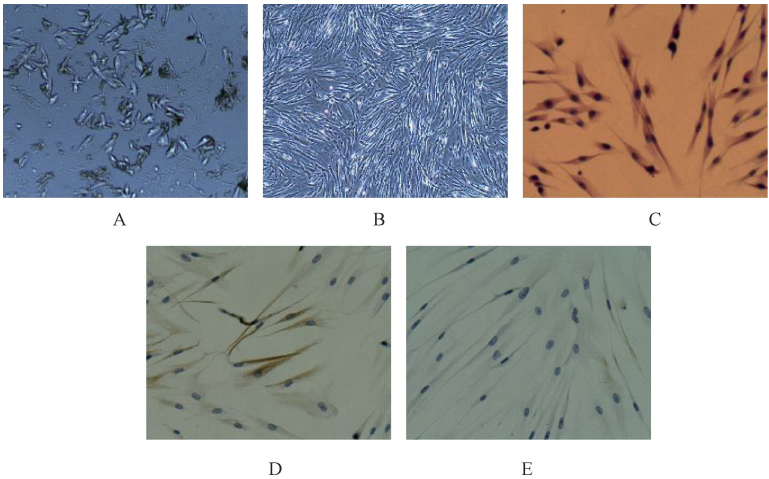


图 1 HPDLFs 原代细胞的分离、培养和鉴定

3.2 美洲大蠊提取物对 HPDLFs 细胞存活率的影响 如图 2 所示, 美洲大蠊水提物、醇提物各剂量对 HPDLFs 细胞均无明显抑制作用。美洲大蠊水提物给药 36、48 h 时, 在 37.5~150 μ g/mL 质量浓度范围内促进细胞增殖 ($P<0.05$, $P<0.01$); 美洲大蠊醇提物各剂量组给药 12、36 h 时, 有促细胞增殖的作用 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.3 美洲大蠊提取物对 LPS 刺激 HPDLFs 细胞分泌 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、iNOS 炎症因子的影响 如图 3 所示, 与空白组比较, LPS 组细胞 TNF- α 水平升高 ($P<0.01$), IL-6、IL-1 β 、iNOS 水平无明显变化 ($P>0.05$); 与 LPS 组比

1316

较, 美洲大蠊水提物、醇提物各剂量组细胞 TNF- α 、IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 美洲大蠊水提物 75、150 μ g/mL 组、醇提物 150 μ g/mL 组细胞 IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 美洲大蠊水提物 150 μ g/mL 组 iNOS 水平降低 ($P<0.05$)。

3.4 美洲大蠊提取物对 LPS 刺激 HPDLFs 细胞 *IL-6*、*IL-1 β* mRNA 表达的影响 如图 4 所示, 与空白组比较, LPS 组细胞 *IL-6*、*IL-1 β* mRNA 表达升高 ($P<0.01$); 与 LPS 组比较, 美洲大蠊水提物和醇提物各剂量组细胞 *IL-6* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 美洲大蠊水提物各剂量组、醇提

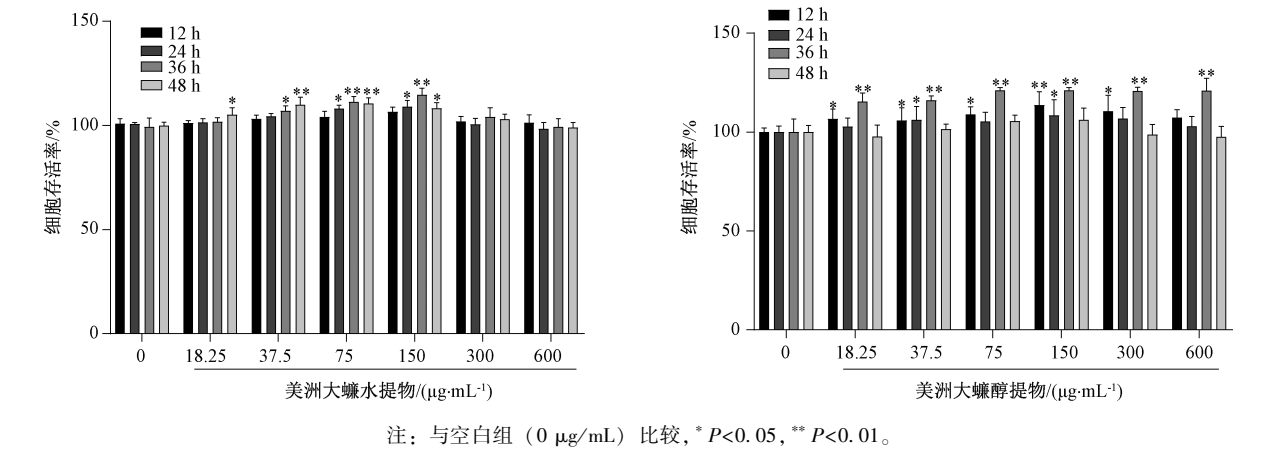


图 2 美洲大蠊提取物对 HPDLFs 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

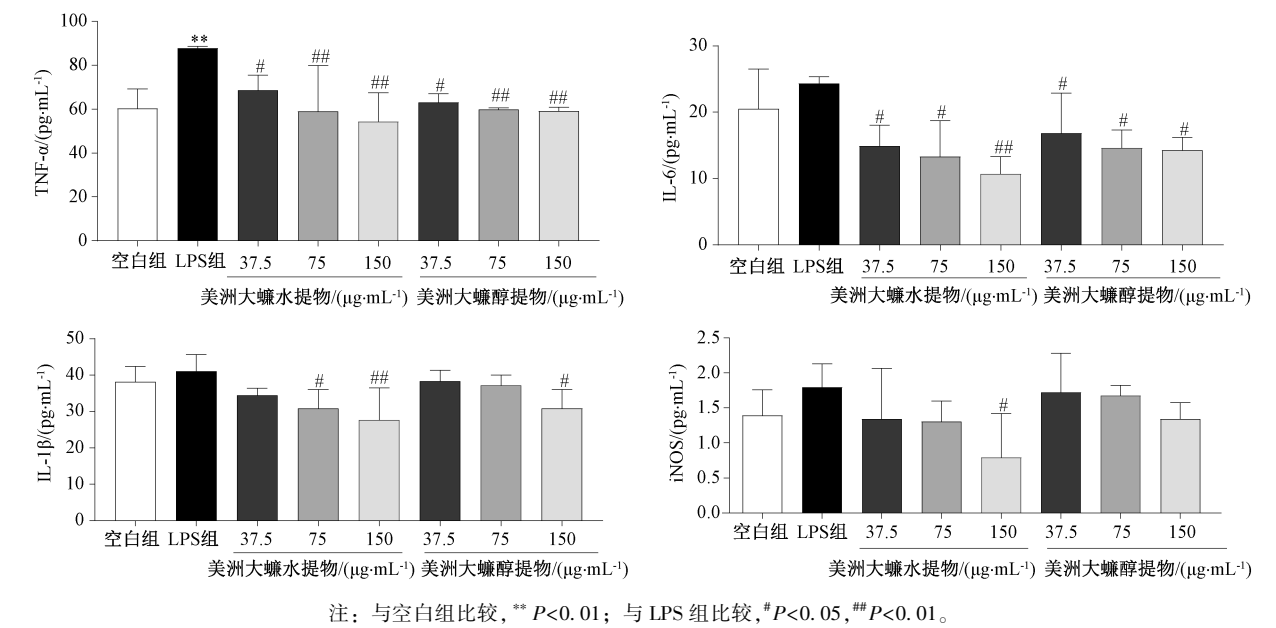


图 3 美洲大蠊提取物对 LPS 诱导 HPDLFs 细胞 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、iNOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

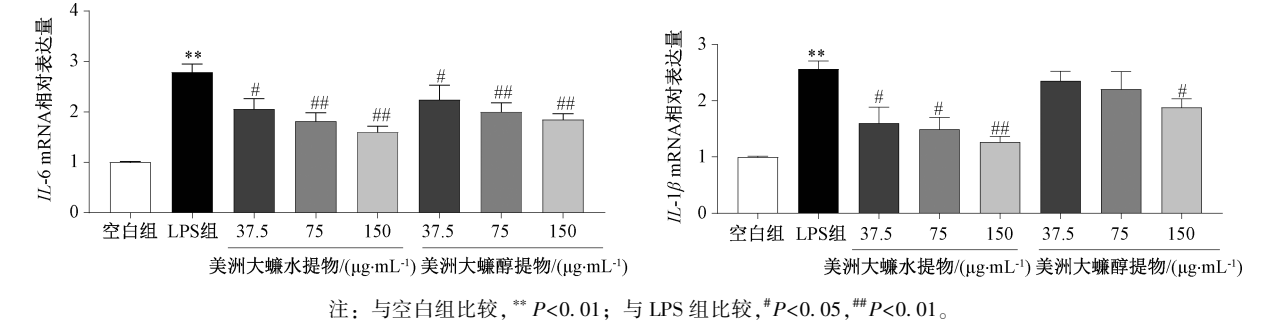
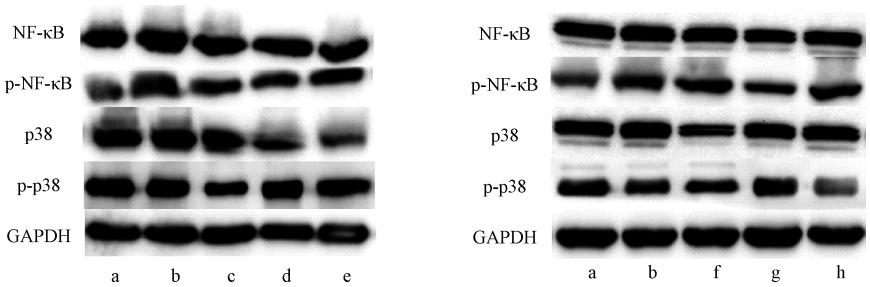


图 4 美洲大蠊提取物对 LPS 诱导 HPDLFs 细胞 IL-6、IL-1 β mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

物 37.5 μg/mL 组细胞 IL-1 β mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，美洲大蠊醇提物 75、37.5 μg/mL 组 IL-1 β mRNA 表达无明显变化 ($P > 0.05$)。

3.5 美洲大蠊提取物对 LPS 诱导 HPDLFs 细胞 NF- κ B、p-NF- κ B、p38、p-p38 蛋白表达的影响 如图 5、表 2~3 所示，与空白组比较，LPS 组细胞 NF- κ B、p-NF- κ B、p38、p-p38 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)；与 LPS 组比较，美洲大蠊水

提物 75、150 μg/mL 组细胞 NF- κ B、p38 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，75 μg/mL 组细胞 p-NF- κ B、p-p38 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，37.5 μg/mL 组细胞 p-p38 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，而美洲大蠊醇提物各剂量组 p-NF- κ B 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，37.5 μg/mL 组细胞 p38 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，150 μg/mL 组 p-p38 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。



注：a 为空白组，b 为 LPS 组，c~e 为美洲大蠊水提物 37.5、75、150 μg/mL 组，f~h 为美洲大蠊醇提物 37.5、75、150 μg/mL 组。

图 5 各组 HPDLFs 细胞 NF-κB、p-NF-κB、p38、p-p38 蛋白电泳图

表 2 美洲大蠊水提物对 NF-κB、p-NF-κB、p38、p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | NF-κB | p-NF-κB | p-38 | p-p38 |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 空白组 | 1.17±0.17 | 0.33±0.28 | 0.81±0.26 | 0.37±0.30 |
| LPS 组 | 1.71±0.51* | 0.67±0.36* | 0.94±0.25 | 0.54±0.40* |
| 美洲大蠊水提物 37.5 μg/mL 组 | 1.38±0.73 | 0.49±0.12 | 0.73±0.46 | 0.27±0.04 [#] |
| 美洲大蠊水提物 75 μg/mL 组 | 1.23±0.57 [#] | 0.42±0.05 [#] | 0.48±0.14 [#] | 0.35±0.07 [#] |
| 美洲大蠊水提物 150 μg/mL 组 | 1.24±0.35 [#] | 0.51±0.13 | 0.44±0.04 [#] | 0.41±0.24 |

注：与空白组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[#] $P<0.05$ 。

表 3 美洲大蠊醇提物对 NF-κB、p-NF-κB、p38、p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | NF-κB | p-NF-κB | p-38 | p-p38 |
|----------------------|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 空白组 | 0.81±0.09 | 0.90±0.64 | 1.23±0.67 | 0.39±0.05 |
| LPS 组 | 1.11±0.19* | 1.46±0.75** | 1.41±0.17* | 0.49±0.06 |
| 美洲大蠊醇提物 37.5 μg/mL 组 | 0.90±0.32 | 1.06±0.37 [#] | 0.98±0.24 [#] | 0.49±0.38 |
| 美洲大蠊醇提物 75 μg/mL 组 | 0.90±0.14 | 0.85±0.40 ^{##} | 1.19±0.77 | 0.47±0.33 |
| 美洲大蠊醇提物 150 μg/mL 组 | 0.86±0.18 | 1.07±0.66 [#] | 1.13±0.68 | 0.25±0.07 ^{##} |

注：与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 LPS 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

牙周炎主要是由牙菌斑引起的牙周组织局部慢性炎症口腔性疾病^[1]。脂多糖（LPS）是革兰氏阴性菌，具有高度活性的致病物质，是牙周炎的主要病因之一^[12]。牙周膜成纤维细胞在口腔发生炎症时，会产生 TNF-α、IL-1β 等多种促炎因子^[13]，加剧牙周组织的破坏^[14]。研究显示，同时抑制 TNF-α、IL-1β 的表达，则可以有效减少由炎症因子诱导生成的破骨细胞，从而降低牙槽骨的吸收和破坏^[15-16]。本研究发现，与 LPS 组比较，经美洲大蠊提取物干预后，细胞 IL-1β、IL-6 mRNA 表达及 TNF-α、IL-6、IL-1β、iNOS 水平均下调，提示美洲大蠊提取物可以缓解牙周炎产生的炎症，进而降低其对牙槽骨的吸收和破坏，但是水提取物和醇提物之间作用有所差别。课题组前期研究发现，美洲大蠊不同溶剂提取后其主要成分含量有所差别，美洲大蠊水提物中多肽含量高于醇提物，并且美洲大蠊水提物中多肽含量占比相对较高，推测美洲大蠊提取物中抗炎的主要活性成分可能来自于多肽。

NF-κB 是细胞中重要的转录调节因子，通过刺激因子（病毒、肿瘤坏死因子、B 细胞活化因子、淋巴毒素等）的活化进而诱导多种基因的表达，产生多种细胞因子参与炎症反应，是一种与炎症免疫反应密切相关的核因子。牙周炎的发生发展与 NF-κB 的持续或过度激活相关。研究发现，牙周病变组织中大量 NF-κB 从胞浆移位进入细胞核内，诱导炎症和免疫相关基因的表达，进而引起大量炎细

胞浸润，最终导致炎症反应^[17]。p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）是一种酪氨酸磷酸化蛋白激酶，属于 MAPK 家族，是参与炎症反应调控的重要信号通路。在利用炎症因子构建的体外诱导培养环境下，牙周膜细胞可表达基质金属蛋白酶（MMP）-13，同时 p38 MAPK 可负向调控 MMP-13 的表达，p38 还可调控间充质干细胞的成骨分化^[18]。本实验进一步研究发现，美洲大蠊水提物可降低 NF-κB、p-NF-κB、p38、p-p38 蛋白表达，提示牙周炎的发生与 MAPK/NF-κB 信号通路具有一定的联系，但该信号通路牙周炎发生的关系还需要进一步探究。

致谢 本实验在大理大学昆虫生物医药研发重点实验室完成，感谢大理大学昆虫生物医药研究院刘衡老师对实验的指导和帮助，感谢席祖卫研究生对实验的帮助。

参考文献：

[1] 曹采方. 牙周病学[M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社，2001.

[2] Leitão R F, Ribeiro R A, Chaves H V, *et al.* Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats[J]. *J Periodontol*, 2005, 76 (6): 956-963.

[3] Ambili R, Santhi W S, Janam P, *et al.* Expression of activated transcription factor nuclear factor-κB in periodontally diseased tissues[J]. *J Periodontol*, 2005, 76(7): 1148-1153.

[4] 张 俊, 魏永凯, 李 玥, 等. 美洲大蠊提取物 Ento-D 对醋酸诱导的急性溃疡性结肠炎大鼠的作用及机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 304-308.

[5] 谭巧云, 满红霞, 那凯歌, 等. 美洲大蠊提取物对口腔溃疡大鼠模型的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(11): 1014-1016.

[6] 邹俊波, 桑文涛, 王 芳, 等. 美洲大蠊提取物对乙醇致小鼠急性胃溃疡的预防作用[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2325-2331.

[7] 张国容. IL-17 对体外培养人牙周膜成纤维细胞增殖的影响及机制初探[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.

[8] 李 隽, 胥 春, 郝 轶, 等. 人牙周膜细胞原代培养及鉴定[J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2008, 28(11): 1373-1376.

[9] 李 杰, 陈哲杰, 石金凤, 等. 美洲大蠊口腔贴膜剂的制备及其抗口腔溃疡作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 29-36.

[10] 王素娟, 王 恺, 侯燕琳. MTT 法检测夏枯消瘤丸含药血清对人肺癌 A549 细胞的实验研究[J]. 山西中医学院学报, 2018, 19(1): 6-9.

[11] 郑 睿, 谭裕洁, 古萌琴, 等. *N*-乙酰半胱氨酸对脂多糖诱导的人牙周膜成纤维细胞表达相关蛋白和基因的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 925-929.

[12] 王 颖, 刘蓉蓉, 龚玖瑜, 等. 脂多糖体外诱导牙周膜成纤维细胞发生内质网应激[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(3): 277-279; 281.

[13] 侯金秋, 吕 博, 孟凌宇, 等. 咖啡酸四聚体异构体基于 MAPK/NF- κ B 信号通路的体外抗炎作用机制研究[J]. 石河子大学学报 (自然科学版), 2022, 40(4): 445-452.

[14] 任 莉, 裘松波, 谭颖徽, 等. TNF- α 对人牙周膜成纤维细胞 RANKL/OPG mRNA 表达的影响[J]. 重庆医学, 2007, 36(6): 502-504.

[15] Gillespie M T. Impact of cytokines and T lymphocytes upon osteoclast differentiation and function[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(2): 103.

[16] 康 仟, 赵 彬. 双氯芬酸钠对脂多糖诱导的人牙周膜成纤维细胞 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响研究[J]. 中国实用口腔杂志, 2014, 7(3): 164-167.

[17] 白红丹, 张 斌, 关呈超, 等. NF- κ B 信号通路牙周炎关系的研究进展[J]. 现代口腔医学杂志, 2012, 26(4): 272-275.

[18] 聂 嘉, 张 博, 顾 斌, 等. p38 丝裂原活化蛋白激酶在炎症微环境作用下对牙周膜干细胞成骨分化的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(1): 1-7.

人 参 蛋 白 对 阿 尔 茨 海 默 病 小 鼠 肠 道 菌 群 及 BDNF/TrkB 信 号 通 路 的 影 响

李 昶¹, 雷天荣¹, 王思明², 曹 阳³, 肖洪贺¹, 李红艳^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117; 3. 大连华信理化检测中心有限公司, 辽宁 大连 116600)

摘要: **目的** 探讨人参蛋白对阿尔茨海默病小鼠肠道菌群及 BDNF/TrkB 信号通路的影响。**方法** 采用 *D*-半乳糖/ AlCl_3 联合诱导建立阿尔茨海默病模型, 小鼠随机分为正常一组、正常二组、模型一组、模型二组、人参蛋白组、菌群移植组, 采用 Morris 水迷宫实验评价学习记忆能力, Western blot 法检测脑组织 APP、p-Tau、BDNF、TrkB、p-TrkB 蛋白表达, 16S rDNA 检测粪便菌群多样性。**结果** 人参蛋白、菌群移植可缩短小鼠逃避潜伏期 ($P<0.05$), 增加穿越平台次数 ($P<0.05$), 降低脑组织 APP、p-Tau 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 升高 BDNF、p-TrkB、p-TrkB/TrkB 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 减少拟普雷沃菌属、瘤胃球菌科_UCG-014、普雷沃氏菌科_UCG-001、瘤胃球菌属_1 丰度 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 人参蛋白抗阿尔茨海默病的作用机制可能是调节肠道微生物多样性激活 BDNF/TrkB 信号通路。

关键词: 人参蛋白; 阿尔茨海默病; 肠道菌群; BDNF/TrkB 信号通路; 16S rDNA

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1319-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.050

收稿日期: 2021-04-06

基金项目: 辽宁省自然科学基金计划重点项目 (20180530033); 中医脏象理论及应用教育部重点实验室 (辽宁中医药大学) 开放基金项目 (ZYZX1709)

作者简介: 李 昶 (1997—), 女, 硕士生, 从事中药药理学研究。Tel: (0411) 85890247, E-mail: 343423898@qq.com

* 通信作者: 李红艳 (1982—), 女, 博士, 副教授, 从事中药药理学研究。Tel: (0411) 85890142, E-mail: lhywaiw@163.com

网络出版日期: 2022-02-15

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220215.1544.006.html>