

金银花含药血清对脂多糖诱导的人牙周膜细胞活性及NLRP3/IL-1 β 通路的影响

陆平, 岳黎, 魏丛丛

聊城市人民医院口腔科 (山东聊城 252000)

【摘要】目的 探讨金银花含药血清对脂多糖 (LPS) 诱导的人牙周膜细胞 (HPDLCs) 活性及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 通路的影响。**方法** 将 20 只大鼠按随机数字表法分为对照组 (生理盐水) 和金银花组 (5.0 g · kg⁻¹), 每组 10 只, 灌胃给药, 1 次/d, 持续 14 d。将 HPDLCs 分为对照组 (空白血清培养)、LPS 组 (10 μ g · mL⁻¹ LPS+ 空白血清培养)、金银花低浓度 (HPDLCs+10 μ g · mL⁻¹ LPS +75 μ L 空白血清培养 +75 μ L 5% 金银花含药血清)、中浓度 (HPDLCs+10 μ g · mL⁻¹ LPS+75 μ L 空白血清培养 +75 μ L 10% 金银花含药血清)、高浓度 (HPDLCs+10 μ g · mL⁻¹ LPS+75 μ L 空白血清培养 +75 μ L 20% 金银花含药血清) 组。MTT 检测 HPDLCs 细胞增殖率, Transwell 小室检测 HPDLCs 细胞迁移, 流式细胞仪检测 HPDLCs 细胞凋亡率, PCR 检测 HPDLCs 中 IL-1 β 、NLRP3 mRNA 的相对表达; Western blotting 法检测各组 HPDLCs 中 IL-1 β 、NLRP3、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Caspase-1) 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, LPS 组 HPDLCs 在 24, 48, 72 h 的细胞增殖率及细胞迁移数量显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、IL-1 β 、NLRP3 mRNA 和 IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, 金银花各剂量组 HPDLCs 在 24, 48, 72 h 的细胞增殖率和细胞迁移数量显著升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率、IL-1 β 、NLRP3 mRNA 和 IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 金银花对改善 LPS 诱导的 HPDLCs 凋亡和促进 HPDLCs 的增殖和迁移具有一定作用, 其机制可能与调控 NLRP3、IL-1 β 及 Caspase-1 表达水平相关。

【关键词】 金银花; 脂多糖; 人牙周膜细胞; 细胞活性; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3/ 白细胞介素 1 β 信号通路

Effect of flos loniceriae medicated serum on the activity of LPS induced human periodontal membrane cells and the mechanism of NLRP3/IL-1 β pathway

Ping LU, Li YUE, Cong-Cong WEI

Department of Stomatology, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China

Corresponding author: Yue LI, Email: yueli1987@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of flos loniceriae containing serum on the activity of human periodontal membrane cells (HPDLCs) and NLRP3, IL-1 β pathway induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Twenty rats were divided into controll group

(normal saline) and flos loniceræ group ($5.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) based on a random number table method, with 10 rats in each group. HPDLCs cells were divided into control (CON) group (blank serum culture), LPS group ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS+ blank serum culture), flos loniceræ low (HPDLCs + $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS+75 μL blank serum +75 μL flos loniceræ containing serum), medium (HPDLCs + $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS+75 μL blank serum +75 μL 10% flos loniceræ containing serum), high (HPDLCs + $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS +75 μL blank serum +75 μL 20% flos loniceræ containing serum) concentration group was given. Proliferation rate of HPDLCs was detected by MTT, migration rate of HPDLCs was detected by Transwell chamber, apoptosis rate of HPDLCs was detected by flow cytometry, and relative expression of IL-1 β and NLRP3 in HPDLCs was detected by PCR. The expressions of IL-1 β , NLRP3 and Caspase-1 protein containing cysteine in HPDLCs were detected by Western blotting. **Results** Compared with CON group, the proliferation rate at 24, 48 and 72 h and migration number of HPDLCs in LPS group was significantly decreased ($P<0.05$), while the apoptosis rate, mRNA expression of IL-1 β and NLRP3, and protein expression of IL-1 β , NLRP3 and Caspase-1 were significantly increased ($P<0.05$). Compared with LPS group, the proliferation rate at 24, 48 and 72 h and migration number of HPDLCs in flos loniceræ groups were significantly increased ($P<0.05$), while the apoptosis rate, mRNA expression of IL-1 β , NLRP3, and protein expression of IL-1 β , NLRP3 and Caspase-1 protein were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Flos loniceræ can improve the apoptosis of HPDLCs and promote the proliferation and migration of HPDLCs induced by LPS, and the mechanism may be related to the regulation of NLRP3, IL-1 β and Caspase-1 expression.

【Keywords】 Flos loniceræ; Lipopolysaccharide; Human periodontal membrane cells; Cell activity; NLRP3/IL-1 β signaling pathway

牙周炎是临床常见的口腔疾病之一，是由细菌引起的一种慢性非特异性炎症，早期可出现牙龈出血、炎症，后期牙龈和牙槽骨萎缩性改变。在多种病原微生物及其代谢产物的刺激下可破坏牙周组织并影响牙周膜细胞生长最终导致牙齿松动脱落^[1]。人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, HPDLCs) 是牙周膜中主要组成部分，可参与牙周组织形成再生，其分裂和凋亡在牙周组织的重建和破坏中具有重要作用^[2]。炎症复合体是胞质内模式识别受体家族成员之一，其中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 为 NLR3 家族中的炎症复合体，可通过效应分子白细胞介素 1 β (IL-1 β) 发挥作用，还可调控炎症反应及细胞凋亡的激活^[3]。IL-1 β 是一种促炎因子，其水平与牙周炎严重程度有密切关系^[4]。因此，抑制炎症反应，提高 HPDLCs 的功能特性对牙周组织的治疗有重要的作用。中药血清药理学是将中药或中药复方给动物灌服一定时间后通过采集血液、分离血清，以含药血清代替中药粗提物作为药物源加入离体反应系统中，从而研究

其药理作用的一种半体内实验方法^[5]。近年来，越来越多的专家应用该方法来研究中药的药理作用，以研究其在多种疾病治疗中的应用。金银花作为我国传统中药，一般以干燥花蕾或带初开的花入药，性寒，味甘，具有清热解毒、热病泻痢等作用，对外感风热、温病发热等有较好的治疗作用^[6]。金银花功能性成分丰富，目前从金银花中分离得到的功能性成分主要包括有机酸类 (绿原酸、咖啡酸、阿魏酸等)、黄酮类 (木犀草素、芦丁等)、三萜皂苷类 (忍冬苦苷等) 等，均有较强的抗菌抗炎的作用^[7]。但关于金银花对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 HPDLCs 活性相关研究目前较少，因此本文通过探讨金银花含药血清对 LPS 诱导 HPDLCs 活性及 NLRP3、IL-1 β 通路作用机制的研究，意在为临床金银花用于牙周疾病的治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

CP-ST50A/CP-ST100A/CP-ST200A 型二氧化碳

培养箱(长沙长锦科技有限公司);DYCZ-24DH型蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司);BX53型奥林巴斯型生物显微镜(日本Olympus公司);BriCyte E6型流式细胞仪(迈瑞医疗);KUBOTAKA-2200型离心机(北京东迅天地医疗仪器有限公司);SpectraMax iD3酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司)。

金银花(产地:山东平邑,批号:22864)由我院中药局采购,经山东医科大学中药系专家、主治医师周荣静鉴定,为灰毡毛忍冬 *Lonicera macreanthoides* Hand. -Mazz. 的干燥花蕾,样品中绿原酸含量符合2020版中国药典山银花项下规定;LPS(北京索莱宝科技有限公司,批号:L8880,纯度 $\geq 99\%$);生理盐水(湖南正清制药集团股份有限公司,批号:0803420);戊巴比妥钠(菏泽市立医院,批号:20150901);一抗兔抗鼠IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1多克隆抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号:3033、2859、2635);辣根过氧化酶标记的山羊抗兔IgG二抗(美国Jackson公司,批号:111-035-003);胎牛血清(上海江林生物科技,货号:04-001-1ACS);胰蛋白酶(上海今品化学技术有限公司,批号:9002-07-7);DEME培养基(北京义翘神州科技股份有限公司,货号:M293TH);MTT试剂盒(武汉时胜生物科技有限公司,货号:C0009);Transwell小室(北京明阳科华生物科技有限公司,批号:354480);DAB显色试剂盒(博士德生物工程有限公司,批号:AR1022)。

1.2 细胞

HPDLCs(上海弘顺生物科技有限公司,货号:GD-C9918621)。

1.3 动物

20只SD大鼠,雄性,月龄4~6个月,体重180~220 g,购自简阳达硕动物科技有限公司,动物许可证号:SCXK(京):2020-0076,每个笼内饲养5只大鼠,笼内自由活动,标准大鼠饲料喂食,自由饮食饮水,室内温度控制在20℃,相对湿度为60%左右,无死亡现象,适应环境7 d避免外界刺激,所有大鼠实验前均生长良好,按照《实验动物管理条例》规定开始进行实验,实验方案经我院动物伦理委员会批准(批准号:2023052)。

1.4 方法

1.4.1 药物提取

参考文献^[8]将金银花用10倍量的100℃蒸馏水提取3次,3 h/次,合并3次提取液,用纱布过滤,冷冻干燥即得。临用前用蒸馏水配制成金银花生药量25 g·kg⁻¹。

1.4.2 分组与含药血清的制备

20只大鼠按随机数字表法将其分为对照(CON,生理盐水)组和金银花组(5.0 g·kg⁻¹),每组10只。给药前对CON组大鼠血清进行采集作为空白血清;依据文献^[9]应用动物实验给药剂量换算公式“大鼠用药剂量(mg·kg⁻¹)=6.25×人用药剂量(mg·kg⁻¹)”换算,将金银花按照5.0 g·kg⁻¹给予金银花组大鼠进行灌胃,依据文献^[10]每日给药1次,共干预14 d。CON组以同体积生理盐水灌胃,于末次给药次日清晨以10%戊巴比妥钠40 mg·kg⁻¹腹腔注射麻醉后经大鼠腹腔主动脉取血3 mL,4℃条件下静置4 h,1 700×g离心30 min,保留血清,56℃水浴灭活,除菌过滤后,-20℃条件下密封冷藏备用,作为含药血清。

1.4.3 含药血清培养

取第3代HPDLCs,用2.5 g·L⁻¹胰蛋白酶消化后以每孔1×10⁶个细胞接种于6孔板,37℃条件下CO₂培养箱中培养,细胞贴壁后更新新鲜的无血清DEME培养基中继续培养。培养1 d后,弃上清,将HPDLCs分为5组:CON组(150 μL空白血清培养)、LPS组(10 μg·mL⁻¹ LPS+150 μL空白血清培养)、金银花低浓度(LCH,10 μg·mL⁻¹ LPS+75 μL空白血清+75 μL 5%金银花含药血清培养)、中浓度(MCH,10 μg·mL⁻¹ LPS+75 μL空白血清+75 μL 10%金银花含药血清培养)、高浓度(HCH,10 μg·mL⁻¹ LPS+75 μL空白血清+75 μL 20%金银花含药血清培养)组^[11]。

1.4.4 MTT检测HPDLCs细胞增殖率

将对数生长期的HPDLCs更换含有1%胎牛血清培养基进行同步消化。吸去原培养液,每个浓度6个复孔,每孔细胞数为1×10⁴个细胞,均加入5 mg·mL⁻¹的MTT溶液20 μL,培养24 h,然后吸弃培养液,再在每个孔中加入50 μL DMSO,摇匀后于酶标仪560 nm处测吸光度(A)值,并计算细胞增殖率。

1.4.5 Transwell小室检测HPDLCs细胞迁移

各组HPDLCs接种、数量、悬液制备同上,

小室加入 100 μL 细胞悬液, 将 Transwell 小室放入 24 孔板中, 下室加入含 30% FBS 的培养液 800 μL , 置于培养箱中孵育 12 h; 用 PBS 对 Transwell 小室连续清洗 2 次, 采用 4% 多聚甲醛在正常室温下固定 25 min, 然后用 0.4% 结晶紫染液染色, PBS 清洗, 去掉多余染料, 显微镜下观察拍照。棉签吸掉多余水分, 用 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 500 μL 溶解细胞 30 min。完全溶解后, 取 100 μL 细胞裂解液, 放入 96 孔板细胞培养板中, 570 nm 酶标仪测定 A 值。

1.4.6 流式细胞术检测 HPDLCs 细胞凋亡率

将各组 HPDLCs 密度为 1.2×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 0.25% 胰蛋白酶消化后, 加入无牛血清培养基过夜, 24 h 后, PBS 洗涤 1 次, 100 μL 接种于 5 mL 流式试管中, 5 μL 的 Annexin V 与 5 μL PI 混合后染色, 无光条件下孵育 15 min 后注入 400 μL 结合缓冲液混匀, 洗涤 3 次, 采用流式细胞仪检测 HPDLCs 细胞凋亡情况。

1.4.7 PCR 检测 HPDLCs 中 IL-1 β 、NLRP3 表达

将各组 HPDLCs 取出, 进行研磨, 用 Trizol 进行总 RNA 的提取, 逆转录参照说明书进行; 将逆转后所得的 cDNA 进行荧光反应实验, 内参采用 β -actin 引物, 所有反应严格按照反应的条件进行扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 1 min, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算其基因相对表达量, 平均值计算 Ct 值, 引物由上海生工合成, 引物序列见表 1。

1.4.8 Western blotting 法检测各组 HPDLCs 中 IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1 表达

将各组 HPDLCs 加入裂解液, 冰盒中裂解约 30 min, 期间每 10 min 振荡 1 次, 使其充分裂解, 1 200 \times g 离心 15 min, 吸取上清即为蛋白样品, 将蛋白样品与上样缓冲液按照 5:1 的比例混合, 煮沸 15 min, 配制 10%~15% 的 SDS-PAGE 分离胶和 5% 的浓缩胶, 上样量 400 mg (20 μL), 凝胶电泳分离蛋白后转移到 PVDF 膜上, 封闭液封闭 1 h, 一抗 IL-1 β (1:1 000)、NLRP3 (1:1 000)、Caspase-1 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 过夜, 洗涤 3 次, 每次 15 min; 室温摇床孵育二抗 (1:3 000) 1 h, 洗涤 3 次, 每次 15 min; ECL 显影, 以 GAPDH 作为内参, 计算 IL-1 β 、NLRP3 及 Caspase-1 相对表达量。

表1 引物序列

Table 1. Primer sequence

基因	方向	引物序列
IL-1 β	正向	5'-GAAATGATGGCTTATTACAGTGGC-3'
	反向	5'-TAGTGGTGGTCCGAGATTTCGTAG-3'
NLRP3	正向	5'-TGGTGACCCTCTGTGAGGT-3'
	反向	5'-TCTTCCTGGAGCGCTTCTAA-3'
β -actin	正向	5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3'
	反向	5'-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3'

1.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组完全随机设计资料的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验; 对符合正态分布且满足方差齐性的重复测量资料进行分析, 若满足 Mauchly's 球形假设检验则采用两因素方差分析; 若不满足球形假设时, 采用 Greenhouse-Geisser 方法校正。如果自变量之间不存在交互效应, 着重分析主效应; 如果自变量之间存在交互效应, 着重分析简单主效应, 并使用 Bonferroni 法进行多重比较。双侧检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 HPDLCs 细胞增殖率比较

与 CON 组比较, LPS 组 HPDLCs 细胞在 24, 48, 72 h 的细胞增殖率显著降低 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, 金银花各剂量组 HPDLCs 细胞增殖率显著升高 ($P < 0.05$); 金银花各剂量间细胞增殖率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中高剂量组的细胞增殖率升高最多。结果见表 2。

2.2 各组 HPDLCs 细胞迁移数量比较

与 CON 组比较, LPS 组 HPDLCs 迁移数量显著降低 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, 金银花各剂量组 HPDLCs 细胞迁移数量显著升高 ($P < 0.05$); 金银花各剂量间细胞迁移数量差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中高剂量组的细胞迁移数量最多。结果见图 1、图 2。

2.3 各组 HPDLCs 细胞凋亡率比较

与 CON 组比较, LPS 组 HPDLCs 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, 金银花各剂量组 HPDLCs 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 金银花各剂量间细胞凋亡率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中高剂量组的细胞调

表2 各组HPDLCs细胞增殖率(%, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2. Cell proliferation rate of HPDLCs in each group(%, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度(%)	24 h	48 h	72 h
CON组	-	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
LPS组	-	75.84 ± 2.25 ^a	70.76 ± 2.34 ^a	62.89 ± 2.16 ^a
LCH组	5	79.45 ± 3.14 ^{ab}	80.46 ± 2.34 ^{ab}	83.33 ± 2.61 ^{ab}
MCH组	10	83.79 ± 3.19 ^{abc}	88.49 ± 2.47 ^{abc}	90.49 ± 2.31 ^{abc}
HCH组	20	88.37 ± 3.46 ^{abcd}	91.44 ± 3.48 ^{abcd}	95.37 ± 1.58 ^{abcd}
组别效应		$F=80.920, P=0.001$		
时间效应		$F=0.149, P=0.326$		
交互效应		$F=8.442, P=0.001$		

注:与CON组比较,^a $P<0.05$;与LPS组比较,^b $P<0.05$;与LCH组比较,^c $P<0.05$;与MCH组比较,^d $P<0.05$

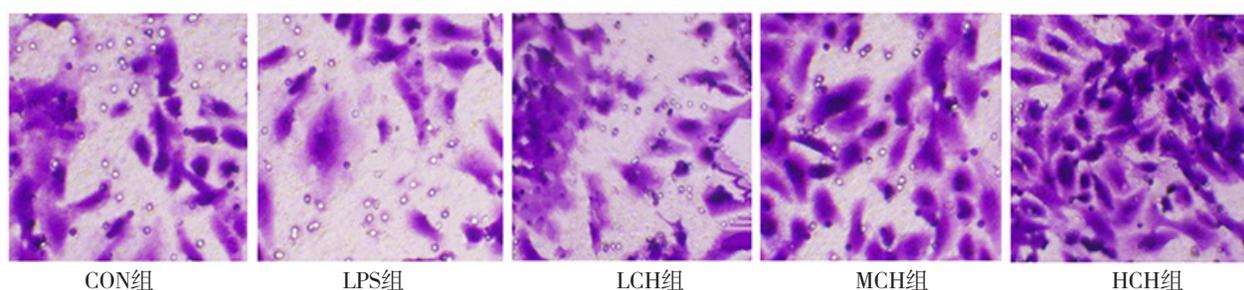


图1 各组HPDLCs细胞迁移显微图(400×)

Figure 1. HPDLCs cell migration micrograph of each group (400 ×)

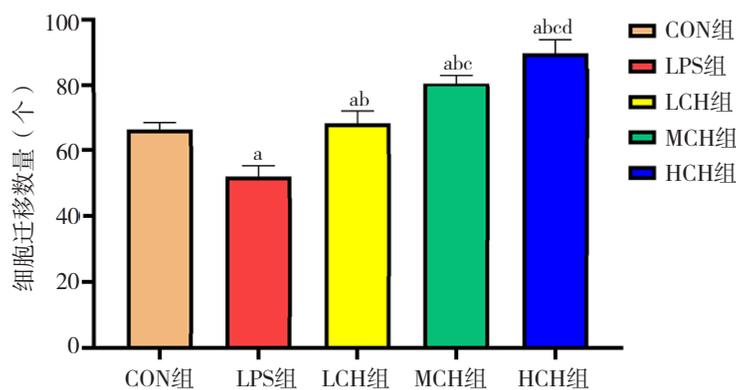


图2 各组HPDLCs迁移数量($n=6$)

Figure 2. HPDLCs migration in each group ($n=6$)

注:与HEA组比较,^a $P<0.05$;与LPS组比较,^b $P<0.05$;与LCH组比较,^c $P<0.05$;与MCH组比较,^d $P<0.05$

亡率下降最明显。结果见图3、图4。

2.4 各组HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3 mRNA的表达比较

与CON组比较,LPS组HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3 mRNA表达显著升高($P<0.05$);与LPS组比较,金银花各剂量组HPDLCs细胞中IL-1 β 、NLRP3 mRNA表达显著降低($P<0.05$);金银花各剂量间HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3 mRNA表达差异有统计学意义($P<0.05$),其中高剂量组IL-1 β 、NLRP3 mRNA表达下降最明显。结果见表3。

2.5 各组HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1的表达

与CON组比较,LPS组HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1蛋白表达显著升高($P<0.05$);与LPS组比较,金银花各剂量组HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1蛋白表达显著降低($P<0.05$);金银花各剂量间HPDLCs中IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1蛋白表达差异有统计学意义($P<0.05$),其中高剂量组IL-1 β 、NLRP3、Caspase-1的蛋白表达下降最明显。结果见图5和表4。

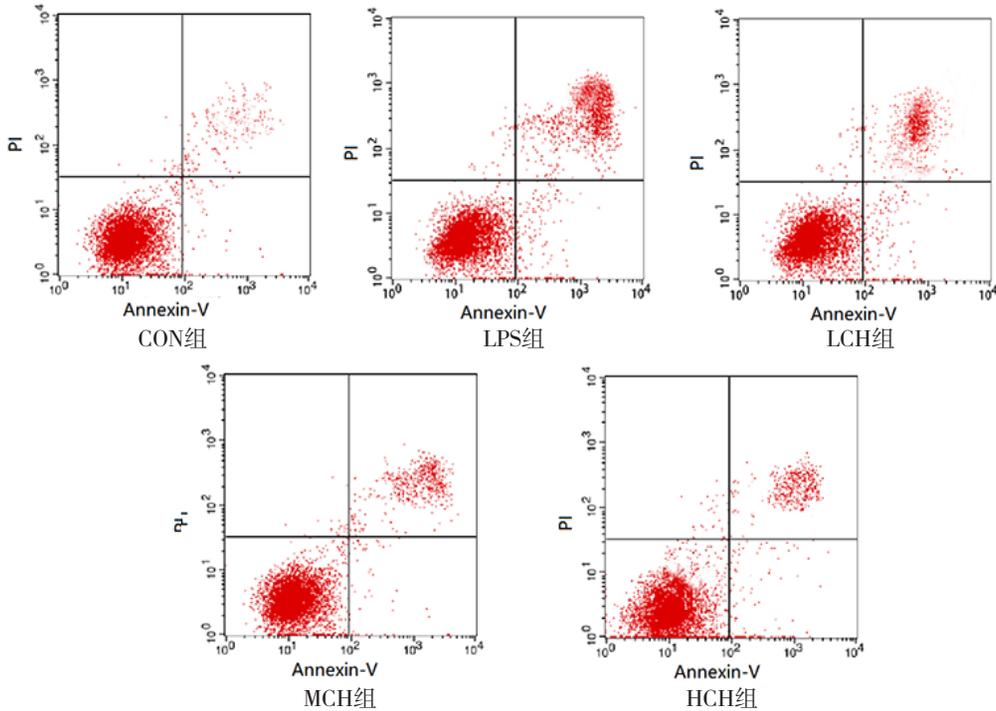


图3 流式细胞检测图
Figure 3. Flow cytometry

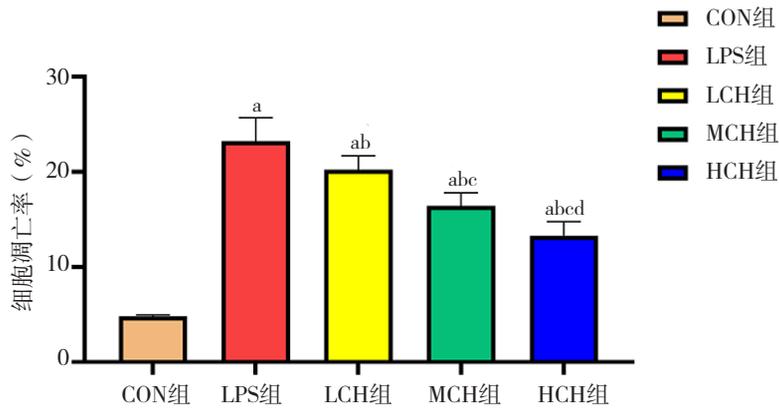


图4 各组HPDLCs细胞凋亡率比较 (n=6)

Figure 4. Comparison of apoptosis rate of HPDLCs in each group (n=6)

注: 与HEA组比较, ^aP<0.05; 与LPS组比较, ^bP<0.05; 与LCH组比较, ^cP<0.05; 与MCH组比较, ^dP<0.05

表3 各组HPDLCs中IL-1β、NLRP3 mRNA表达 (x̄ ± s, n=6)

Table 3. mRNA expression of IL-1β and NLRP3 in HPDLCs of each group (x̄ ± s, n=6)

组别	浓度 (%)	IL-1β mRNA	NLRP3 mRNA
CON组	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
LPS组	-	1.73 ± 0.16 ^a	1.75 ± 0.13 ^a
LCH组	5	1.56 ± 0.07 ^{ab}	1.68 ± 0.09 ^{ab}
MCH组	10	1.23 ± 0.06 ^{abc}	1.21 ± 0.04 ^{abc}
HCH组	20	0.78 ± 0.09 ^{abcd}	0.84 ± 0.07 ^{abcd}
	F	108.400	156.300
	P	<0.001	<0.001

注: 与CON组比较, ^aP<0.05; 与LPS组比较, ^bP<0.05; 与LCH组比较, ^cP<0.05; 与MCH组比较, ^dP<0.05

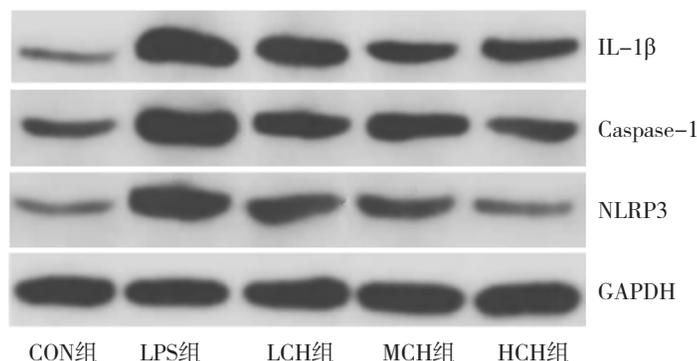


图5 IL-1β、NLRP3、Caspase-1蛋白表达条带图

Figure 5. Expression bands of IL-1β, NLRP3 and Caspase-1 proteins

表4 各组HPDLCs中IL-1β、NLRP3、Caspase-1蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4. Expressions of IL-1β, NLRP3 and Caspase-1 in HPDLCs of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度 (%)	IL-1β	NLRP3	Caspase-1
CON组	-	0.56 ± 0.11	0.36 ± 0.06	0.41 ± 0.07
LPS组	-	1.14 ± 0.13 ^a	0.78 ± 0.04 ^a	0.98 ± 0.11 ^a
LCH组	5	0.94 ± 0.16 ^{ab}	0.65 ± 0.02 ^{ab}	0.82 ± 0.04 ^{ab}
MCH组	10	0.82 ± 0.11 ^{abc}	0.51 ± 0.03 ^{abc}	0.63 ± 0.07 ^{abc}
HCH组	20	0.60 ± 0.10 ^{abcd}	0.41 ± 0.04 ^{abcd}	0.52 ± 0.06 ^{abcd}
<i>F</i>		22.730	111.000	8.260
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

注：与CON组比较，^a*P*<0.05；与LPS组比较，^b*P*<0.05；与LCH组比较，^c*P*<0.05；与MCH组比较，^d*P*<0.05

3 讨论

近年来，金银花在疾病中的治疗效果越来越被国内外学者所肯定，有学者在进行急性胰腺炎肺损伤大鼠的研究中发现，经金银花的干预治疗后，大鼠肺组织中的IL-1β、IL-18的表达水平显著降低，并肯定了其抗炎功效^[12]。HPDLCs经过LPS刺激后NLRP3/IL-1β信号通路被激活，并可能通过NLRP3炎性小体介导的炎症反应加快细胞凋亡来参与牙周炎的发生发展。国外学者^[13]研究发现，LPS是革兰阴性厌氧菌代谢产物的主要成分，可通过破坏牙龈结合上皮进入牙周组织，与HPDLCs中的磷脂相互作用进而破坏细胞膜结构，影响细胞增殖分裂并加重局部炎症反应。本研究中，经金银花干预后HPDLCs中IL-1β、NLRP3、Caspase-1显著降低，表明金银花对抑制NLRP3/IL-1β通路的表达具有一定影响。在牙周炎中，IL-1β作为炎症调节的始动因素和调节剂，能刺激干细胞生长因子的释放，激活一系列信号分子，使上皮细胞根向增殖并形成牙周袋从而破坏

牙周组织^[14]。经研究，NLRP3炎性小体激活后炎症反应和细胞凋亡过程均会发生相应变化^[15]。在牙周组织损伤中，NLRP3炎性小体激活所造成的Caspase-1大量活化能够使炎症细胞因子IL-1β、IL-18的前体裂解液变为有活性的成熟体，并通过IL-1β、IL-18促炎的生物活性来招募多种炎症细胞从而对牙周组织产生影响。王芳等^[16]研究发现，金银花中的绿原酸、咖啡酸等多种酚酸类化合物对LPS诱导的肝损伤小鼠、巨噬细胞释放的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和IL-1β等炎症因子均具有不同程度的抑制作用。木犀草素是金银花主要成分之一，李苑荟等^[17]通过建立牙周炎大鼠模型进行研究发现，经过木犀草素干预后大鼠牙周组织中的NLRP3、IL-1β的表达水平明显下降，说明木犀草素可以抑制NLRP3/IL-1β信号通路，进而改善牙周组织的炎症。本研究结果与之类似。由此推测，金银花也可通过调控NLRP3/IL-1β信号通路，抑制牙周膜细胞的炎性表达。

细胞增殖是细胞生物学特性的重要体现，通过细胞增殖可促进组织的再生修复与改建^[18]。经

研究,牙周膜细胞通过分化、增殖不仅可维持牙周组织的正常代谢,同时也能修复缺损的牙周组织,维持牙周健康平衡。细胞凋亡属于基本的细胞生物学现象,是由一系列酶参与并由基因所控制的高度有序的细胞死亡过程^[19]。本研究结果显示,经过金银花含药血清干预后,发现金银花对促进 HPDLCs 细胞增殖、迁移及抑制 HPDLCs 细胞凋亡具有一定影响。现代药理学研究发现,金银花除了具有解热抗炎、抗菌作用之外,成分中的绿原酸类物质还可以有效清除自由基及抗氧化作用,并可通过抑制活性氧簇产生和 Caspase-1 的凋亡途径激活,进而保护心肌细胞免受损伤、抗心肌细胞的凋亡^[20]。针对中药及其复方化学成分多样化的特点,用含药血清代替煎剂或粗提物进行体外实验,克服了中药粗制剂直接进行体外实验的缺点,其结果的可信度明显优于中药粗制剂直接用于体外实验。未来可以研究金银花含药血清对 HPDLCs 等信号通路的影响,及在调节细胞分化、增殖和凋亡的过程中的作用。并根据金银花的药理特性,研发相关治疗药物,在调节各方面机能的同时实现减少抗菌药物的使用,达到未病先防、中西结合,为人类提供更为安全有价值的治疗成果。

综上所述,金银花可在一定程度上降低 LPS 诱导的 HPDLCs 凋亡,并促进 HPDLCs 的增殖和迁移,其机制可能与调控 NLRP3、IL-1 β 及 Caspase-1 相关。由于现阶段对于金银花含药血清对牙周膜细胞活性的参考研究较少,且本次实验经费有限、研究样本量较少,本次研究仍存在一定不足,日后将不断完善和丰富实验内容。

参考文献

- Kim WJ, Park SY, Kim OS, et al. Autophagy upregulates inflammatory cytokines in gingival tissue of patient with periodontitis and lipopolysaccharide-stimulated human gingival fibroblasts[J]. *J Periodontol*, 2022, 93(3): 380-391. DOI: 10.1002/JPER.21-0178.
- Duan X, Lin Z, Lin X, et al. Study of platelet-rich fibrin combined with rat periodontal ligament stem cells in periodontal tissue regeneration[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2): 1047-1055. DOI: 10.1111/jcmm.13461.
- Li H, Zhong X, Li W, et al. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on experimental periodontitis and AhR/NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway in a mouse model[J]. *J Appl Oral Sci*, 2019, 27: e20180713. DOI: 10.1590/1678-7757-2018-0713.
- 张杨,王垭铮,费栋栋,等. 炎性牙周膜干细胞通过调控巨噬细胞内质网应激介导白介素-1 β 分泌的研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2021, 56(4): 329-334. [Zhang Y, Wang, YZ, Fei DD, et al. Inflammatory periodontal stem cells mediate interleukin-1 β secretion of macrophage by regulating macrophage endoplasmic reticulum stress[J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 2021, 56(4): 329-334.] DOI: 10.3760/cma.j.cn112144-20201105-00553.
- Chen Q, Huang L, Wang R, et al. Research status of serum pharmacology and serum pharmacochimistry of traditional Chinese medicine[J]. *Agricultural Biotechnology*, 2021, 10(1): 3. DOI: 11.231/1585-6523-2020-1001.
- 崔艳,徐红梅. 金银花的药理作用研究综述[J]. *科学技术创新*, 2018, 1(2): 20-21. [Cui Y, Xu HM. A review of pharmacological studies on honeysuckle[J]. *Scientific and Technological Innovation*, 2018, 1(2): 20-21.] DOI: 10.3969/j.issn.1673-1328.2018.02.011.
- 朱文卿,任汉书,郑媛媛,等. 金银花的功能性成分及其生物活性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 412-426. [Zhu WQ, Ren HS, Zheng YY, et al. Research progress in functional components and bioactivity of honeysuckle[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(13): 412-426.] DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020070411.
- 崔晓燕. 金银花提取物含药血清对正常及 LPS 刺激的大鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 的影响[J]. *河北医科大学学报*, 2008, 29(6): 861-864. [Cui XY. Effect of serum of *louicera japonica* thumb on release of no from normal and lps induced peritoneal macrophages[J]. *Journal of Hebei Medical University*, 2008, 29(6): 861-864.] DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2008.06.018.
- 王露洁. 阿托伐他汀钙对消渴病糖代谢的保护作用[D]. 济南: 山东中医药大学, 2019.
- 徐梅,牛玉明,梁守建,等. 大黄素对慢性牙周炎模型大鼠牙周膜细胞生物学特性的影响[J]. *实用口腔医学杂志*, 2019, 35(6): 790-793. [Xu M, Niu YM, Liang SJ, et al. The effects of emodin on the biological characteristics of periodontal ligament cells in rats with chronic periodontitis[J]. *Journal of Practical Stomatology*, 2019, 35(6): 790-793.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-3733.2019.06.004.

- 11 叶玲伟, 张兆高, 应于康, 等. 芍药苷对脂多糖诱导的人牙周膜细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国药师, 2019, 22(4): 625–628. [Ye LW, Zhang ZG, Ying YK, et al. Protective effect and mechanism of paeoniflorin in lipopolysaccharide-induced injury of human periodontal ligament cells[J]. China Pharmacist, 2019, 22(4): 625–628.] DOI: 10.3969/j.issn.1008–049X.2019.04.008.
- 12 阮辉辉, 卫巍, 许永富. 金银花提取物对重症急性胰腺炎肺损伤大鼠 ROS–NLRP3 炎症小体信号通路的影响 [J]. 中国中医急症, 2019, 28(8): 1344–1348, 1353. [Ruan HH, Wei W, Xu YF. Effects of honeysuckle extract on rROS–NLRP3 inflammatory body signaling pathway in lung injury of severe acute pancreatitis rats[J]. Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine, 2019, 28(8): 1344–1348, 1353.] DOI: 10.3969/j.issn.1004–745X.2019.08.008.
- 13 Zhang J, Dong X, Yan Q, et al. Galectin–1 inhibited LPS–induced autophagy and apoptosis of human periodontal ligament stem cells[J]. Inflammation, 2021, 44(4): 1302–1314. DOI: 10.1007/s10753–021–01417–y.
- 14 Aleksandrowicz P, Brzezińska–Baszczyk E, Kozowska E, et al. Analysis of IL–1 β , CXCL8, and TNF– α levels in the crevicular fluid of patients with periodontitis or healthy implants[J]. BMC Oral Health, 2021, 21(1): 120. DOI: 10.1186/s12903–021–01478–3.
- 15 饶小波, 胡萍. 牙周炎组织中 NLRP3 炎症小体及牙槽骨吸收相关细胞因子的表达量变化 [J]. 现代医学, 2021, 49(12): 1418–1421. [Rao XB, Hu P. Expression of NLRP3 inflammatory bodies and cytokines related to alveolar bone resorption in periodontitis[J]. Modern Medical Journal, 2021, 49(12): 1418–1421.] DOI: 10.3969/j.issn.1671–7562.2021.12.009.
- 16 王芳, 黄超培, 李彬, 等. 复方蜂胶金银花提取物对炎症大鼠和小鼠的抗炎作用 [J]. 广西医学, 2018, 40(16): 1833–1836. [Wang F, Huang CP, Li B, et al. Anti-inflammatory effects of compound formula propolis and *Lonicera japonica* Thunb. extract on inflammatory rats and mice[J]. Guangxi Medical Journal, 2018, 40(16): 1833–1836.] DOI: 10.11675/j.issn.0253–4304.2018.16.17.
- 17 李苑荟, 邢孔才, 王怡婷, 等. 木犀草素对牙周炎大鼠 NLRP3/IL–1 β 信号通路及骨改建的影响 [J]. 口腔医学研究, 2020, 36(12): 1117–1122. [Li YH, Xing KC, Wang YT, et al. Effects of luteolin on nlrp3/il–1 β signal pathway and bone remodeling in periodontitis rats[J]. Journal of Oral Science Research, 2020, 36(12): 1117–1122.] DOI: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2020.12.009.
- 18 Lv PY, Gao PF, Tian GJ, et al. Osteocyte–derived exosomes induced by mechanical strain promote human periodontal ligament stem cell proliferation and osteogenic differentiation via the miR–181b–5p/PTEN/AKT signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 295. DOI: 10.1186/s13287–020–01815–3.
- 19 Peng Z, Liu L, Zhang W, et al. Pluripotency of dental pulp cells and periodontal ligament cells was enhanced through cell–cell communication via STAT3/Oct–4/Sox2 signaling[J]. Stem Cells Int, 2021: 8898506. DOI: 10.1155/2021/8898506.
- 20 Feng J, Chang X, Zhang Y, et al. Characterization of a polysaccharide HP–02 from Honeysuckle flowers and its immunoregulatory and anti–*Aeromonas hydrophila* effects in *Cyprinus carpio* L[J]. Int J Biol Macromol, 2019, 140: 477–483. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.08.041.

收稿日期: 2022 年 03 月 29 日 修回日期: 2023 年 02 月 24 日
本文编辑: 钟巧妮 周璐敏