

人参皂苷 Rg1 促进人牙龈成纤维细胞增殖、迁移及成骨分化的研究

张 昕^{1,2}, 李长顺², 刘 浩², 朱绍跃², 周 猛², 冯 岩², 张光东¹

摘要 目的 探讨人参皂苷 Rg1 (GsRg1) 对人牙龈成纤维细胞(HGFs)增殖、迁移及成骨分化的影响及分子机制。方法 采用组织块法分离培养 HGFs, 并进行形态学和免疫荧光鉴定;取第 3 代 HGFs, CCK-8 法检测 6 种浓度的 GsRg1 (0、6.25、12.5、25、50、100 mg/L) 对 HGFs 增殖的影响;Transwell 实验检测不同浓度 GsRg1 对 HGFs 迁移能力的影响;碱性磷酸酶 (ALP) 染色检测成骨能力;茜素红染色观察并定量钙结节;qRT-PCR 检测 COL- I、OCN 和 OPN 成骨基因表达;Western blot 检测 OCN、OPN 和 COL- I 以及 PI3K/AKT 信号通路相关分子的蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,浓度为 12.5、25、50、100 mg/L GsRg1 可明显提高 HGFs 增殖能力 ($P < 0.05$), 其中 100 mg/L GsRg1 促增殖作用最强, 6.25 mg/L GsRg1 组与对照组比较差异无统计学意义;GsRg1 处理后 HGFs 迁移能力增强, 且呈浓度依赖。与对照组比较, 100 mg/L GsRg1 组 ALP 活性明显增加 ($P < 0.01$);茜素红染色钙结节定量明显增多 ($P < 0.01$);成骨相关基因 OCN、OPN 和 COL- I 的 mRNA 和蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$);p-PI3K、p-AKT 蛋白表达水平随时间上调明显 ($P < 0.05$), 而 PI3K、AKT 蛋白表达水平无明显变化。**结论** GsRg1 可以促进 HGFs 增殖和迁移, 100 mg/L GsRg1 能够促进 HGFs 的成骨分化, 可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 人牙龈成纤维细胞;人参皂苷 Rg1;细胞增殖;细胞迁移;成骨分化

中图分类号 R 781.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0812-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.018

人牙龈成纤维细胞 (human gingival fibroblasts,

HGFs) 是牙周组织工程常用的种子细胞^[1]。已证实 HGFs 具有多向分化的潜能, 可在不同诱导条件下分化为骨细胞、平滑肌样细胞以及内皮样细胞等^[2]。人参是一种传统中药材, 人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, GsRg1) 是其活性成分之一, 具有抗炎、抗氧化等功能^[3]。研究^[4]发现 GsRg1 可调控间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的增殖、分化、衰老、凋亡, 从而影响机体组织修复。Yin et al^[5] 研究发现, GsRg1 可促进牙周膜干细胞 (periodontal membrane stem cells, PDLSCs) 增殖, 增加碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 的活性及骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和骨钙素 (osteocalcin, OCN) 等蛋白的表达, 从而促进 PDLSCs 的成骨向分化。然而 GsRg1 对 HGFs 增殖、迁移以及成骨机制的研究尚未见报道。因此, 该研究探讨 GsRg1 对 HGFs 增殖、迁移的影响, 并验证 GsRg1 对 HGFs 成骨方向分化的影响, 初步探索其可能的作用机制, 为 GsRg1 用于牙周组织修复再生及牙周病的治疗提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 GsRg1 单体 (纯度 98%, 微科曼得生物工程有限公司); DMEM 高糖培养基、DAPI 染色试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); I 型胶原蛋白酶、Dispase II (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒、Triton X-100、正常山羊血清、青-链霉素双抗 (微科曼得生物工程有限公司); Vimentin 抗体、Cytokeratin17 抗体、488 荧光标记红色山羊抗兔子 IgG (美国 Proteintech 公司); Transwell 过滤器培养板 (美国 BD 公司), 倒置光学显微镜 (日本 Nikon 公司); 磷酸盐缓冲液 (上海碧云天生物技术有限公司); 0.25% 胰酶细胞消化液 (微科曼得生物工程有限公司); 兔抗 β -actin 抗体、兔抗 PI3K 抗体、兔抗 p-PI3K 抗体、兔抗 AKT 抗体、兔抗 p-AKT 抗体 (上海碧云天生物技术有限公司); 兔抗 OCN 抗体, 兔抗 I 型胶原蛋白 (collagen-I, COL-I) 抗体, 兔抗 OPN

2022-12-31 接收

基金项目:江苏省自然科学基金 (编号: BK20191347、BK20210080);
江苏省高校优势学科建设工程项目 (编号: 2018-87); 徐州市
市卫生健康委科技项目 (编号: XWKYSL20220135)

作者单位:¹ 南京医科大学附属口腔医院综合科, 江苏省口腔疾病研
究重点实验室, 江苏省口腔转化医学工程研究中心, 南京
210029

² 徐州医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 徐州 221002

作者简介:张 昕, 女, 硕士研究生;

张光东, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: egd-
zhang@njmu.edu.cn

抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HGFs 的提取与培养 徐州医科大学附属口腔医院口腔颌面外科门诊选取 18~22 周岁健康成年患者因正畸需要拔除前磨牙或第三磨牙,已获得供者本人知情同意,牙齿无龋坏、牙髓炎、牙周炎等疾病,牙齿周围牙龈质地及色泽正常,无炎症肿胀。行拔除术前以 75% 乙醇充分消毒牙体周围组织,切取拔牙创周围的牙龈组织,立即置于含双抗的预冷 DMEM 中,迅速转移到实验室。

在超净工作台内,用含双抗的 PBS 冲洗 3 次后,将组织块剪成 1~3 mm³ 的大小,采用胰酶消化法,37 °C 下水浴锅中消化组织 2 h,然后加入含 20% 血清的 DMEM 培养液终止消化,离心去除上清液后再次加入含 20% 血清的 DMEM 培养液,吹打均匀后将细胞悬液放入培养皿中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次。当细胞融合至 80%~90% 后,弃培养液,PBS 清洗,用 0.25% 胰蛋白酶消化 5 min 得到细胞悬液,离心去上清液,重新加入含 20% 血清的 DMEM 培养液重悬细胞,传代获得实验用细胞,取第 3 代 HGFs 进行实验。该项目由徐州医科大学附属口腔医院伦理委员会批准、审查(批准号:202009w014)。

1.2.2 HGFs 的免疫荧光鉴定 将第 3 代 HGFs 以 3 × 10⁴ 个/ml 密度均匀接种于 24 孔板中的爬片上,待细胞铺满爬片约 60% 时弃去培养液;用 4% 的多聚甲醛固定爬片 15 min,干燥后 PBS 液洗涤;然后 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min;爬片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min 以减少非特异性背景着色;加一抗[鼠抗人波形丝蛋白(Vimentin)抗体、鼠抗人细胞角蛋白(CK)抗体]4 °C 孵育过夜;次日复温 30 min 后加山羊抗兔二抗于 37 °C 湿盒内避光孵育 1 h;用 DAPI 处理 30 min 后 PBS 液冲洗 3 遍,封片。用荧光显微镜采集细胞图像。

1.2.3 不同浓度 GsRg1 溶液配置 取 20 mg GsRg1 粉末,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配置浓度为 100 mg/L 的 GsRg1 溶液,然后按比例稀释,配成含 0、6.25、12.5、25、50、100 mg/L 的 GsRg1、10% FBS 的 DMEM 培养液,长期低温密封保存。

1.2.4 CCK-8 法检测 GsRg1 对 HGFs 增殖的影响

取生长良好的第 3 代 HGFs,配制浓度为 4 × 10⁴ 个/ml 的单细胞悬液,以每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中预培养 24 h,换液,每孔加入 100 μl 不同浓度(0、6.25、12.5、25、

50、100 mg/L)的 GsRg1,0 mg/L 为阴性对照,每个浓度设 5 个复孔,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养。分别于 2、24 h 后,按照 CCK-8 法说明书进行操作,每孔加入 10 μl 的 CCK-8,将培养板在培养箱中孵育 2 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.2.5 Transwell 实验检测 GsRg1 对 HGFs 迁移的影响 取生长良好的第 3 代 HGFs 细胞,配制浓度为 1 × 10⁵ 个/ml 的单细胞悬液,经血清饥饿 12 h 后,以每孔 100 μl 接种于 Transwell 上室,下室置入 500 μl 1% 胎牛血清 α-MEM 培养基,分别用 0、6.25、12.5、25、50、100 mg/L GsRg1 处理细胞,然后分别于 6、8、12、24 h 后将下室经甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色并在倒置显微镜下观察计数小室下表面的活细胞数。

1.2.6 ALP 活性检测 取生长良好的第 3 代 HGFs 细胞,经胰蛋白酶消化计数,将 HGFs 密度调整为 2 × 10⁴ 个/ml,接种在 24 孔板内,待细胞贴壁 80% 后,实验分组:实验组加入 100 mg/L GsRg1 处理,对照组 0 mg/L GsRg1 处理。培养 4、7 d 后,吸出原有培养基,PBS 洗涤 3 次,接着用 4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤,随后每孔加入配制好的 ALP 显色剂避光染色 30 min,PBS 洗涤后用光学显微镜观察并拍摄图像。

为了检测 ALP 活性的定量表达,细胞培养 4、7 d 后,PBS 冲洗,每孔加入 100 μl 1% 曲拉通 X-100,置于冰上裂解 30 min,反复吹打后收集裂解液。裂解液置于冷冻离心机 4 °C 温度下,以 12 000 r/min 的转速离心 10 min,吸取上清液。根据 BCA 蛋白定量试剂盒的说明,测定上清液的总蛋白浓度,并根据 ALP 活性检测试剂盒的说明,计算样品的 ALP 活性。

1.2.7 茜素红染色 取生长状态良好的第 3 代 HGFs,胰蛋白酶消化计数后,将 HGFs 密度调整为 2 × 10⁴ 个/ml 接种在 6 孔板中,待细胞贴壁生长至 80% 时,去除培养液,实验分组:对照组仅添加成骨诱导培养液(含 10% FBS 的 α-MEM、0.05 μg/L L-抗坏血酸磷酸、10 mmol/L β-甘油磷酸、10 nmol/L 地塞米松),实验组分别添加浓度 12.5、100 mg/L GsRg1 的矿化诱导培养液,分别培养 14 d,吸去原培养液,PBS 漂洗 3 遍。每孔加入 1 ml 的 4% 多聚甲醛固定 40 min。吸去固定液,PBS 洗涤。每孔加入 1 ml 茜素红染色液,染色 5 min。吸去染色液,PBS 反复漂洗至液体颜色不变红。室温烘干,倒置显微镜下观察并拍照记录各组培养皿表面钙结节的染色

情况。采集图像后,6孔板每孔加入CPC处理10 min,收集液体样本,测定OD值。

1.2.8 成骨相关基因表达的检测 将HGFs以 2×10^4 个/ml的密度接种在24孔板内。实验分组:实验组每孔加入2 ml含100 mg/L GsRg1的 α -MEM进行培养,对照组每孔加入2 ml(0 mg/L GsRg1) α -MEM进行培养。在培养4、7 d后,吸出原有培养基,PBS洗涤3次,每孔内加入200 μ l的Trizol裂解细胞,反复吹打后将裂解液收集至1.5 ml的EP管中。随后每管加入三氯甲烷抽提RNA,于冷冻离心机4 $^{\circ}$ C温度下,以12 000 r/min的转速离心15 min,吸取上清液至EP管中。接着每管加入等量的异丙醇沉淀RNA,于冷冻离心机4 $^{\circ}$ C温度下,以12 000 r/min的转速离心5 min,留沉淀。然后每管加入DEPC水配制的75%无水乙醇洗涤沉淀,于冷冻离心机4 $^{\circ}$ C温度下,以12 000 r/min的转速离心5 min,沉淀洗涤3次。接着倒置EP管晾干沉淀,每管加入DEPC水来溶解沉淀,使用紫外分光光度计测定RNA的浓度和纯度。最后用逆转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,用实时定量PCR试剂盒检测COL- I、OCN和OPN基因的相对表达。实验中以GAPDH基因作为内参,各基因引物序列见表1。

表1 引物序列

靶基因	引物序列
GAPDH	F:5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	R:5'-ACCACCTGTGCTGTAGCCAA-3'
COL- I	F:5'-GATTCCCTGGACCTAAAGGTGC-3'
	R:5'-AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA-3'
OCN	F:5'-GCCCTGACTGCATTTCTGCCTCT-3'
	R:5'-TCACCACCTTACTGCCCTCCTG-3'
OPN	F:5'-CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG-3'
	R:5'-GCACCATTCAACTCCTCCTTTC-3'

1.2.9 Western blot 实验检测 OPN、OCN、COL- I 蛋白表达 取生长良好的HGFs均匀铺于6孔板中,细胞培养箱培养至细胞贴壁生长至80%,实验分组:实验组100 mg/L GsRg1处理,对照组不做处理。分别在第7、14、21天收集蛋白样品。采用RIPA细胞裂解液冰上裂解15 min,在4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min条件下离心10 min,提取上清溶液,即为实验用蛋白样品。采用BCA法进行蛋白质定量,制备蛋白电泳样品。对两组蛋白样品电泳并转移至转膜上封闭2 h。孵育一抗:加入兔抗OCN抗体、兔抗COL- I抗体、兔抗OPN抗体,在4 $^{\circ}$ C环境下孵育过夜,PBS冲洗3次,清理残余一抗。孵育二抗:加入HRP标记的二

抗(山羊抗兔IgG),室温孵育2 h,PBS冲洗3次。进行ECL化学发光法检测,显色后进行半定量分析。

1.2.10 Western blot 实验检测 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达 取生长良好的HGFs均匀铺于6孔板中,细胞培养箱培养至细胞贴壁生长至80%,实验分组:实验组100 mg/L GsRg1处理细胞4、8、12、24 h,对照组不做处理,相同培养条件下静置24 h。收集蛋白样品,按1.2.9实验方法检测PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。多组计量资料比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HGFs 的分离与培养 采集不同代次细胞,观察其在倒置显微镜下的图像(图1A、B)。观察到细胞生长良好,形态稳定,绝大多数呈梭形,胞质丰满,胞核位于细胞中央,呈圆形或椭圆形。细胞长满时,呈漩涡状分布,是HGFs的典型形态。

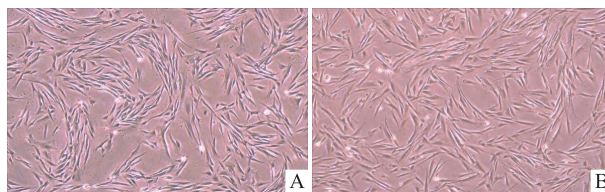


图1 分离和培养HGFs $\times 40$
A:第1代HGFs;B:第3代HGFs

2.2 HGFs 免疫荧光鉴定 荧光显微镜下观察:细胞为长梭形或纺锤形,细胞核为圆形或椭圆形,Vimentin染色阳性(细胞核为蓝色,细胞胞浆为绿色,图2A1~3),CK染色阴性(细胞核为蓝色,细胞胞浆不显色,图2B1~3)。

2.3 不同浓度 GsRg1 对 HGFs 增殖的影响 HGFs中加入不同浓度的GsRg1培养24 h,所测的吸光度值随GsRg1浓度的增高逐渐升高。6.25 mg/L GsRg1组吸光度值与对照组比较差异无统计学意义,其余4组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图3)。

2.4 GsRg1 对 HGFs 迁移的作用 Transwell实验结果显示,与对照组比较,HGFs中加入不同浓度的GsRg1培养后,穿膜细胞数量增多,而且细胞迁移能

力随着 GsRg1 给药浓度升高而增强(图 4)。

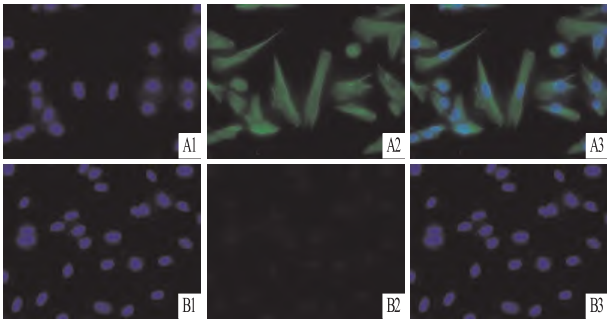


图 2 HGFs 的免疫荧光鉴定 × 200

A: Vimentin 染色阳性; B: CK 染色阴性; A1、B1: DAPI; A2: Vimentin; B2: CK; A3、B3: 图层合并

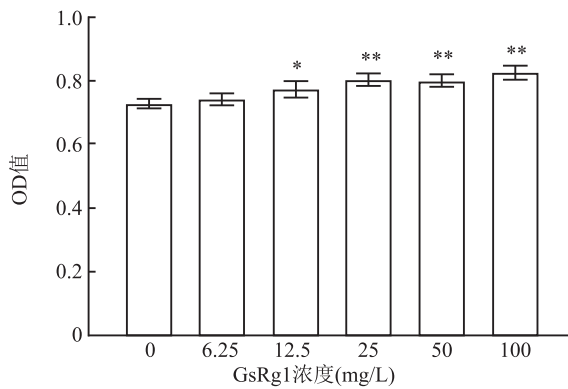


图 3 GsRg1 对 HGFs 增殖的影响

与对照组(0 mg/L GsRg1)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

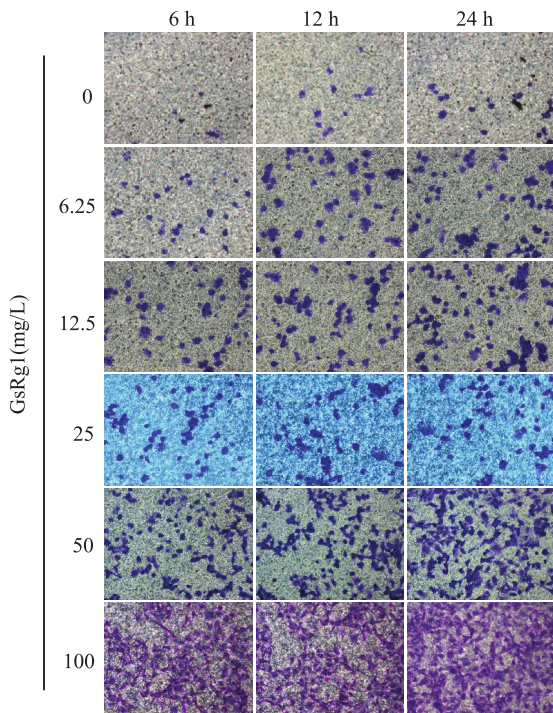


图 4 GsRg1 对 HGFs 迁移能力的影响 × 40

2.5 GsRg1 对 HGF 的 ALP 表达作用 ALP 染色及 ALP 活性定量实验检测 GsRg1 (100 mg/L) 对 HGFs 的 ALP 表达的影响。ALP 染色结果显示, 实验组染色比对照组深。第 4、7 天, 实验组 ALP 活性均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 5)。

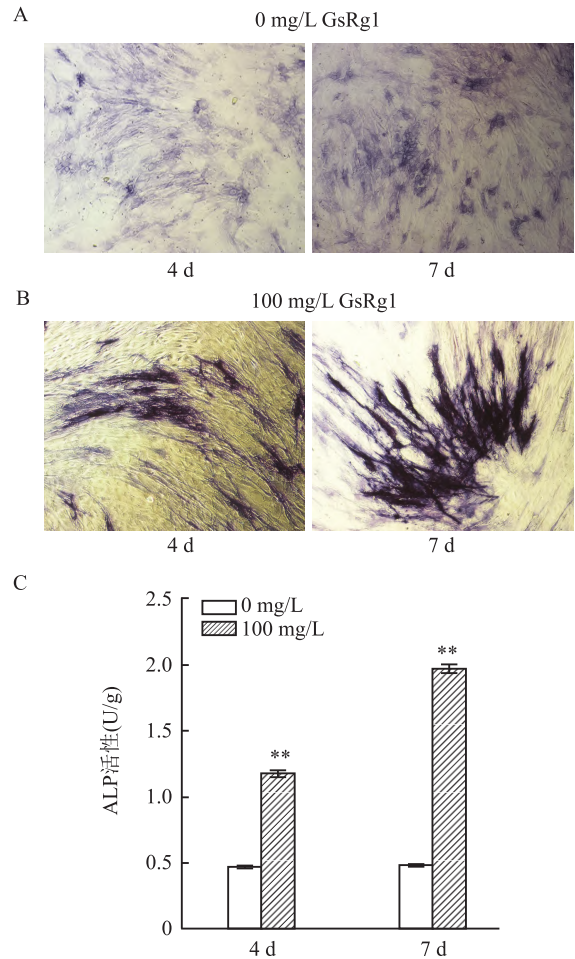


图 5 GsRg1 对 HGFs ALP 活性的影响 × 40

A: 对照组 ALP 染色; B 实验组 ALP 染色; C: 两组 ALP 活性; 与对照组(0 mg/L GsRg1)比较: ** $P < 0.01$

2.6 茜素红染色结果 在光学显微镜下观察各组 HGFs 培养染色情况, 结果显示实验组红染结节明显多于对照组。钙结节定量结果与茜素红染色一致, 实验组吸光度值较对照组升高 ($P < 0.01$), 且 100 mg/L GsRg1 的吸光度明显高于 12.5 mg/L GsRg1 ($P < 0.01$)。见图 6。

2.7 qRT-PCR 结果 qRT-PCR 实验检测成骨相关基因(OPN、OCN、COL-1)在第 7、14 天的相对表达水平。结果表明: 不同组间 OPN 的表达差异有统计学意义($F = 11.25, P < 0.05$), 不同组间 OCN 的表达差异有统计学意义($F = 40.77, P < 0.05$), 不同

组间 COL- I 的表达差异有统计学意义 ($F = 26.565$, $P < 0.05$)。与对照组比较,实验组明显上调了 HGFs 中成骨相关因子 OPN、OCN、COL- I 的 mRNA 表达量,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$,图 7)。

2.8 GsRg1 对 HGFs 成骨相关蛋白表达 Western blot 法检测两组 HGFs 成骨相关蛋白表达。结果表明:与对照组比较,实验组 HGFs 成骨蛋白 OPN、

OCN、COL- I 的蛋白表达水平明显上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 8)。

2.9 GsRg1 处理激活 HGFs 的 PI3K/AKT 的通路

Western blot 法检测两组 HGFs 的 PI3K/AKT 通路的蛋白表达情况。结果表明:实验组 HGFs 的 p-PI3K、p-AKT 两种蛋白表达水平随时间推移上调变化明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 9),而实验

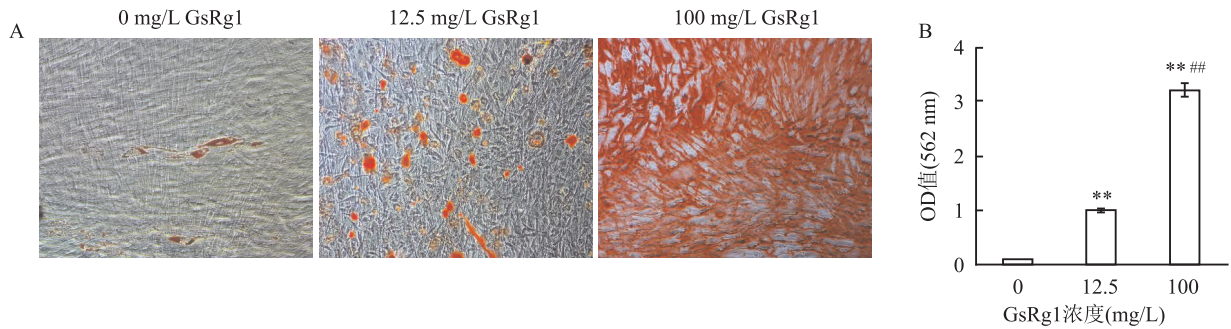


图 6 GsRg1 对 HGFs 成骨能力的影响 ×40

A:茜素红染色;B:采用 CPC 对基质矿化情况的相对定量分析;与对照组(0 mg/L GsRg1)比较: ** $P < 0.01$;与 12.5 mg/L GsRg1 组比较: ## $P < 0.01$

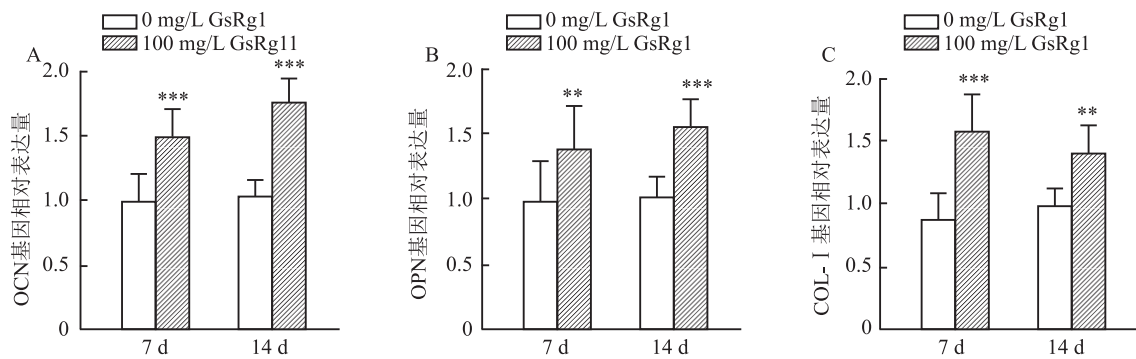


图 7 qRT-PCR 检测成骨相关基因的表达

A:OCN 基因表达;B:OPN 基因表达;C:COL- I 基因表达;与对照组(0 mg/L GsRg1)比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

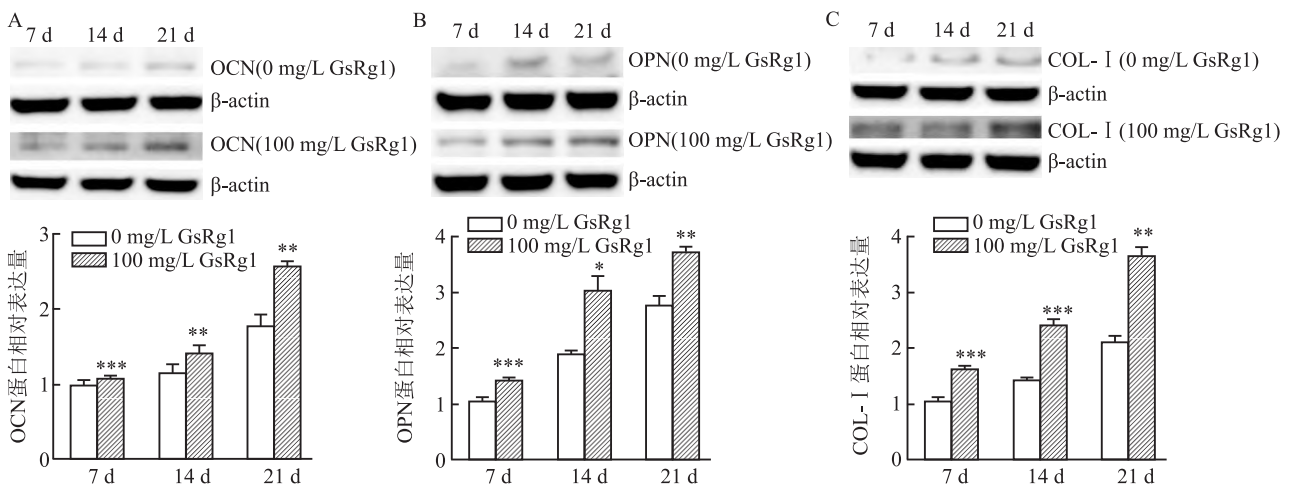


图 8 GsRg1 对 HGFs 成骨相关分子在蛋白水平的影响

A:OCN 蛋白水平表达及半定量分析;B:OPN 蛋白水平表达及半定量分析;C:COL- I 蛋白水平表达及半定量分析;与对照组(0 mg/L GsRg1)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

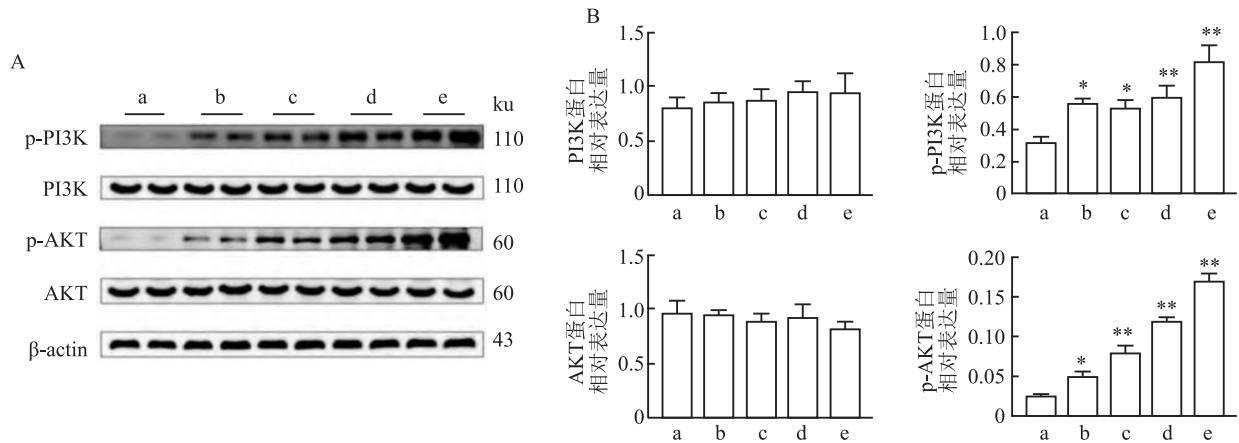


图9 GsRg1对HGFs PI3K/AKT通路蛋白表达的影响

A: Western blot法检测HGFs的PI3K/AKT、p-PI3K/p-AKT蛋白表达; B: PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT蛋白水平的半定量分析; a: 对照组(0 mg/L GsRg1); b: 100 mg/L GsRg1组4 h; c: 100 mg/L GsRg1组8 h; d: 100 mg/L GsRg1组12 h; e: 100 mg/L GsRg1组24 h; 与对照组(0 mg/L GsRg1)比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

组HGFs的PI3K、AKT蛋白表达水平随时间推移无明显差异。

3 讨论

牙周病可导致牙周附着丧失、牙槽骨破坏和吸收。牙周病治疗的主要目的在于促进牙周组织再生^[6]。HGFs易于取材、定向增殖分化能力优异,在一定条件下具有成骨向分化能力,在牙周组织再生的研究中成为理想的种子细胞^[7]。

本实验以HGFs为切入点,采用组织块法进行HGFs的体外分离培养,免疫荧光鉴定细胞抗Vimentin染色阳性、抗CK染色阴性说明细胞来源于结缔组织。不同浓度的GsRg1作用于HGFs后,CCK-8法和Transwell细胞迁移实验结果显示,GsRg1能够促进HGFs细胞的增殖、迁移能力。组织的修复和再生都离不开细胞增殖和迁移,这一实验结果预示着GsRg1在组织工程研究中的应用潜力。

ALP是成骨早期标志物,当细胞分化成骨时,ALP的活性明显提高,这一特性被广泛应用于验证细胞成骨能力的实验中^[8-9]。有学者在GsRg1对小鼠骨髓干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)的研究中发现,与0 mg/L GsRg1比较,100 mg/L GsRg1作用于BMSCs后,ALP活性明显提高,说明有大量的成骨细胞形成;另有研究^[10]发现,经过1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的GsRg1培养后,PDLSCs的ALP活性显著提高,说明GsRg1具有促进PDLSCs成骨分化的能力。本实验中100 mg/L GsRg1作用于HGFs后,ALP活性明显增高,表明GsRg1对HGFs早期成骨分化具有促进作用。

钙结节是成骨晚期形成的一种标志物,茜素红染色结果显示实验组红染结节明显多于对照组,钙结节定量检测显示实验组吸光度值明显高于对照组,且100 mg/L GsRg1的吸光度值明显高于12.5 mg/L GsRg1,表明GsRg1具有促进HGFs晚期成骨分化的作用,且随着浓度的升高,促进作用增强。

OCN是成骨分化中期重要的标志物^[11],可以用于检验成骨细胞活性。OPN是一种重要的骨基质蛋白,与骨的形成和矿化密切相关^[12]。COL-I是由成骨细胞分泌的骨基质中最主要的纤维胶原成分,可有效刺激细胞的黏附和成骨分化^[13]。qRT-PCR和Western blot实验显示:与对照组比较,实验组的OCN、OPN、COL-I mRNA和蛋白表达水平增高,说明100 mg/L GsRg1具有促进HGFs成骨分化的效果。

PI3K/Akt信号通路与细胞生长、增殖、蛋白合成、新陈代谢和凋亡等生物活动密切相关^[14]。研究^[15]表明PI3K/AKT信号通路与骨生成和软骨内骨化密切相关,激活PI3K/Akt信号通路可促进BMSCs、PDLSCs的增殖和成骨分化,促进成骨相关因子ALP、Runx2、OCN等的表达。Western blot实验检测GsRg1作用于HGFs后的PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达,结果发现实验组p-PI3K/p-AKT蛋白表达水平随给药时间的延长而明显上升,而PI3K/AKT蛋白表达随时间推移无明显改变,可能的原因是成骨基因的蛋白水平表达升高,进而激活PI3K/AKT信号通路,从而推断GsRg1有可能通过激活PI3K/AKT信号通路达到促进HGFs成骨分化的作用。这一推论仍有待后续实验进一步完善论

证。

综上所述,GsRg1 可以提升 HGFs 增殖、迁移以及成骨分化能力,其作用机制可能与 PI3K/AKT 信号通路的激活有关。本研究将为 GsRg1 在牙周组织再生工程中的应用提供参考,证实其在口腔医学领域有广阔的应用前景。但 GsRg1 促进 HGFs 成骨分化的作用机制是否与 PI3K/AKT 信号通路的激活有关仍需实验进一步证实。

参考文献

- [1] Iwata T, Yamato M, Washio K, et al. Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets-a safety and efficacy study in ten patients[J]. *Regen Ther*,2018,9:38-44.
- [2] 陈晓霞,颜世果,孙钦峰,等.慢病毒介导核心结合因子 $\alpha 1$ 基因感染对人牙龈成纤维细胞成骨特性的影响[J]. *口腔医学*,2020,40(8):682-7.
- [3] 李成鹏,张梦思,刘俊,等.人参皂苷 Rg1 延缓脑衰老机制研究[J]. *中国中药杂志*,2014,39(22):4442-7.
- [4] He F, Yu C, Liu T, et al. Ginsenoside Rg1 as an effective regulator of mesenchymal stem cells[J]. *Front Pharmacol*,2020,10:1565.
- [5] Yin L H, Cheng W X, Qin Z S, et al. Effects of ginsenoside Rg-1 on the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. *Chin J Integr Med*,2015,21(9):676-81.
- [6] 王畅,张茜,刘悦,等.牙周组织再生材料应用研究进展[J]. *化学与生物工程*,2022,39(6):18-21.
- [7] Larbunphol N, Chanamuangkon T, Thamrongananskul N. The fluoride release, abrasion resistance, and cytotoxicity to hGFs of a no-

- vel cyanoacrylate-based fluoride varnish compared with conventional fluoride varnish[J]. *Dent Mater J*,2022,41(5):757-66.
- [8] 赵有顺,林平,涂迎春,等. RUNX2 基因过表达载体修饰 BMSC 来源外泌体联合碳酸钙支架系统在骨缺损中的应用[J]. *中国骨伤*,2022,35(4):379-86.
- [9] Liu Y, Ming L, Luo H, et al. Integration of a calcined bovine bone and BMSC-sheet 3D scaffold and the promotion of bone regeneration in large defects[J]. *Biomaterials*,2013,34(38):9998-10006.
- [10] 王萍,周玥,王亚平,等.人参皂苷 Rg1 促进人牙周膜干细胞增殖与成骨分化[J]. *第三军医大学学报*,2013,35(15):1566-9.
- [11] Song Z H, Xie W, Zhu S Y, et al. Effects of PEMFs on Osx, Ocn, TRAP, and CTSK gene expression in postmenopausal osteoporosis model mice[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2018,11(3):1784-90.
- [12] Fu Y, Zhang Y, Lei Z, et al. Abnormally activated OPN/integrin α 5 β 1 signaling is responsible for EGFR-TKI resistance in EGFR mutant non-small-cell lung cancer[J]. *J Hematol Oncol*,2020,13(1):169.
- [13] Ai Y, She W, Wu S, et al. AM1241-loaded poly(ethylene glycol)-dithiothreitol hydrogel repairs cranial bone defects by promoting vascular endothelial growth factor and COL-1 expression[J]. *Front Cell Dev Biol*,2022,10:888598.
- [14] Liu F, Chen G D, Fan L K. Knockdown of PDX1 enhances the osteogenic differentiation of ADSCs partly via activation of the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*,2022,17(1):107.
- [15] Chen Y, Hu Y, Yang L, et al. Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via PI3K/AKT/GSK3 β /beta-catenin pathway[J]. *Cell Biol Int*,2017,41(8):822-32.

Ginsenoside Rg1 promotes proliferation, migration and osteogenic differentiation of human gingival fibroblasts

Zhang Xin^{1,2}, Li Changshun², Liu Hao², Zhu Shaoyue², Zhou Meng², Feng Yan², Zhang Guangdong¹

(¹Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of

Nanjing Medical University, Jiangsu Province Key Laboratory of Oral Diseases, Jiangsu Province

Engineering Researching Center of Stomatological Translation Medicine, Nanjing 210029; ²Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002)

Abstract Objective To investigate the effect of Ginsenoside Rg1 (GsRg1) on proliferation, migration and osteogenic differentiation of human gingival fibroblasts (HGFs) and its molecular mechanism. **Methods** Human gingival fibroblasts (HGFs) were isolated and cultured by tissue block method, and identified by morphology and immunofluorescence. The effect of six concentrations of GsRg1 (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg/L) on the proliferation of HGFs was detected by CCK-8 method. Transwell assay was used to detect the effects of different concentrations of GsRg1 on the migration ability of HGFs. Alkaline phosphatase (ALP) staining was used to detect osteogenic ability. Alizarin red staining was used to observe and quantify calcium nodules. The expression of COL- I, OCN and OPN osteogenic genes was detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the protein expression of OCN, OPN, COL- I and PI3K/AKT signaling pathway. **Results** Compared with the control group, the proliferation ability

JAK 抑制剂托法替布治疗类风湿关节炎 相关间质性肺病的实验研究

蒋 总¹, 姚晓玲¹, 唐 芳², 马武开², 兰维娅², 姚血明², 安 阳², 刘正奇²

摘要 **目的** 观察托法替布通过调控 JAK-STAT 信号通路对间质性肺病(ILD)的影响。**方法** Wistar 大鼠随机分为正常组、ILD 模型组、醋酸泼尼松组、托法替布组。除正常组外,其余 3 组予 3 mg/ml 博莱霉素溶液进行造模。灌胃干预 28 d 后收集所有大鼠肺组织行 HE 染色、Western blot 法检测 JAK1、STAT1 蛋白含量;ELISA 检测大鼠血清中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-10、IL-1 β 水平。**结果** ILD 模型组、醋酸泼尼松组、托法替布组肺组织 HE 染色均可见肺泡组织增厚,肺泡壁毛细血管充血、支气管管腔上皮细胞脱落、炎性细胞渗出。Western blot 结果显示 ILD 模型组 JAK1 和 STAT1 均升高;与 ILD 模型组比较,托法替布组、醋酸泼尼松组均有不同程度下降($P < 0.05$)。ELISA 结果显示 ILD 模型组血清 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达较正常组升高($P < 0.01$);与 ILD 模型组比较,托法替布组、醋酸泼尼松组表达

均下降($P < 0.05$),IL-10 表达与之相反。**结论** 托法替布通过抑制 JAK-STAT 通路并下调炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及上调抑炎因子 IL-10 的表达,减轻肺组织损伤,减轻炎症反应,治疗 ILD。

关键词 JAK-STAT;托法替布;类风湿关节炎;间质性肺病
中图分类号 R 593.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0819-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.019

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种多器官、多系统受累的免疫性疾病^[1]。普通型间质性肺炎(usual interstitial pneumonia, UIP)是 RA-间质性肺病(interstitial lung disease, ILD)中最常见的类型之一,也是 RA 死亡的主要原因之一^[2]。目前 RA-ILD 的发病机制尚不清楚,且缺乏有效的治疗手段。因此,探索 RA-ILD 的发病机制及寻求有效治疗药物尤为重要。目前研究证实 JAK 信号通路与 RA 密切相关,相关药物已经批准用于临床^[3]。临床中也发现托法替布(JAK 抑制剂)不仅能有效缓解 RA 病情,还能缓解 ILD 影像学表现。已有研究^[4]报道发现 ILD 与 JAK 信号通路有明显的相关性,但无明确的证据显示 JAK 信号通路与 RA-ILD 发病的关系。该研究通过建立 RA-ILD 动物模型,研究托法替布抑制 JAK 信号通路治疗 RA-ILD 的分子机制,为临床治疗 RA-ILD 提供新的方法。

2022-12-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160917);贵州省高层次创新型人才培养计划(编号:黔科合平台人[2016]5650);贵州省中医风湿免疫疾病临床研究中心项目(编号:黔科合平台人才[2020]2202号);贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(编号:黔教合 KY 字[2022]262号);贵州省卫健委科技基金(编号:gzwkj2021-142)

作者单位:¹ 贵州中医药大学第二临床医学院,贵阳 550002

² 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科,贵阳 550003

作者简介:蒋 总,男,住院医师;

唐 芳,女,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: 64550932@qq.com

of HGFs was significantly improved at the concentrations of 12.5, 25, 50 and 100 mg/L GsRg1 ($P < 0.05$), and the proliferation promotion effect of 100 mg/L GsRg1 was the strongest. There was no significant difference between the 6.25 mg/L GsRg1 group and the control group. After GsRg1 treatment, the migration ability of HGFs was enhanced and showed concentration dependence. Compared with the control group, the activity of ALP in 100 mg/L GsRg1 group significantly increased ($P < 0.01$). Alizarin red staining showed a significant increase in the number of calcium nodules ($P < 0.01$). The mRNA and egg white expression levels of osteogenic genes OCN, OPN and COL-1 increased ($P < 0.05$). The expression levels of p-PI3K and p-Akt were significantly up-regulated with time ($P < 0.05$), while the expression levels of PI3K and AKT had no significant changes. **Conclusion** GsRg1 can promote the proliferation and migration of HGFs, and 100 mg/L GsRg1 can promote the osteogenic differentiation of HGFs, which may be related to the activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words human gingival fibroblasts; ginsenoside Rg1; cell proliferation; cell migration; osteogenesis differentiation