

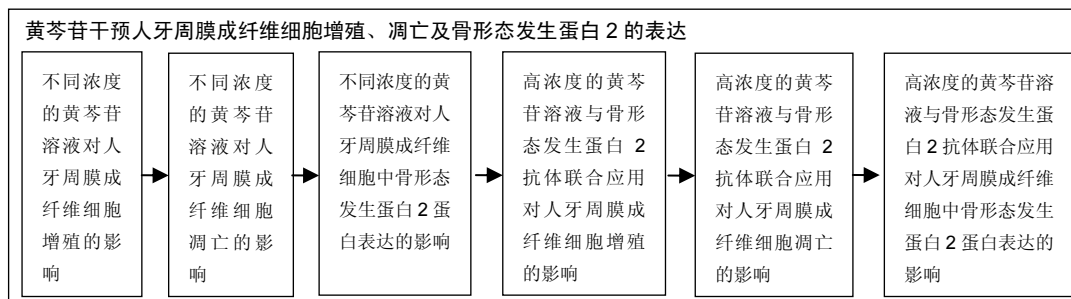
中药黄芩苷干预人牙周膜成纤维细胞的作用及分子机制

李丽华¹, 贾艾敏², 杨明辉², 刘震¹, 王丽恒², 蒋红², 邱亚² (川北医学院附属医院,¹口腔科, ²医学研究中心, 四川省南充市 637000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0390

ORCID: 0000-0001-7215-1324(李丽华)

文章快速阅读:



文题释义:

黄芩苷: 是从植物黄芩的干燥根中提取分离出来的一种黄酮类化合物, 具有多种药理作用, 如抗菌、消炎、减少抗原抗体反应和化学介质的释放量、抑制变态反应和清除超氧自由基等。研究表明, 黄芩苷能够在一定程度上抑制基质金属蛋白酶的活性, 能够促进成纤维细胞的增殖和胶原蛋白的合成。

骨形态发生蛋白 2: 近年来基因重组的骨形态发生蛋白 2 应用的安全性和有效性得到了充分的证实, 美国 FDA 也于 2002 年 7 月批准重组骨形态发生蛋白 2 应用于脊柱融合。基于骨形态发生蛋白的安全性和高效诱导成骨活性被越来越多的实验所证实并进入临床试验阶段。

摘要

背景: 黄芩苷作为一种重要的中药提取物, 近年来的应用被越来越多的研究所提及。实验表明黄芩苷可以促进人牙周膜成纤维细胞的增殖并向成骨分化, 但具体分子机制尚不清楚。

目的: 研究中药提取物黄芩苷对人牙周膜成纤维细胞的增殖促进作用及潜在的分子机制。

方法: 通过细胞原代培养及光学显微镜下观察人牙周膜成纤维细胞的形态。CCK8 法检测黄芩苷对人牙周膜成纤维细胞增殖的促进作用; 采用实时定量 PCR 分析黄芩苷对增殖细胞核抗原表达的影响; 实时定量 PCR 以及流式细胞术分析黄芩苷对细胞凋亡的抑制作用; Western blot 及实时定量 PCR 分析黄芩苷对细胞中骨形态发生蛋白 2 蛋白与 mRNA 表达的影响; 加入骨形态发生蛋白 2 抗体来检测黄芩苷对细胞增殖凋亡的作用以及骨形态发生蛋白 2 表达的变化。

结果与结论: ①与对照组相比, 黄芩苷能够明显促进人牙周膜成纤维细胞增殖, 并上调增殖细胞核抗原的 mRNA 表达水平; ②与对照组相比, 黄芩苷能够上调 Bcl-2 mRNA 表达水平, 下调 Bad mRNA 表达水平, 流式细胞术结果也显示黄芩苷能够抑制细胞的凋亡; ③黄芩苷能够浓度与时间依赖性地上调骨形态发生蛋白 2 蛋白与 mRNA 水平; 加入骨形态发生蛋白 2 中和抗体可减弱黄芩苷的调控作用; ④结果表明, 黄芩苷能够促进人牙周膜成纤维细胞的增殖, 其发挥作用的机制可能与上调骨形态发生蛋白 2 表达有关。

关键词:

黄芩苷; 人牙周膜成纤维细胞; 增殖; 凋亡; 骨形态发生蛋白 2; 牙周病; 成骨分化

主题词:

中草药; 牙周膜; 细胞增殖; 骨形态发生蛋白质类; 组织工程

基金资助:

四川省卫计委科研课题(16PJ132); 四川省教育厅课题(14ZB0197)

缩略语:

人牙周膜成纤维细胞: human periodontal ligament fibroblasts, HPLFs; 骨形态发生蛋白 2: bone morphogenetic protein-2, BMP-2

Effect of baicalin on human periodontal ligament fibroblasts and the underlying molecular mechanism

Li Li-hua¹, Jia Ai-min², Yang Ming-hui², Liu Zhen¹, Wang Li-heng², Jiang Hong², Qiu Ya² (¹Department of Stomatology, ²Medical Research Center, Affiliated Hospital of Northern Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Baicalin, as an important traditional Chinese medicine extract, has been extensively studied. Baicalin has been shown to promote the proliferation of human periodontal ligament

李丽华, 女, 1977 年生, 四川省广安市人, 汉族, 2007 年重庆医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事口腔基础和临床的相关研究。

通讯作者: 邱亚, 硕士, 副主任医师, 川北医学院附属医院医学研究中心, 四川省南充市 637000

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-04-06



Li Li-hua, Master, Associate professor, Department of Stomatology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Qiu Ya, Master, Associate chief physician, Medical Research Center, Affiliated Hospital of Northern Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

fibroblasts (HPLFs) and differentiation into osteocytes, but the underlying molecular mechanism remains unclear.

OBJECTIVE: To study the effect of baicalin on the proliferation of HPLFs and the underlying molecular mechanism.

METHODS: Morphology of HPLFs was observed by primary cell culture and light microscopy. The growth-promoting effect of baicalin on HPLFs was detected by cell counting kit-8 assay. The effect of baicalin on the expression of proliferating cell nuclear antigen was detected by qRT-PCR. The inhibitory effect of baicalin on cell apoptosis was detected by qRT-PCR and flow cytometry. The level of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) under baicalin treatment was tested by western blot assay and qRT-PCR. BMP2 antibody was employed to detect the influence of baicalin on the proliferation and apoptosis of HPLFs and the expression of BMP2 in HPLFs.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, baicalin could significantly promote the proliferation of HPLFs, and up-regulate the mRNA expression level of proliferating cell nuclear antigen. Compared with the control group, baicalin could significantly up-regulate the mRNA level of Bcl-2 and down-regulate the mRNA level of Bad. Flow cytometry also showed that baicalin could inhibit cell apoptosis. Baicalin could up-regulate the protein and mRNA levels of BMP2 in a time- and concentration-dependent manner. The regulatory effect of baicalin was decreased after addition of BMP2 antibody. In summary, baicalin promotes proliferation of HPLFs probably via up-regulating BMP2 level.

Subject headings: Drugs, Chinese Herbal; Periodontal Ligament; Cell Proliferation; Bone Morphogenetic Proteins; Tissue Engineering

Funding: the Scientific Research Project of Health and Family Planning Commission of Sichuan Province, No. 16PJ132; the Project of Education Department of Sichuan Province, No. 14ZB0197

0 引言 Introduction

近年来, 尽管口腔预防保健工作不断得到普及, 口腔治疗技术也在不断创新, 但是牙周病造成牙列缺损及缺失的情况仍然在逐年增加^[1]。人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, HPLFs)作为人牙周膜的主体细胞, 参与了牙周组织的病变、修复及再生过程^[2-3]。利用人牙周膜的相关细胞建立体外模型, 已经成为研究牙周组织疾病的重要手段。

牙周膜相关细胞包括成纤维细胞, 成骨细胞, 破骨细胞, 成牙骨质细胞以及上皮剩余细胞^[4-5]。但是HPLFs是最主要的细胞, 其可以不断形成新的主纤维、牙骨质, 并改建牙槽骨, 对牙周组织的修复十分重要, 是牙周治疗后形成牙龈与牙根面新附着的主要细胞来源^[6-7]。据报道, HPLFs的减少可造成牙松动、移位, 并最终导致牙丧失^[8]。所以增加病变部位的HPLFs, 并诱导其向成骨分化可能是治疗牙周疾病的方案之一。例如朱庆勇等^[9]发现抑制Kv1.3表达能抑制HPLFs增殖和分化能力, 其机制可能与细胞内钾离子浓度有关, 但具体机制尚需进一步研究。Bhattarai等^[10]发现脂多糖在高糖环境下介导的HPLFs增殖的抑制、凋亡及凋亡相关基因**bax**和**bcl-2**的表达显著增强, 结果提示脂多糖和高糖环境在诱导细胞凋亡方面存在显著的交互作用。此发现为糖尿病相关性牙周病的病理机制提供了更多的理论依据和新的临床思路, 但是具体的分子机制尚不明确, 仍需进一步研究。

黄芩苷作为传统中药, 具有多种生理作用, 如抗菌、消炎、减少抗原抗体反应等^[11-13]。近年来研究显示, 黄芩苷对HPLFs具有保护作用。李会英等^[14]发现中药黄芩苷能显著促进成纤维细胞的增殖, 对脂多糖抑制HPLFs活性和脂多糖损伤HPLFs超微结构具有保护作用。同时, 桂林源等^[15]发现, 黄芩苷对于去势大鼠的骨质疏松具有一定的预防和治疗作用。但黄芩苷对于HPLFs的成骨影响一直尚未有研究。

当前实验以体外培养的HPLFs为研究对象, 通过一系列的分子生物学实验探讨了中药提取物黄芩苷对HPLFs的增殖促进作用以及与骨形态发生蛋2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的相关关系, 为将黄芩苷进一步用于临床治疗提供新的思路和实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 于2015年9月至2017年5月在川北医学院附属医院口腔内科、口腔正畸科和临床医学研究中心完成。

1.3 材料 α -MEM培养基、胰蛋白酶、谷氨酰胺、青-链霉素、胰蛋白酶、胎牛血清(Gibco, 美国); 黄芩苷(sigma, 美国); 蛋白提取定量试剂盒、Western Blot发光液(Thermo, 美国); Trizol试剂、Prime Script RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa, 日本); 蛋白裂解液(碧云天, 中国); HPLFs(ATCC, 美国); 兔BMP-2抗人单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, 美国); 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物, 中国); CCK-8试剂盒(赛米克生物, 中国); 超净工作台(苏州净化, 中国); CO₂恒温孵箱(Thermo, 美国); 酶标仪、电泳仪及转膜系统(Bio-Rad, 美国)倒置相差显微镜系统(Nikon, 日本); 流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国); 凝胶电泳成像拍照系统(Tanon, 中国)

1.4 方法

1.4.1 HPLFs培养 将HPLFs进行复温, 37 °C、体积分数5%CO₂培养24 h后观察其生长至90%左右后进行传代。用体积分数0.25%胰蛋白酶消化, 并在显微镜下观察。当细胞开始缩小变圆, 细胞与细胞之间出现明显的间隙时, 此时证明细胞已被消化好(约1 min)。用含体积分数10%胎牛血清的 α -MEM培养基培养和消化, 用枪头吹打消化后的细胞并转移至10 mL离心管中, 800 r/min离心5 min, 然后倒掉上清, 加入5 mL培养基重悬, 最后分别接入到3个T75的培养瓶中, 置于CO₂恒温孵箱内培养, 于培养的6, 12及24 h显微镜下观察细胞生长情况。

1.4.2 黄芩苷溶液的配制 称取44.636 mg的黄芩苷溶于10 mL的二甲基亚砷溶液(DMSO), 配制成浓度为10 mmol/L溶液, 储存备用。当在6孔板中培养细胞时, 每孔加入2 mL培养液。低浓度黄芩苷组每孔加入1 μ L的黄芩苷(浓度为5 μ mol/L); 高浓度黄芩苷组每孔加入2 μ L的黄芩苷(浓度为10 μ mol/L); 对照组加入2 μ L的DMSO。当在96孔板中培养细胞时, 每孔加入100 μ L培养液。低浓度黄芩苷组每孔加入0.01 μ L的黄芩苷(浓度为5 μ mol/L); 高浓度黄芩苷组每孔加入0.02 μ L的黄芩苷(浓度为10 μ mol/L); 对

照组加入0.02 μL 的DMSO。

1.4.3 CCK-8法检测细胞增殖 将处于指数生长期的HPLFs消化并铺于96孔板,每孔培养基体积为100 μL ,约5 000细胞。静置培养约6 h待细胞贴壁之后,向每孔分别加入0.01 μL 或0.02 μL 黄芩苷溶液。在加入后的24 h或48 h,弃去上层培养基,每孔重新加入100 μL 新鲜培养基,每100 μL 新鲜培养基含CCK-8试剂10 mL。待反应2 h后,进行震荡混匀后在酶标仪上读数,波长为450 nm。每组实验重复3次。

1.4.4 实时定量PCR检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、抗凋亡基因Bcl-2、促凋亡基因Bad以及BMP-2的表达水平 将HPLFs铺于6孔板中,每孔细胞约为 5×10^5 ,培养基体积为2 mL。待细胞贴壁后,向6孔板中分别加入1 μL 或2 μL 的黄芩苷溶液。24 h或48 h后,弃去上清液并用PBS洗涤3次,用常规的Trizol法提取细胞总RNA,然后取5 μL RNA原液,按反转录试剂盒说明书操作,制备cDNA(反转录条件为37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min; 85 $^{\circ}\text{C}$, 5 s)。相关基因的引物序列如下: GAPDH上游引物5'-CAA CGA ATT TGG CTA CAG CA-3',下游引物5'-AGG GGA GAT TCA GTG TGG TG-3'; BMP-2上游引物5'-GGG CAT CCT CTC CAC AAA-3',下游引物5'-GTC ATT CCA CCC CAC GTC-3'; PCNA上游引物5'-GGC TCT AGC CTG ACA AAT GC-3',下游引物5'-GCC TCC AAC ACC TTC TTG AG-3'; BAD上游引物5'-CGG AGG ATG AGT GAC GAG TT-3',下游引物5'-CGG AGG ATG AGT GAC GAG TT-3'; Bcl-2上游引物5'-CAT TCC TGT GTG GTG AGG TG-3',下游引物5'-CCT GCT GCT GAA GGA AAA TC-3'。实时定量PCR的反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$,作用3 min;进行35个循环(变性,95 $^{\circ}\text{C}$,30 s;退火,58 $^{\circ}\text{C}$,30 s;延伸,72 $^{\circ}\text{C}$,30 s)。每组实验重复3次。

1.4.5 流式细胞术检测凋亡数量 将细胞均匀铺于6孔板中,每孔细胞约为 5×10^5 ,培养基体积为2 mL。待细胞贴壁后,往6孔板中分别加入1 μL 或2 μL 的黄芩苷溶液,并于48 h后消化并收集细胞。800 r/min离心5 min;再用PBS洗涤2次,每次5 min,最后制成1 mL的混悬液。按试剂盒说明书操作分别加入 Annexin-V EGFP和 PI,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min后通过流式细胞仪检测细胞凋亡数量。

1.4.6 Western blot检测BMP-2蛋白的表达 将细胞均匀铺于6孔板中,每孔细胞约为 5×10^5 ,培养基体积为2 mL。待细胞贴壁后,往6孔板中分别加入1 μL 或2 μL 的黄芩苷溶液,并于24,48 h后在冰上加入蛋白裂解液,后用细胞刮刀刮下后提取各组总蛋白。经BCA法进行蛋白定量,配制体积分数10%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳后将蛋白转印至PVDF膜上,采用体积分数5%BSA常温封闭1 h后,加入BMP-2一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,复温后室温下以辣根过氧化物酶标记的兔二抗孵育1 h,最后加入发光液显影成像。每组实验重复3次。

1.4.7 加入抗BMP-2蛋白抗体后观察其对细胞功能及mRNA表达的影响 将HPLFs细胞铺于6孔板中,每孔细胞约为 5×10^5 ,培养基体积为2 mL。待细胞贴壁后,向6孔板

中分别加入5 μL 抗BMP-2蛋白抗体(1:200)、2 μL 的黄芩苷溶液以及二者的混合液(5 μL 抗BMP-2蛋白抗体+2 μL 的黄芩苷溶液)。24,48 h后,弃去上清液并用PBS洗涤3次,常规的Trizol法分别提取不同组的细胞总RNA,随即进行反转录得到cDNA,然后进行上述的实时定量PCR检测。每组实验重复3次。

1.5 主要观察指标 ①细胞形态;②细胞增殖情况;③细胞凋亡情况;④PCNA、Bcl-2、Bad、BMP-2的mRNA水平和BMP-2蛋白表达情况。

1.6 统计学分析 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。相关数据用SPSS 19.0进行分析,3组及其以上比较用单因素方差分析,组内比较用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 HPLFs形态鉴定 将细胞消化传代并铺板后,分别在6,12,24 h后在显微镜下观察细胞形态。可见培养的细胞在不同时间点均呈长梭形,胞体丰满,胞浆均匀(图1)。

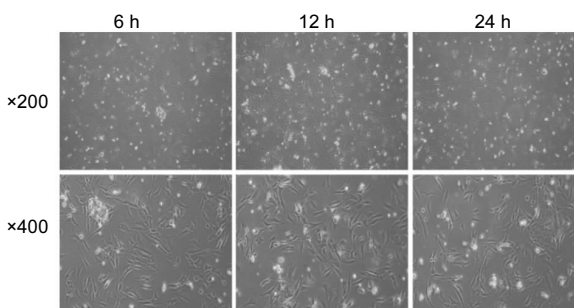


图1 人牙周膜成纤维细胞的形态

Figure 1 Morphological characteristics of human periodontal ligament fibroblasts

图注:光学显微镜下,接种后不同时间点人牙周膜成纤维细胞均呈长梭形,胞体丰满,胞浆均匀。

2.2 黄芩苷对HPLFs增殖的影响 CCK-8结果显示,在培养细胞24 h后,加入黄芩苷组与对照组相比,其细胞的生长率明显增加($P < 0.05$),高浓度黄芩苷相比于低浓度黄芩苷,能更好地刺激HPLFs生长。与此同时,在培养细胞48 h之后,加入黄芩苷组与对照组相比,趋势与24 h一致,证明其可以明显浓度与时间依赖性地促进细胞增殖(图2)。

2.3 黄芩苷上调HPLFs中PCNA mRNA表达水平 实时定量PCR分析结果显示,细胞培养24 h后,黄芩苷组与对照组相比,PCNA mRNA表达水平明显增加($P < 0.01$),尤其是高浓度黄芩苷组。48 h后,黄芩苷组与对照组相比,趋势与24 h一致,证明黄芩苷不仅浓度而且时间依赖性地促进细胞PCNA mRNA表达水平(图3)。

2.4 黄芩苷抑制HPLFs细胞凋亡 实时定量PCR分析结果显示,细胞培养24 h后,黄芩苷组与对照组相比,Bcl-2 mRNA表达明显增加,而Bad mRNA明显降低($P < 0.01$),尤其是高浓度黄芩苷组。48 h后,加入黄芩苷组与对照组相比,趋势与24 h基本一致(图4);同时,经过流式分析可证明,黄芩苷组相比较于对照组,具有一定的抑制细胞凋亡的作用,高浓度黄芩苷的应用使细胞凋亡率从30.4%降低至18.3%,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图5。

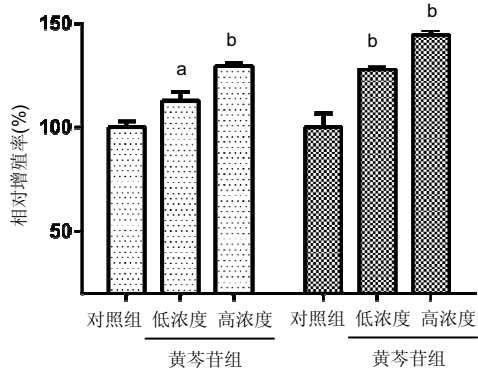


图2 黄芩苷对人牙周膜成纤维细胞增殖的影响
Figure 2 Effect of baicalin on proliferation of human periodontal ligament fibroblasts
图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

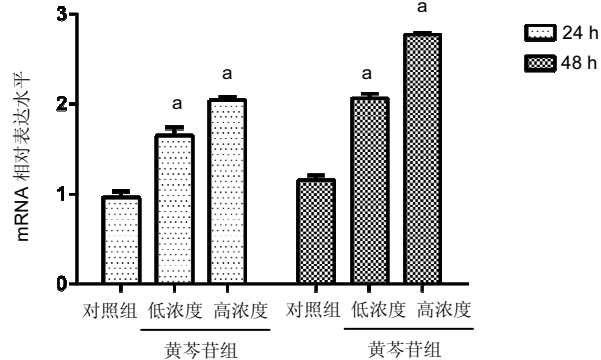


图3 黄芩苷对细胞增殖细胞核抗原 mRNA 表达水平的影响
Figure 3 Effect of baicalin on the expression level of proliferating cell nuclear antigen
图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$.

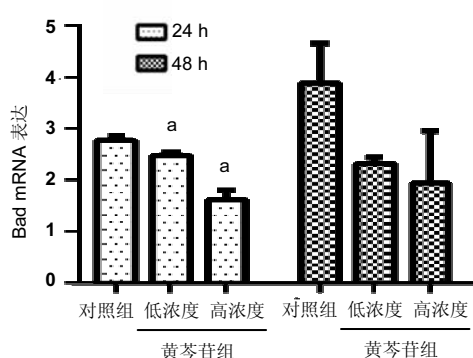
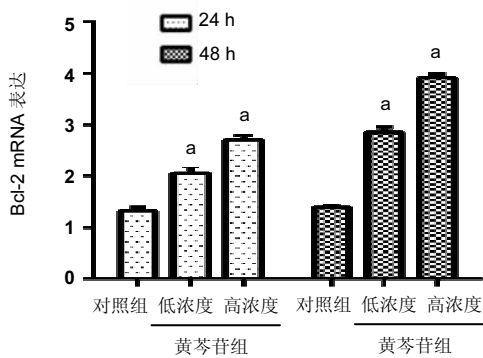


图4 黄芩苷对人牙周膜成纤维细胞中凋亡基因表达的影响
Figure 4 Effect of baicalin on the expression level of apoptosis-related genes in human periodontal ligament fibroblasts
图注: 与对照组相比, ^a $P < 0.01$.

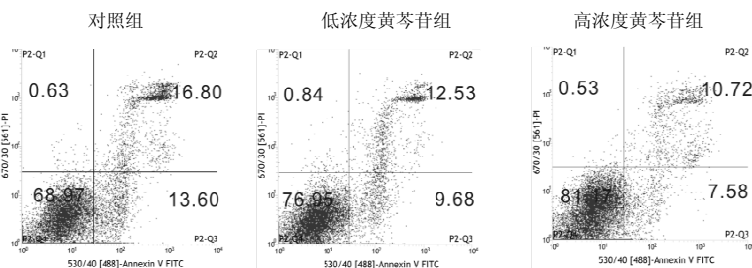


图5 流式细胞术检测各组人牙周膜成纤维细胞凋亡率
Figure 5 Apoptotic rate of human periodontal ligament fibroblasts in each group detected by flow cytometry
图注: 黄芩苷组的细胞凋亡率显著低于对照组, 尤其是高浓度黄芩苷组。

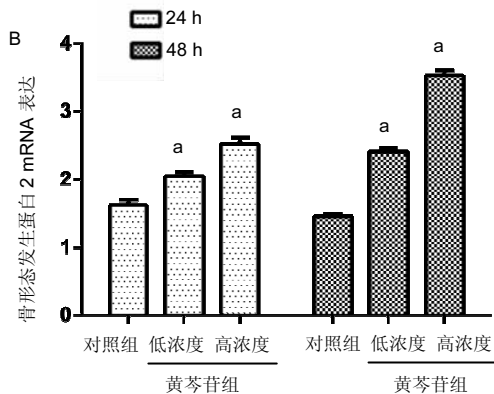
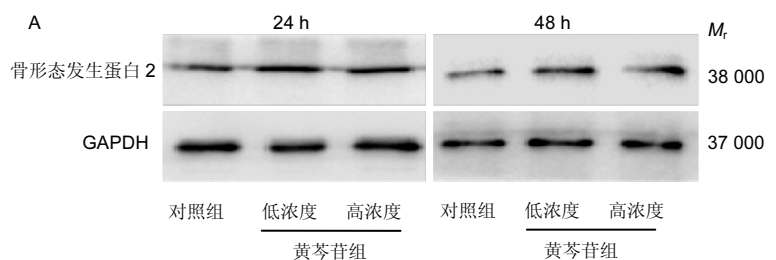


图6 黄芩苷对细胞中骨形态发生蛋白 2 表达水平的影响
Figure 6 Effect of baicalin on the expression level of bone morphogenetic protein 2
图注: 图 A 为 Western blot 检测加入不同浓度的黄芩苷并处理不同时间后骨形态发生蛋白 2 蛋白的表达情况; B 为 qRT-PCR 检测加入不同浓度的黄芩苷并处理不同时间后骨形态发生蛋白 2 mRNA 表达水平的变化。与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。

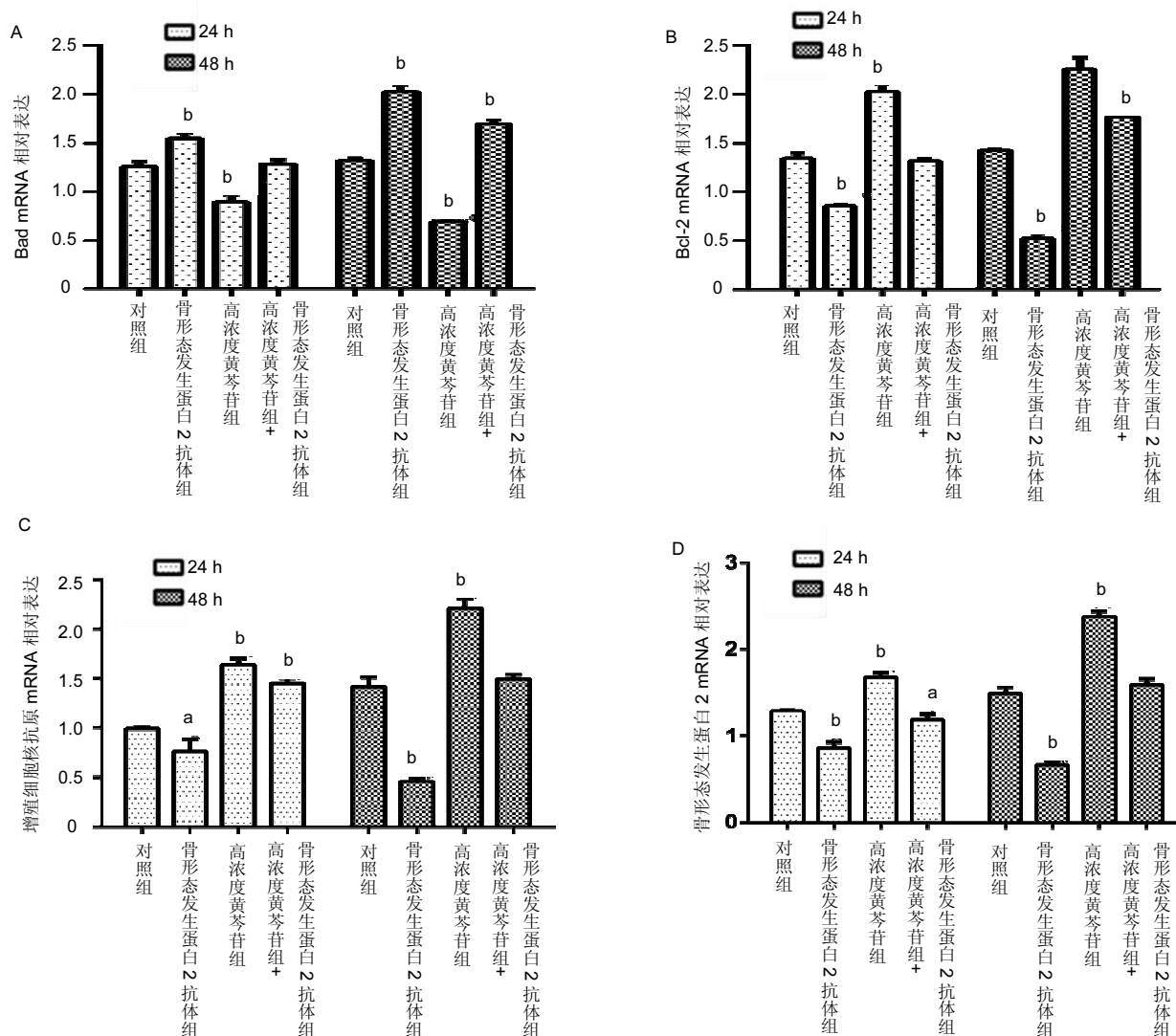


图7 黄芩苷与骨形态发生蛋白2抗体联合应用对人牙周膜成纤维细胞的作用

Figure 7 Effect of baicalin combined with bone morphogenetic protein 2 antibody on human periodontal ligament fibroblasts

图注: 图中A、B、C、D分别为qRT-PCR检测加入骨形态蛋白2抗体后, 各组间Bad和Bcl-2、增殖细胞核抗原、骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平。与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.5 黄芩苷对HPLFs细胞中BMP-2水平的影响

Western blot结果显示, 随着加入黄芩苷的浓度以及作用时间增加, BMP-2蛋白表达相比于对照组有增加趋势(图6A); 同时, 实时定量PCR分析结果也显示, 与对照组细胞中BMP-2的mRNA水平相比, 黄芩苷溶液对BMP-2表达水平的上调作用更加明显, 差异有显著性意义($P < 0.01$), 尤其是高浓度黄芩苷(图6B)。

2.6 加入BMP-2抗体对黄芩苷诱导的增殖凋亡和BMP-2的影响

实时定量PCR分析结果显示, 相比于对照组, 不论在24 h及48 h, 加入BMP-2抗体促进了细胞的凋亡水平, 上调了Bad mRNA表达水平, 下调了Bcl-2 mRNA表达水平, 随时间具有相同的趋势且差异显著($P < 0.01$)(图7A, B); 同时, 加入BMP-2抗体抑制了黄芩苷溶液所诱导增强BMP-2 mRNA表达的作用, 相比于单纯高浓度黄芩苷溶液组, 其PCNA mRNA表达水平下降, 但仍显著高于对照组, 且随时间递增趋势相同($P < 0.01$)(图7C, D)。

3 讨论 Discussion

黄芩是一种常用的中药, 具有显著的抑菌、利尿、抗炎、解痉、抗氧化、阻止钙离子通道、抑制醛糖还原酶等生物活性, 并且能吸收紫外线、清除氧自由基、抑制黑色素的生成^[16]。近年来的体内外实验均证明其有显著的保护作用^[17-18]。因其具有高效低毒和诱导成骨的特性, 所以近年来把黄芩苷用作成骨诱导剂也是一个研究热点。严启新等^[19]发现黄芩苷可以促进成骨细胞增殖和分化, 抑制破骨细胞的活性, 对临床骨质疏松的防治具有积极意义。葛志华等^[20]发现黄芩苷可能通过拮抗脂多糖抑制牙周膜细胞碱性磷酸酶的活性, 促使牙周膜细胞向成骨细胞分化而利于牙周组织再生修复。此外, 还有一些相关领域的研究, 但都未对黄芩苷诱导成骨的机制进行分析。

BMP能够诱导动物或人体间充质细胞分化为骨、软骨、韧带、肌腱和神经组织^[21]。近年来研究报道, BMP在中枢神经的发生中也起着关键作用^[22-24]。BMP-2属于转化

生长因子 β 超家族成员之一, 是一种广泛存在于骨基质中的一种有活性的酸性糖蛋白。研究表明, BMP-2作为一种高效的成骨诱导因子, 可诱导间充质细胞向骨细胞系分化, 并抑制其向其它类型的细胞分化, 同时还可以诱导非骨源性细胞向具有成骨表型的细胞分化, 改善骨缺损、牙齿松动等疾病^[25-29]。冯艳红等^[30]发现BMP-2可促进犬牙髓成纤维细胞的增殖, 并且可以和犬牙髓细胞形成复合物, 作为牙组织工程的支架材料。但是目前尚缺乏BMP-2是否影响干细胞的增殖以及证明传统中药黄芩苷对成骨细胞的作用的研究。

在当前实验中, 黄芩苷能够分别浓度与时间依赖性地促进HPLFs的增殖, 抑制其凋亡, 这也间接说明了黄芩苷能改善HPLFs减少所引起的疾病。此外, 黄芩苷还能上调BMP-2蛋白的表达, 这说明了黄芩苷能够诱导HPLFs向成骨细胞的分化, 改善牙齿的密度和脆性。但在实验中, 仅加入BMP-2抗体来反向验证黄芩苷的作用是不够的, 而且黄芩苷发挥作用的具体分子通路尚不明确, 也并未进行相关的体内模型实验进行验证。在后续实验研究中, 课题组将继续从过表达或者沉默BMP-2基因来探讨黄芩苷是激活BMP-2基因的具体分子机制, 从而完善整体的研究, 为牙周疾病的治疗提供新的参考方向和理论依据。

综上所述, 黄芩苷可以有效促进HPLFs增殖、抑制其细胞凋亡, 同时上调BMP-2蛋白的表达, 增强其成骨能力, 为后期牙周病的治疗策略提供了有效的细胞分子生物学基础及思路。

作者贡献: 通讯作者及第一作者共同完成实验的设计和课题思路, 第一作者负责主要实验的实施及论文的撰写, 第二、第三、第四及第五作者协助完成实验数据的收集与整理, 第六作者协助完成实验数据的分析与统计。

经费支持: 该文章接受了“四川省卫计委科研课题(16PJ132)”、“四川省教育厅课题(14ZB0197)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章中的干预手段应用了黄芩苷, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经川北医学院生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 李云霞. 牙周病的病因及临床治疗研究进展[J]. 河北医学, 2013, 19(3): 466-469.
[2] 周志雄, 张笋. Er:YAG激光照射对HPLFs增殖的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2016, 32(3): 358-361.
[3] Duan X, Ji M, Deng F, et al. Effects of connective tissue growth factor on human periodontal ligament fibroblasts. Arch Oral Biol. 2017; 84: 37-44.

[4] 廖海清, 曹正国. 经典Wnt信号通路在牙周膜细胞成骨分化过程中的调控[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(03): 224-227.
[5] Wang L, Wu F, Song Y, et al. Long noncoding RNA related to periodontitis interacts with miR-182 to upregulate osteogenic differentiation in periodontal mesenchymal stem cells of periodontitis patients. Cell Death Dis. 2016; 7(8): e2327.
[6] 沈慧娟, 李琳娟, 康娜. HPLFs培养与鉴定[J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(6): 872-875.
[7] 郭琤, 潘克清, 邓婧, 等. 羧甲基壳聚糖锌多肽复合材料对HPLFs的毒性[J]. 上海口腔医学, 2017, 26(02): 162-166.
[8] 孙卫斌. 牙周病松动牙处理的现代观念[J]. 国外医学. 口腔医学分册, 1999, 6: 331-334.
[9] 朱庆勇, 陈文君, 朱慧, 等. 抑制Kv1.3表达能够降低HPLFs增殖和分化成骨能力[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(6): 819-823.
[10] Bhattarai G, Kook SH, Kim JH, et al. COMP-Ang1 prevents periodontitic damages and enhances mandible bone growth in an experimental animal model. Bone. 2016; 92: 168-179.
[11] 李晨睿, 孟志远, 牛银波, 等. 黄芩苷通过Wnt/ β -catenin信号通路对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的促进作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(07): 919-924.
[12] Chen LJ, Hu BB, Shi XL, et al. Baicalin enhances the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Arch Oral Biol. 2017; 78: 100-108.
[13] 顾青青, 邵以诺, 安毅, 等. 葛根苓连汤有效成分对黄芩苷在Caco-2细胞模型中吸收转运的影响[J]. 中成药, 2015, 37(4): 694-699.
[14] 李会英, 赵满琳, 尹梓兆, 等. 中药黄芩苷对HPLFs保护作用的实验研究[J]. 现代口腔医学杂志, 2006, 6: 634-637.
[15] 桂林源, 刘世宇, 邱新毓, 等. 黄芩小分子化合物对雌激素缺乏骨质疏松的预防和治疗作用[J]. 实用口腔医学杂志, 2016, 26(5): 294-300.
[16] 张前, 杨浩, 陈博, 等. 黄芩苷防治中枢神经系统疾病的研究进展[J]. 中国药师, 2017, 20(2): 327-331.
[17] Liu XM, Feng Y. Nerve protective effect of Baicalin on newborn HIBD rats. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7(10): 806-810.
[18] Cherng CH, Lee KC, Chien CC, et al. Icalin ameliorates neuropathic pain by suppressing HDAC1 expression in the spinal cord of spinal nerve ligation rats. J Formos Med Assoc. 2014; 113(8): 513-520.
[19] 严启新, 赵文娟, 殷明, 等. 黄芩总黄酮及黄芩苷对大鼠成骨细胞及破骨细胞活性的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1367-1370.
[20] 葛志华, 杨宁, 孙立新. 野黄芩苷对内毒素抑制人牙周膜细胞碱性磷酸酶活性的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(04): 365-367.
[21] Uchida K, Inoue G, Matsushita O, et al. Basic Fibroblast Growth Factor-Anchored Multilayered Mesenchymal Cell Sheets Accelerate Periosteal Bone Formation. Biomed Res Int. 2017; 2017: 4371460.
[22] Hu JG, Zhang YX, Qi Q, et al. Expression of BMP-2 and BMP-4 proteins by type-1 and type-2 astrocytes induced from neural stem cells under different differentiation conditions. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2012; 72(1): 95-101.
[23] 周心, 官堂明, 黄韧, 等. BMPs在中枢神经系统发育和神经保护中的作用[J]. 药学研究, 2014, 33(05): 282-285.
[24] Ahsan S, Ge Y, Tainsky MA, et al. Combinatorial therapeutic targeting of BMP2 and MEK-ERK pathways in NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors. Oncotarget. 2016, 7(35): 57171-57185.
[25] 杨林, 徐军美, 王亚平, 等. 骨形态发生蛋白2/4在神经系统中的作用及其研究进展[J]. 中南大学学报(医学版), 2018, 43(2): 222-228.
[26] 田原, 邸阳, 包翠芬, 等. 松果菊苷含药血清诱导骨髓间充质干细胞成骨分化及BMP2表达的研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 60-64.
[27] 齐鹏鹏, 孟颀, 吴梓其, 等. 骨形态发生蛋白2在牙槽骨改建中作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(3): 671-674.
[28] 张勤, 郑司鹏, 刘红, 等. 大鼠下颌前导后髁突软骨组织中BMP-2的含量变化研究[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(12): 1489-1491+1495.
[29] Park SH, Kwon JS, Lee BS, et al. BMP-2-modified injectable hydrogel for osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Sci Rep. 2017; 7(1): 6603.
[30] 冯艳红, 刁志虹, 高毅, 等. BMP2基因转染犬牙髓成纤维细胞与异种烧结骨复合组织工程的实验研究[J]. 河北医科大学学报, 2011, 32(8): 908-912+921.