

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

收稿日期: 2021-06-04

作者简介: 陈亚琼 (1982—), 女, 副主任医师, 研究方向为正畸、儿童牙病。Tel: 13897365878, E-mail: c42pl9@ 163.com

Invitrogen 公司; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 一抗和二抗购于北京凯瑞基生物科技有限公司; 引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司; ALP 染色试剂盒、ALP 活性检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

2 方法

2.1 蛇床子素溶液制备 将蛇床子素溶于二甲基亚砜(DMSO), 配制成 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} mol/L 的蛇床子素原液, 4 ℃ 保存。

2.2 细胞培养 将 PDLSCs 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基的培养瓶中, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 观察细胞生长状态, 及时更换培养液并进行传代, 取第 3 代细胞用于后续实验。

2.3 细胞分组及给药 取生长良好的第 3 代人 PDLSCs 细胞, 调整密度至每孔 2×10^3 个, 接种于 96 孔培养板, 细胞在标准环境下孵育 24 h, 弃去培养液及未贴壁的细胞, 分别加入含 0 (0.1% DMSO, 对照组)、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L 蛇床子素的培养基继续孵育, MTT 法检测细胞存活率, 筛选适宜浓度 1×10^{-5} mol/L 进行后续实验, 记作蛇床子素组。将 anti-miR-NC、anti-miR-26a 转染至 PDLSCs 细胞, 再用 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素进行处理, 作蛇床子素+anti-miR-NC 组、蛇床子素+anti-miR-26a 组。

2.4 MTT 法检测细胞增殖能力 PDLSCs 细胞按“2.3”项下分组给药, 培养 3 d 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 随后缓慢吸去孔内液体, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡反应 10 min, 用酶标仪检测 490 nm 波长处细胞光密度(OD)值, 并计算细胞存活率。

2.5 Transwell 实验检测细胞迁移能力 取各组 PDLSCs 细胞接种于 Transwell 小室的上室(每孔 3×10^4 个细胞), 下室加入含有胎牛血清的培养液(每孔 600 μL), 置于培养箱继续培养 24 h, 取出小室, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫染液染色 10 min, 置于显微镜下观察迁移细胞数。

2.6 RT-qPCR 法检测细胞 miR-26a 表达 细胞培养 48 h 后提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增, 每个样品重复 3 次, 扩增反应条件为 95 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 40 个循环; 60 ℃ 延长 5 min。miR-26a 正向引物序列 5'-ATCCAGTGCCTGCTCGTG-3', 反向引物序列 5'-TGCTTCAAGT AATCCAGG-3'; U6 正向引物序列 5'-CTCGCTTCGG CAGCACA-3', 反向引物序列 5'-AACGCTTACGA ATTTCGCT-3'。miR-26a 以 U6 为内参, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算相对表达量。

2.7 Western blot 法检测细胞 Ki-67、PCNA、MMP2、MMP9 蛋白表达 收集各组细胞, 加入适量细胞裂解液于冰上裂解 30 min, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量, 蛋白样品在沸水中变性 10 min, 以 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 转印至 PVDF 膜上, 封闭, TBST 冲洗, 加入相应一抗(1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜, 次日除一抗, TBST 冲洗, 加入二抗(1:2 000) 室温孵育 2 h,

以 ECL 法显影, 成像系统采集图像, GraphPad Prism 7 软件统计蛋白表达。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

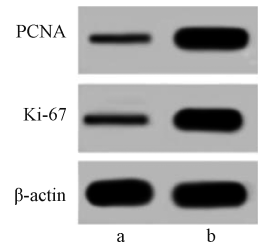
3.1 不同浓度蛇床子素对 PDLSCs 细胞活性的影响 与对照组比较, 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} mol/L 蛇床子素组细胞存活率无明显变化 (*P* > 0.05); 1×10^{-4} mol/L 蛇床子素组细胞存活率降低 (*P* < 0.05), 说明其对细胞有一定的毒性; 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素组细胞存活率升高 (*P* < 0.05), 说明其能促进细胞增殖。因此, 选择 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素进行后续实验, 见表 1。

表 1 不同浓度蛇床子素对 PDLSCs 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n* = 9)

组别	细胞存活率/%
对照组	100.05±10.36
1×10^{-4} mol/L 蛇床子素组	72.36±7.31 *
1×10^{-5} mol/L 蛇床子素组	139.06±12.31 *
1×10^{-6} mol/L 蛇床子素组	97.34±8.24
1×10^{-7} mol/L 蛇床子素组	95.33±8.53

注: 与对照组比较, * *P* < 0.05。

3.2 蛇床子素对 PDLSCs 细胞增殖能力的影响 与对照组(0 mol/L) 比较, 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素组细胞 OD 值和 Ki-67、PCNA 蛋白表达均升高 (*P* < 0.05), 见图 1、表 2。



注: a 为对照组, b 为蛇床子素组。

图 1 蛇床子素对 PDLSCs 细胞 Ki-67、PCNA 蛋白表达的影响

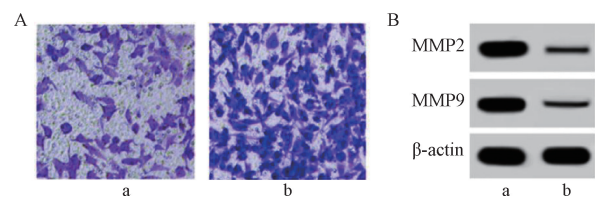
表 2 蛇床子素对 PDLSCs 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n* = 9)

组别	OD ₄₉₀ 值	Ki-67 蛋白	PCNA 蛋白
对照组	1.20±0.13	0.41±0.04	0.40±0.04
蛇床子素组	1.36±0.19 *	0.89±0.08 *	0.90±0.09 *

注: 与对照组比较, * *P* < 0.05。

3.3 蛇床子素对 PDLSCs 细胞迁移能力的影响 与对照组比较, 蛇床子素组细胞迁移数升高 (*P* < 0.05), MMP2、MMP9 蛋白表达降低 (*P* < 0.05), 见图 2、表 3。

3.4 蛇床子素对 PDLSCs 细胞中 miR-26a 表达的影响 与对照组比较, 蛇床子素组细胞 miR-26a 表达升高 (*P* < 0.05), 见表 4。



注：a 为对照组，b 为蛇床子素组。

图 2 蛇床子素对 PDLSCs 细胞迁移数 (A) 和 MMP2、MMP9 蛋白表达 (B) 的影响

表 3 蛇床子素对 PDLSCs 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	细胞迁移数/个	MMP2 蛋白	MMP9 蛋白
对照组	65.37±6.82	0.91±0.09	0.90±0.09
蛇床子素组	238.90±25.63 *	0.42±0.04 *	0.41±0.04 *

注：与对照组比较, * $P<0.05$ 。

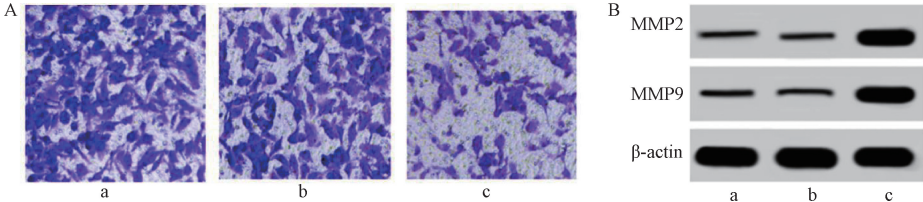
3.5 抑制 *miR-26a* 表达对 PDLSCs 细胞增殖能力的影响
与蛇床子素+anti-*miR*-NC 组比较, 蛇床子素+anti-*miR-26a*

表 5 抑制 *miR-26a* 表达对 PDLSCs 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	<i>OD</i> ₄₉₀ 值	<i>miR-26a</i>	Ki-67 蛋白	PCNA 蛋白
蛇床子素组	1.39±0.15	1.60±0.71	0.90±0.08	0.88±0.08
蛇床子素+anti- <i>miR</i> -NC 组	1.37±0.17	1.62±0.53	0.90±0.09	0.89±0.09
蛇床子素+anti- <i>miR-26a</i> 组	1.18±0.10 *	1.08±0.08 *	0.39±0.03 *	0.41±0.04 *

注：与蛇床子素+anti-*miR*-NC 组比较, * $P<0.05$ 。

3.6 抑制 *miR-26a* 表达对 PDLSCs 细胞迁移能力的影响
与蛇床子素+anti-*miR*-NC 组比较, 蛇床子素+anti-*miR-26a*



注：a 为蛇床子素组，b 为蛇床子素+anti-*miR*-NC 组，c 为蛇床子素+anti-*miR-26a* 组。

图 4 抑制 *miR-26a* 表达对 PDLSCs 细胞迁移数 (A) 和 MMP2、MMP9 蛋白表达 (B) 的影响

表 6 抑制 *miR-26a* 表达对 PDLSCs 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	细胞迁移数/个	<i>miR-26a</i>	MMP2 蛋白	MMP9 蛋白
蛇床子素组	229.37±20.89	1.59±0.64	0.40±0.04	0.42±0.05
蛇床子素+anti- <i>miR</i> -NC 组	233.50±22.39	1.63±0.34	0.43±0.05	0.43±0.04
蛇床子素+anti- <i>miR-26a</i> 组	68.84±8.27 *	1.05±0.09 *	0.89±0.07 *	0.92±0.09 *

注：与蛇床子素+anti-*miR*-NC 组比较, * $P<0.05$ 。

4 讨论

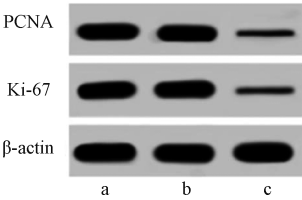
牙周炎是一种口腔慢性感染性疾病, 会导致牙周组织的破坏甚至牙齿脱落, 而牙周膜干细胞在体内外具有非常好的多能分化能力, 牙周治疗的基本目的是控制牙周组织炎症并在局部破坏的牙周组织中再生^[9-10]。

已有研究表明, 蛇床子素对 PDLSCs 细胞的生物学性能有显著影响^[11]。孙晋^[12]研究发现, 蛇床子素通过表观遗传修饰改善炎症来源的牙周膜干细胞成骨分化能力。苏玉然^[13]研究发现, 蛇床子素对大鼠正畸牙齿移动过程中牙周组织的影响显著。本实验研究表明, 1×10^{-5} mol/L 蛇床子素

表 4 蛇床子素对 PDLSCs 细胞中 *miR-26a* 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	<i>miR-26a</i>
对照组	1.01±0.10
蛇床子素组	1.67±0.34 *

注：与对照组比较, * $P<0.05$ 。
组细胞 *OD* 值、*miR-26a* 表达和 Ki-67、PCNA 蛋白表达均降低 ($P<0.05$), 见图 3、表 5。



注：a 为蛇床子素组，b 为蛇床子素+anti-*miR*-NC 组，c 为蛇床子素+anti-*miR-26a* 组。

图 3 抑制 *miR-26a* 表达对 PDLSCs 细胞 Ki-67、PCNA 蛋白表达的影响

组细胞迁移数和 *miR-26a* 表达均降低 ($P<0.05$), MMP2、MMP9 蛋白表达均升高 ($P<0.05$), 见图 4、表 6。

能升高细胞 *OD* 值、迁移数、*miR-26a* 表达和 Ki-67、PCNA 蛋白表达, 降低 MMP2、MMP9 蛋白表达。

miRNA 对干细胞的干性维持及自我更新能力的维持有重要意义, 同时在干细胞分化过程中, *miRNAs* 的表达在时间维度及空间维度上均存在特定的模式。本研究发现, 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, MMP2、MMP9 蛋白表达升高。已有研究发现, *miR-26a* 具有修饰 PDLSCs 细胞成骨分化的能力^[14]。马静雯等^[15]研究发现, *miR-145* 通过下调 ROCK1 表达抑制人牙周

膜成纤维细胞的迁移。李小莉^[16]研究发现,抑制 *miR*-141 表达能够促进人牙周膜中成纤维细胞的增殖。杜莉等^[17]研究发现, *miR*-125*b* 对 PDLSCs 细胞成骨分化具有调控作用。王献刚等^[18]研究发现, *miR*-124 靶向 *OSX* 对 PDLSCs 细胞成骨分化具有调控作用。郝奕霖^[19]研究发现, *miR*-543 通过靶向调控 *TOB2* 促进 PDLSCs 细胞骨向分化。郝薏等^[20]研究发现, *miR*-9 对 PDLSCs 细胞的生物学功能有一定影响。薛栋^[21]研究发现, *miR*-146*a* 通过调节 P. gLPS 刺激人牙周膜成纤维细胞成骨分化。

综上所述,蛇床子素能通过上调 *miR*-26*a* 表达促进 PDLSCs 细胞的增殖和迁移,为中药化合物用于牙周细胞治疗的临床转化提供依据。

参考文献:

[1] Wu D, Yin L, Sun D G, *et al.* Long noncoding RNA TUG1 promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell through sponging microRNA-222-3p to negatively regulate Smad2/7[J]. *Arch Oral Biol*, 2020, 117: 104814.

[2] Gu K, Fu X C, Tian H, *et al.* TAZ promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells *via* the p-SMAD3[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(2): 1101-1113.

[3] Li L J, Jiang H, Chen R X, *et al.* Human β -defensin 3 gene modification promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells and bone repair in periodontitis[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 13.

[4] 乔青芳. 木通皂苷 D 对人牙周膜干细胞生物学特性的影响及其相关机制的研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.

[5] 秦子顺, 殷丽华, 王开娟, 等. 淫羊藿苷促进人牙周膜干细胞增殖及骨向分化的作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(4): 370-376.

[6] 兰泽栋, 王 彦, 郑雅心, 等. 葛根素对人牙周膜干细胞成骨分化的作用[J]. 中国美容医学, 2013, 22(10): 1067; 1071.

[7] Sun J, Dong Z W, Zhang Y, *et al.* Osthole improves function of periodontitis periodontal ligament stem cells *via* epigenetic modification in cell sheets engineering[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5254.

[8] Gao L N, An Y, Lei M, *et al.* The effect of the coumarin-like derivative osthole on the osteogenic properties of human

periodontal ligament and jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(38): 9937-9951.

[9] Chen J, Yu M, Li X, *et al.* Progranulin promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells *via* tumor necrosis factor receptors to inhibit TNF- α sensitized NF- κ B and activate ERK/JNK signaling[J]. *J Periodontal Res*, 2020, 55(3): 363-373.

[10] Jiang B, Xu J, Zhou Y F, *et al.* Estrogen enhances osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells by activating the Wnt/ β -Catenin signaling pathway[J]. *J Craniofac Surg*, 2020, 31(2): 583-587.

[11] 高丽娜. 蛇床子素对人牙周膜干细胞和颌骨骨髓间充质干细胞膜片形成和生物学性能的影响[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.

[12] 孙 晋. 蛇床子素通过表观遗传修饰改善炎症来源牙周膜干细胞成骨分化能力的研究[D]. 广州: 广州医科大学, 2016.

[13] 苏玉然. 蛇床子素对大鼠正畸牙齿移动过程中牙周组织改建的组织学影响[D]. 济南: 山东大学, 2016.

[14] 米修奎, 李 彦, 余善超, 等. *miR*-26*a* 修饰的人牙周膜干细胞成骨分化能力的研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(3): 445-448; 456.

[15] 马静雯, 宋 萌, 潘劲松, 等. miRNA-145 通过下调 ROCK1 的表达抑制人牙周膜成纤维细胞的迁移[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(4): 606-609; 615.

[16] 李小莉. 抑制 miRNA-141 能够促进人牙周膜中成纤维细胞的增殖[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(34): 61.

[17] 杜 莉, 曹伟靖, 田 莹, 等. MicroRNA-125b 对人牙周膜干细胞成骨分化的影响[J]. 上海口腔医学, 2018, 27(1): 11-17.

[18] 王献刚, 冯保静. miR-124 靶向 *OSX* 对牙周膜干细胞成骨分化能力的调控作用[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2020, 18(2): 70-75.

[19] 郝奕霖. microRNA-543 靶向调控 *TOB2* 促进人牙周膜干细胞骨向分化的功能和机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2017.

[20] 郝 薏, 肖湘水, 谢晓莉, 等. miR-9 对人牙周膜干细胞功能的影响[J]. 口腔生物医学, 2019, 10(3): 114-117.

[21] 薛 栋. miRNA-146*a* 调节 P. gLPS 刺激人牙周膜成纤维细胞成骨分化能力的初步研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2015.