黄芩苷对脂多糖诱导的人牙周膜干细胞增殖、迁移作用及机制Δ

王　桥[1*]，冯　博[2]，高永志[3]（1.齐齐哈尔医学院附属第二医院口腔科，黑龙江 齐齐哈尔　161006；2.齐齐哈尔市五官医院口腔科，黑龙江 齐齐哈尔　161006；3.齐齐哈尔医学院附属第一医院口腔科，黑龙江 齐齐哈尔　161041）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）10-1216-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.10.12

摘　要　目的　探究黄芩苷对脂多糖（LPS）诱导的人牙周膜干细胞（hPDLSCs）增殖、迁移及Janus蛋白酪氨酸激酶2（JAK2）/信号转导和转录激活因子3（STAT3）信号通路的调控作用。**方法**　将hPDLSCs分为对照组、LPS组、黄芩苷不同浓度（0.1、1、10 mg/L）组，采用ELISA法和CCK-8法测定细胞炎症因子[白细胞介素6（IL-6）、IL-1β和肿瘤坏死因子α（TNF-α）]含量和细胞活力，以筛选最适黄芩苷浓度并进行后续通路验证实验。随后将细胞分为对照组、LPS组、最适黄芩苷浓度组、抑制剂组（10 μg/mL LPS+1 mg/L黄芩苷+3 μmol/L JAK2/STAT3通路抑制剂AG490），干预24 h后检测hPDLSCs增殖率、凋亡率、迁移率、侵袭细胞数、细胞周期素D1（Cyclin D1）、胱天蛋白酶3（caspase-3）mRNA和蛋白表达及JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达。**结果**　根据细胞炎症因子含量和细胞活力结果选择1 mg/L为黄芩苷最适浓度。与对照组比较，LPS组细胞增殖率、迁移率、侵袭细胞数、Cyclin D1 mRNA及蛋白表达水平显著降低，细胞凋亡率、caspase-3 mRNA及蛋白表达、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；经1 mg/L黄芩苷干预后，上述指标均得到显著改善（$P<0.05$）；而抑制剂组上述指标的改善程度更加显著（$P<0.05$）。**结论**　黄芩苷可通过抑制JAK2/STAT3信号通路来促进LPS诱导的hPDLSCs增殖、迁移和侵袭，抑制其凋亡及炎症反应。

关键词　牙周炎；黄芩苷；牙周膜干细胞；Janus蛋白酪氨酸激酶2/信号转导和转录激活因子3信号通路；增殖；迁移

Effect and mechanism of baicalin on the proliferation and migration of human periodontal ligament stem cells induced by lipopolysaccharide

WANG Qiao[1], FENG Bo[2], GAO Yongzhi[3]（1. Dept. of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. Dept. of Stomatology, Qiqihar Wuguan Hospital, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 3. Dept. of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161041, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the regulatory effects of baicalin on the proliferation and migration of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) induced by lipopolysaccharide (LPS) and Janus protein tyrosine kinase 2 (JAK2)/signal transduction and transcription activator 3 (STAT3) signaling pathways. **METHODS** hPDLSCs were divided into control group, LPS group, different concentration baicalin groups (0.1, 1 and 10 mg/L). ELISA method and CCK-8 assay were used to determine the contents of cell inflammatory factors [interleukin 6 (IL-6), IL-1β and tumor necrosis factor-α (TNF-α)] and cell viability, so as to screen the optimal concentration of baicalin for follow-up pathway validation experiments. The cells were then divided into control group, LPS group, optimal baicalin concentration group and inhibitor group (10 μg/mL LPS+1 mg/L baicalin +3 μmol/L JAK2/STAT3 pathway inhibitor AG490). After treated for 24 h, the proliferation rate of hPDLSCs, apoptosis rate, migration rate, invasion cell number, mRNA and protein expressions of Cyclin D1 and caspase-3, the expression of JAK2/STAT3 pathway-related proteins were all detected. **RESULTS** According to cell inflammatory factors and cell viability, 1 mg/L was selected as the optimal concentration of baicalin. Compared with control group, cell proliferation rate, migration rate, invasion cell number, Cyclin D1 mRNA and protein expression were significantly decreased in LPS group, while cell apoptosis rate, caspase-3 mRNA and protein expression, p-JAK2 and p-STAT3 protein expression were significantly increased ($P<0.05$). After treated with 1 mg/L baicalin, the above indexes were reversed significantly ($P<0.05$). The improvement of above indexes in the inhibitor group was more obvious ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Baicalin can promote the proliferation, migration and invasion of LPS-induced hPDLSCs and inhibit their apoptosis and inflammation by blocking the JAK2/STAT3 pathway.

KEYWORDS　periodontitis; baicalin; periodontal ligament stem cells; Janus protein tyrosine kinase 2/signal transduction and transcription activator 3 signaling pathway; proliferation; migration

Δ **基金项目**　黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目（No.2021-KYYWF-0374）

＊ **第一作者**　副主任医师。研究方向：口腔修复、口腔正畸。E-mail：wangqiao090115@163.com

牙周组织由牙骨质、牙槽内衬骨、面向牙齿的牙龈和牙周韧带组成，牙周炎会引起牙周组织被破坏，是导致成人牙齿脱落的重要原因[1]。传统的牙周炎治疗方法，如刮治、根面平整及手术治疗通常只是姑息性的[2]，治疗效果不理想。因此，了解牙周炎的发病机制并及时干预对治疗牙周炎具有重要作用。牙周膜干细胞是一种体细胞干细胞，具有分化为多种细胞类型及自我更新的潜力，被认为是非常有前景的用于牙周组织再生治疗的干细胞群[3]，对牙周炎的治疗具有重要作用。

现代研究表明，中药可通过消除致病因素、阻止病情发展和提高机体防御能力来发挥对牙周炎的治疗作用[4]。黄芩苷是从中药黄芩的根中提取分离得到的黄酮类化合物，具有抑菌、抗炎、抗肿瘤等药理作用，Chanaj-Kaczmarek等[5]认为黄芩苷可以治疗牙周炎，但抗炎的作用机制尚不明确。Janus蛋白酪氨酸激酶2（Janus protein tyrosine kinase 2，JAK2）/信号转导和转录激活因子3（signal transduction and transcription activator 3，STAT3）信号通路可以参与细胞免疫、增殖分化、凋亡以及炎症反应等多种病理过程[6]，且STAT3信号通路与牙周组织炎症反应过程密切相关[7]，但黄芩苷是否可以通过调控JAK2/STAT3信号通路来影响人牙周膜干细胞（human periodontal ligament stem cells，hPDLSCs）的生物学行为尚不清楚。基于此，本研究利用脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导hPDLSCs建立牙周炎细胞模型，探讨黄芩苷对其炎症因子、增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响，以及对JAK2/STAT3信号通路的调控机制，旨在为牙周炎的治疗提供新的理论参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有DXS_3型倒置荧光显微镜（上海缔伦光学仪器有限公司），H4-20kr型低温高速离心机24孔板转子（湖南可成仪器设备有限公司），Multiskan FC型酶标仪、NanoDrop one型超微量分光光度计（美国Thermo Fisher Scientific公司），A200型聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）仪（杭州朗基科学仪器有限公司），OI1000型全自动凝胶成像系统（广州光仪生物科技有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

黄芩苷对照品（纯度≥98%）、LPS（纯度≥98%）、JAK2/STAT3通路抑制剂AG490（纯度≥99%）均购自上海源叶生物科技有限公司；胎牛血清、DMEM培养基均购自美国Gibco公司；RIPA裂解液购自美国ABW公司；CCK-8细胞计数试剂盒（批号C6205060）、逆转录试剂盒（批号H2017011）、SYBR Premix Ex Taq Ⅱ试剂盒（批号H4001330）均购自上海翊圣生物科技有限公司；5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷（5-ethynyl-2′-deoxyuridine，EdU）细胞增殖检测试剂盒（批号092321220429）购自上海碧云天生物技术有限公司；Hoechst 33258染色试剂盒（批号20220304）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；0.1%结晶紫水溶液、青-链霉素（100×）均购自北京索莱宝科技有限公司；白细胞介素6（interleukin 6，IL-6）、IL-1β和肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）ELISA试剂盒（批号分别为Feb2022、Mar2022、Mar2022）均购自泉州市睿信生物科技有限公司；鼠抗人JAK2单克隆抗体、磷酸化STAT3（p-STAT3）单克隆抗体（批号分别为B2973、B3403）均购自美国Santa Cruz公司；鼠抗人STAT3单克隆抗体（批号GR3411913-1）购自北京中杉金桥生物技术有限公司；兔抗人磷酸化JAK2（p-JAK2）多克隆抗体（批号M2282997）购自沈阳万类生物科技有限公司；鼠抗人细胞周期素D1（Cyclin D1）单克隆抗体、胱天蛋白酶3（caspase-3）单克隆抗体、β-actin单克隆抗体及山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG二抗（批号分别为10016419、10021291、10021787、20000425、20000509）均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 细胞

hPDLSCs购自赛百慷（上海）生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 hPDLSCs的培养

取hPDLSCs接种于含10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM培养基中，于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，每隔2～3 d更换一次培养基，待细胞贴壁达80%以上进行细胞传代，取对数生长期hPDLSCs用于后续实验。

2.2 细胞分组与给药

取对数生长期的hPDLSCs，分为对照组、LPS组、黄芩苷不同浓度（0.1、1、10 mg/L）组。对照组不做干预，LPS组以10 μg/mL LPS刺激24 h以构建体外炎症模型[8]，黄芩苷不同浓度（0.1、1、10 mg/L）组在LPS组的基础上加入0.1、1和10 mg/L黄芩苷[9]，采用ELISA法和CCK-8法对炎症因子含量和细胞活力进行分析，以筛选最适黄芩苷浓度（作为最适黄芩苷浓度组）进行后续通路验证实验。随后将细胞分为对照组、LPS组、最适黄芩苷浓度组、抑制剂组（抑制剂组在LPS组的基础上加入最适浓度黄芩苷和3 μmol/L JAK2/STAT3通路抑制剂AG490[10]），各组设3个复孔，于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h。

2.3 指标的测定

2.3.1 炎症因子含量 采用ELISA法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于96孔板中，按“2.2”项下方法分组与给药，于37 ℃、5%CO_2培养24 h后，收集各组细胞上清液，按ELISA法测定对照组、LPS组、黄芩苷不同浓度（0.1、1、10 mg/L）组细胞中IL-6、IL-1β和TNF-α的含量，严格按照试剂盒说明书步骤操作。

2.3.2　细胞活力　采用CCK-8法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于96孔板中，按“2.2”项下方法分组，另设空白组（只含培养基，无细胞），各组设3个复孔。对照组、LPS组、黄芩苷不同浓度（0.1、1、10 mg/L）组按“2.2”项下方法给药后[上述实验组根据干预时间又分为24 h和48 h]，加入CCK-8溶液10 μL，继续孵育2 h。使用酶标仪于450 nm波长处测定各组光密度（optical density，OD）值，细胞活力（%）=（实验组OD值－空白组OD值）/（对照组OD值－空白组OD值）×100%。实验重复3次。

2.3.3　细胞增殖率　采用EdU法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于12孔板中，按“2.2”项下方法进行分组与给药，各组细胞干预24 h（依据“2.3.2”项下结果设置，下同）后，采用EdU处理，去除培养液，加入4%多聚甲醛溶液0.5 mL，固定细胞15 min，用0.5 mL 3%胎牛血清洗涤3次；用0.5 mL 0.3%TritonX-100去除胎牛血清，室温孵育10 min，再用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤3次；12孔板中每孔加入Click反应液200 μL（现配现用），室温避光孵育30 min，洗涤3次去除Click反应液；加入Hoechst 33258染色液孵育10 min；再洗涤3次后装片，置于倒置荧光显微镜下拍照，用Image J软件处理图片，以EdU阳性细胞（红色）占总细胞（蓝色）的百分比表示细胞增殖率。

2.3.4　细胞凋亡率　采用Hoechst 33258染色法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于24孔板中，按“2.2”项下方法进行分组与给药，各组细胞干预24 h后，用PBS洗涤2次（5 min/次）后，加入新鲜配制的4%多聚甲醛溶液于4 ℃下固定10 min，然后用PBS洗涤3次去除固定液；Hoechst 33258染色液（5 mg/L）染色10 min，最后用ddH_2O洗涤3次；晾干、封固，置于倒置荧光显微镜下观察并拍照，采用Image J软件计算细胞凋亡率：细胞凋亡率（%）=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

2.3.5　细胞迁移率　采用划痕实验进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于6孔板，按“2.2”项下方法进行分组与给药，待细胞密度达到90%后，采用20 μL移液器枪头进行划痕，置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h。置于倒置荧光显微镜下拍照记录0、24 h时的划痕情况，划痕面积分别记为S_0与S_{24}，细胞迁移率（%）=（S_0-S_{24}）/S_0×100%。

2.3.6　细胞侵袭能力　采用Transwell小室法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于24孔板中，按“2.2”项下方法进行分组与给药。取－20 ℃保存的基质胶于4 ℃下过夜融化，用不含胎牛血清的培养基稀释基质胶浓度至1 mg/mL。每小室加入基质胶稀释液100 μL，置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养5 h，使其呈干胶状。将Transwell小室放入24孔板中，在Transwell小室的上室中，每孔加入不含胎牛血清的细胞悬液（1×10^6个/mL）300 μL，下室加入含有10%胎牛血清的培养基600 μL，继续培养24 h后，取出Transwell小室，弃去上清液，棉签擦去小室薄膜上层细胞，用PBS清洗后，以4%甲醇固定30 min。晾干后，用0.1%结晶紫水溶液染色10 min，PBS清洗3次。置于倒置荧光显微镜下拍照，每孔随机选取5个不同区域，采用Image J软件计算侵袭细胞数。

2.3.7　Cyclin D1和caspase-3 mRNA的相对表达量　采用实时荧光定量PCR（real-time fluorescence quantitative PCR，RT-qPCR）法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于6孔板中，按“2.2”项下方法进行分组与给药，取干预24 h时对照组、LPS组、最适黄芩苷浓度组、抑制剂组的hPDLSCs，按RNA抽提试剂盒进行操作，提取细胞样本总RNA，采用超微量分光光度计检测RNA的浓度及纯度，反转录合成模板链cDNA，取反转录产物2 μL作为模板，用SYBR Premix EX Taq Ⅱ试剂盒进行RT-qPCR检测。每个样品重复5次。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因的相对表达量。各目的基因引物由生工生物工程（上海）股份有限公司设计并合成，具体序列及产物长度见表1。

表1　目的基因引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度/bp
GAPDH	正向引物：5′-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3′	121
	反向引物：5′-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3′	
Cyclin D1	正向引物：5′-TCTACACCGACAACTCCATCC-3′	129
	反向引物：5′-GCATTTTGGAGAGGAAGTGTTC-3′	
caspase-3	正向引物：5′-TTTTTCAGAGGGGATCGTTG-3′	151
	反向引物：5′-CGGCCTCCACTGGTATTTTA-3′	

2.3.8　JAK2/STAT3信号通路相关蛋白、Cyclin D1和caspase-3蛋白的相对表达量　采用Western blot法进行测定。将对数生长期hPDLSCs接种于6孔板，按“2.2”项下方法进行分组与给药，干预24 h后，收集各组细胞，于RIPA裂解液冰上裂解，于4 ℃下以12 000 r/min离心20 min。取上清进行蛋白变性后，用凝胶电泳分离目的蛋白，300 mA恒流转膜，5%脱脂牛奶封闭2 h，然后加入一定稀释比例的一抗[JAK2（稀释比例为1∶800）、STAT3（稀释比例为1∶5 000）、p-JAK2（稀释比例为1∶500）、p-STAT3（稀释比例为1∶500）、Cyclin D1（稀释比例为1∶8 000）、caspase-3（稀释比例为1∶2 000）及β-actin（稀释比例为1∶5 000）]，于4 ℃孵育过夜，TBST洗涤3次，加入二抗（稀释比例为1∶2 000）孵育2 h，弃去液体，再用TBST洗涤3次，最后加显影液，使用全自动凝胶成像系统拍照记录。采用Image J软件分析蛋白灰度值，目的蛋白相对表达量＝目的蛋白的蛋白灰度值/内参蛋白（β-actin）的蛋白灰度值。

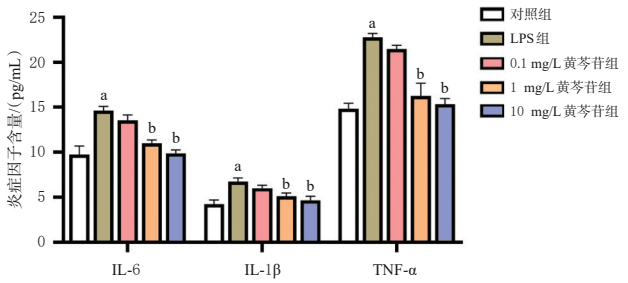
2.4　统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用*Tukey*检验。检验水准α=0.05。

3 结果

3.1 黄芩苷对各组细胞炎症因子含量的影响

与对照组比较，LPS组细胞中IL-6、IL-1β和TNF-α含量均显著升高（$P<0.05$）；与LPS组比较，1、10 mg/L黄芩苷组细胞中IL-6、IL-1β和TNF-α含量均显著降低（$P<0.05$）。结果见图1。

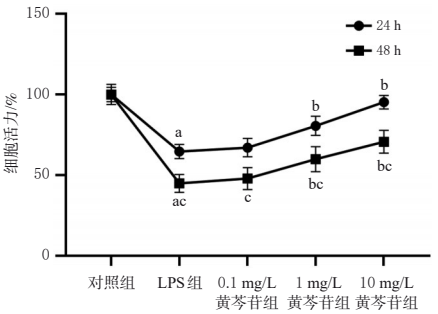


a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$

图1 黄芩苷对各组细胞炎症因子含量的影响

3.2 黄芩苷对各组细胞活力的影响

干预24 h和48 h时，与对照组比较，LPS组细胞活力均显著降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，0.1、1和10 mg/L黄芩苷组细胞活力均升高，其中1、10 mg/L黄芩苷组差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与干预24 h比较，干预48 h时LPS组和0.1、1和10 mg/L黄芩苷组细胞活力均显著降低（$P<0.05$）。因干预48 h时LPS组细胞活力低于50%，为排除细胞活力对后续实验的影响，同时结合“3.1”项下结果，故选择1 mg/L黄芩苷组进行后续实验。结果见图2。



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与干预24 h比较，$P<0.05$

图2 黄芩苷对各组细胞活力的影响

3.3 黄芩苷对各组细胞增殖率的影响

干预24 h后，LPS组EdU阳性细胞数较对照组减少，1 mg/L黄芩苷组和抑制剂组EdU阳性细胞数较LPS组增加（图3）。与对照组比较，LPS组细胞增殖率显著降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，1 mg/L黄芩苷组细胞增殖率显著升高（$P<0.05$）；与1 mg/L黄芩苷组比较，抑制剂组细胞增殖率显著升高（$P<0.05$），结果见图4A。

3.4 黄芩苷对各组细胞凋亡率的影响

经过Hoechst 33258染色发现，对照组细胞形态清晰，细胞核为弥散均匀的淡蓝色；其余各组细胞核有不均匀浓染，且所发荧光较强，呈亮蓝色等典型细胞凋亡特征（图5）。与对照组比较，LPS组细胞凋亡率显著升高（$P<0.05$）；与LPS组比较，1 mg/L黄芩苷组细胞凋亡率显著降低（$P<0.05$）；与1 mg/L黄芩苷组比较，抑制剂组细胞凋亡率显著降低（$P<0.05$），结果见图4B。

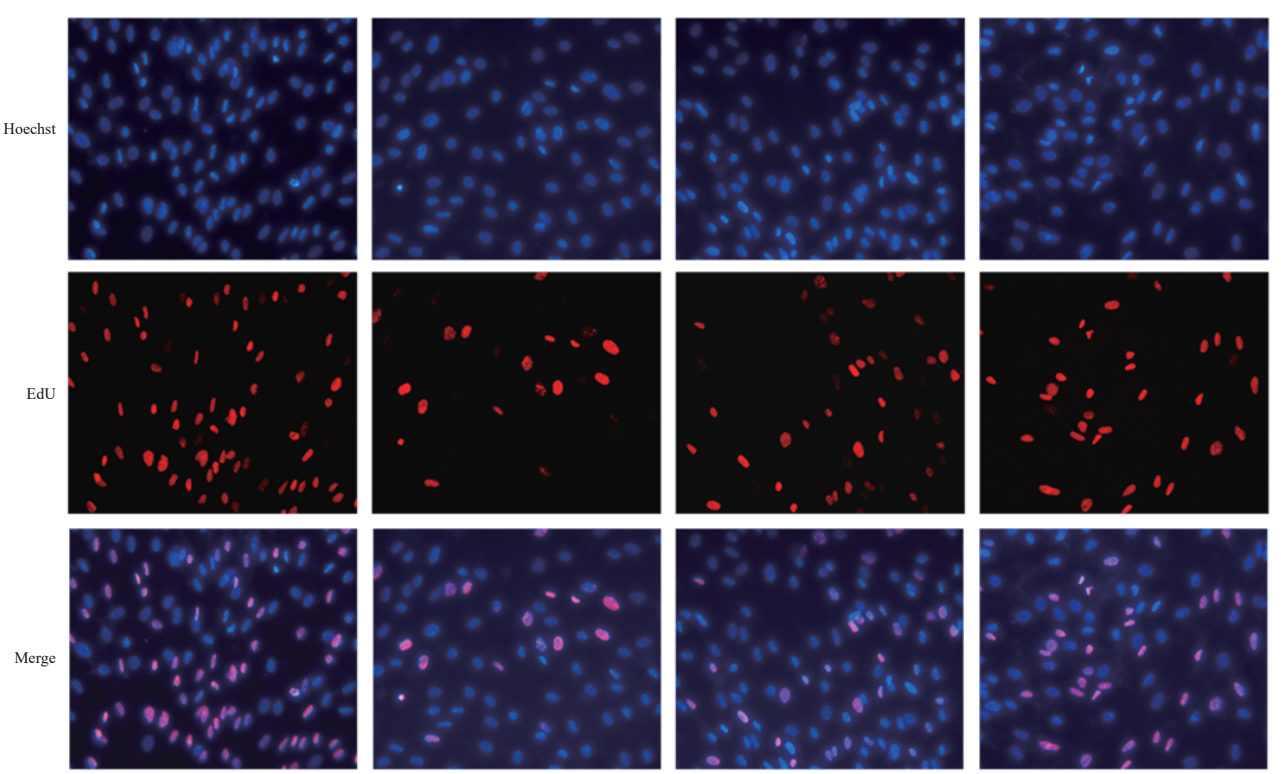
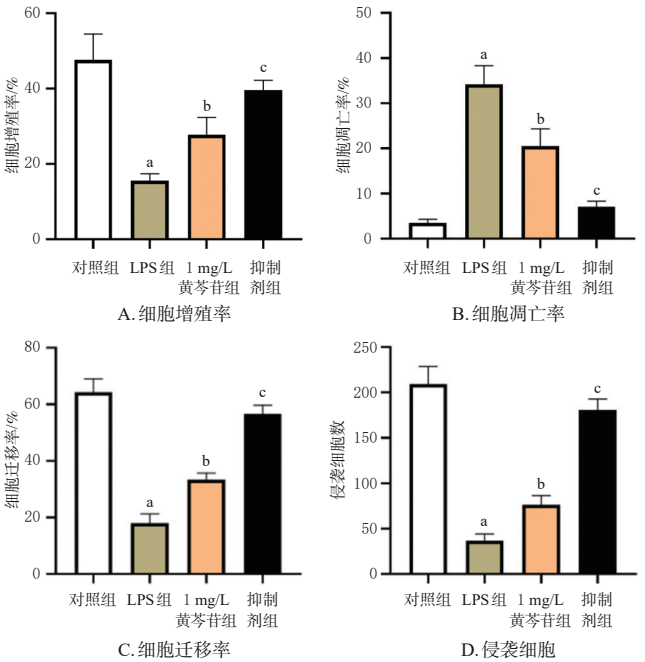


图3 黄芩苷对各组细胞增殖率影响的显微图（×20）



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与1 mg/L黄芩苷组比较，$P<0.05$

图4　黄芩苷对各组细胞增殖率、凋亡率、迁移率和侵袭细胞数的影响

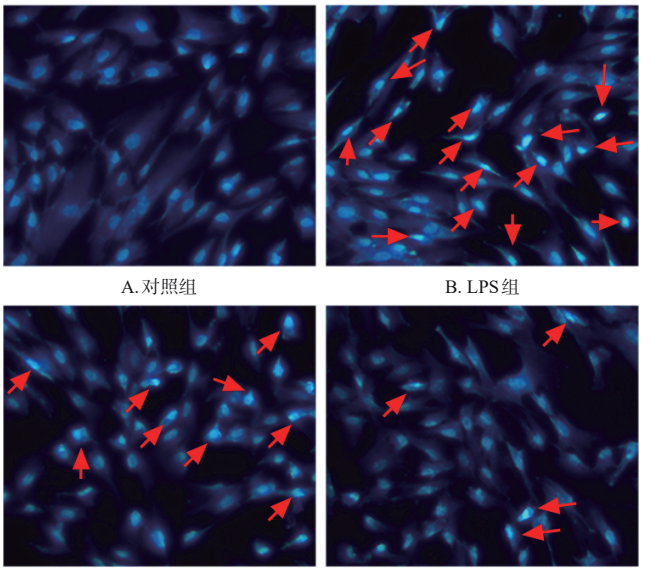


图5　黄芩苷对各组细胞凋亡率影响的显微图（×20）

3.5　黄芩苷对各组细胞迁移率的影响

与对照组比较，LPS组细胞迁移率显著降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，1 mg/L黄芩苷组细胞迁移率显著升高（$P<0.05$）；与1 mg/L黄芩苷组比较，抑制剂组细胞迁移率显著升高（$P<0.05$）。结果见图4C、图6。

3.6　黄芩苷对各组细胞侵袭能力的影响

与对照组比较，LPS组侵袭细胞数显著降低（$P<0.05$）；与LPS组比较，1 mg/L黄芩苷组侵袭细胞数显著升高（$P<0.05$）；与1 mg/L黄芩苷组比较，抑制剂组侵袭细胞数显著升高（$P<0.05$）。结果见图4D、图7。

3.7　黄芩苷对各组细胞中Cyclin D1、caspase-3 mRNA和蛋白表达的影响

与对照组比较，LPS组细胞中Cyclin D1 mRNA及蛋白相对表达量均显著降低，而caspase-3 mRNA及蛋白相对表达量均显著升高（$P<0.05$）；与LPS组比较，1 mg/L黄芩苷组Cyclin D1 mRNA及蛋白相对表达量均显著升高，而caspase-3 mRNA及蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$）；与1 mg/L黄芩苷组比较，抑制剂组Cyclin D1 mRNA及蛋白相对表达量均显著升高，而caspase-3 mRNA及蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$）。结果见图8。

3.8　黄芩苷对各组细胞中JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达的影响

各组细胞中JAK2和STAT3蛋白相对表达量比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组比较，LPS组细

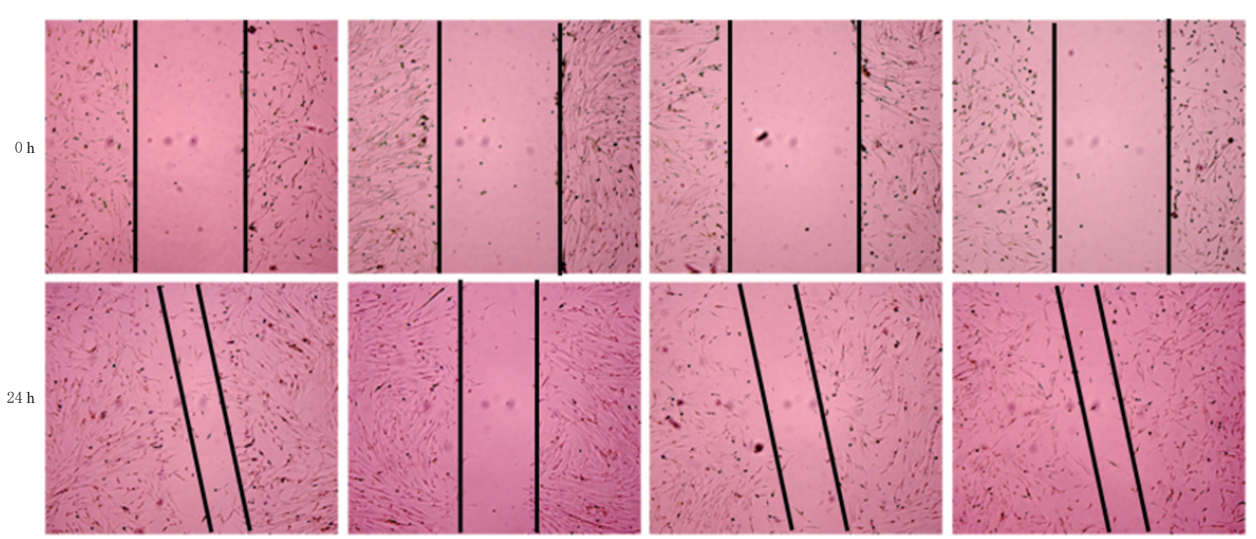


图6　黄芩苷对各组细胞迁移率影响的显微图（×20）

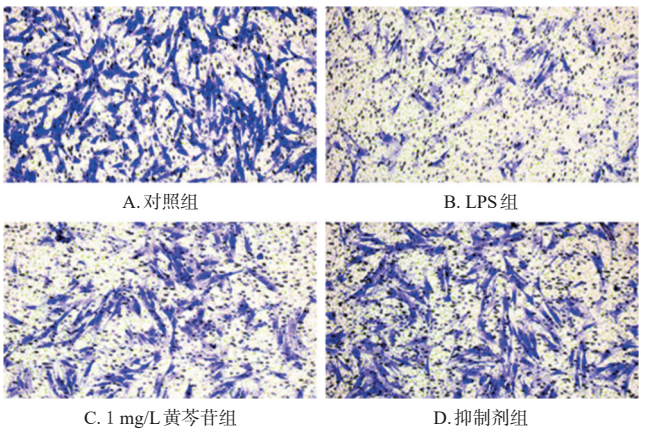
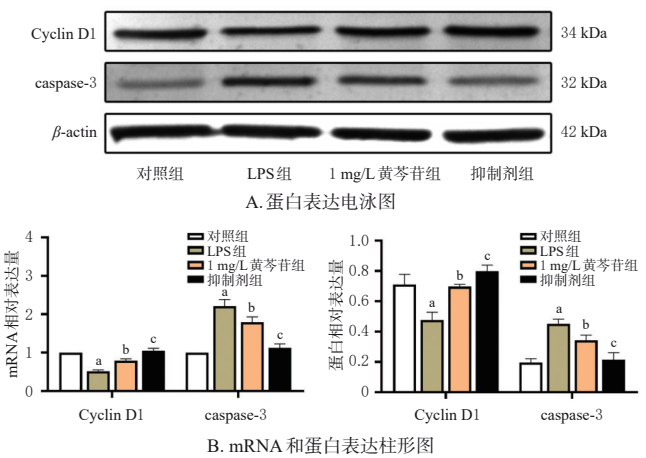


图 7　黄芩苷对各组细胞侵袭能力影响的显微图（×20）



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与1 mg/L黄芩苷组比较，$P<0.05$

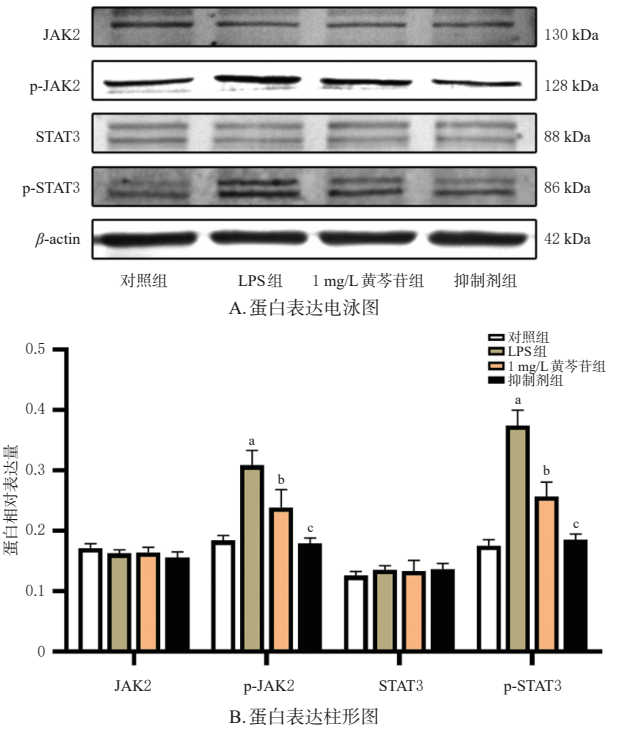
图 8　黄芩苷对各组细胞中 Cyclin D1、caspase-3 mRNA 和蛋白表达的影响

胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达量均显著升高（$P<0.05$）；与 LPS 组比较，1 mg/L 黄芩苷组细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$）；与 1 mg/L 黄芩苷组比较，抑制剂组细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达量均显著降低（$P<0.05$）。结果见图 9。

4　讨论

牙周炎是由龈下牙齿生物膜引发宿主炎症和免疫反应引起的，可导致易感宿主中牙周组织的不可逆破坏，常规治疗的效果欠佳，且易反复甚至加剧[11]。目前已有临床研究表明，黄芩可用于牙周炎的相关治疗[12]，而黄芩苷是从黄芩中提取的黄酮类化合物，具有抗炎、抗氧化等多种药理作用[13]。有研究发现，黄芩苷可以抑制牙周炎的炎症反应，并诱导细胞中细胞程序性死亡-配体 1 下调，抑制牙槽骨吸收，促进组织修复等[14]，此外黄芩苷还能够促进 hPDLSCs 增殖、黏附和迁移，诱导 hPDLSCs 的成骨分化[9]。

本研究结果显示，与对照组比较，LPS 组细胞炎症



a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与LPS组比较，$P<0.05$；c：与1 mg/L黄芩苷组比较，$P<0.05$

图 9　黄芩苷对各组细胞中 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

因子含量显著升高，24 h 和 48 h 细胞活力显著降低，提示 LPS 诱导 hPDLSCs 炎症模型构建成功，且 LPS 可以降低细胞的活力。与 LPS 组比较，1、10 mg/L 黄芩苷组细胞炎症因子含量显著降低，24 h 和 48 h 细胞活力显著升高，说明 1、10 mg/L 黄芩苷可以抑制 LPS 诱导的 hPDLSCs 炎症，提高细胞的活力。与干预 24 h 时比较，干预 48 h 时 LPS 组和 0.1、1 和 10 mg/L 黄芩苷组细胞活力均显著降低，且 48 h LPS 组的细胞活力低于 50%，为排除细胞活力过低对后续实验的影响，本课题组最终选择 1 mg/L 黄芩苷进行后续实验。结果表明，与对照组比较，LPS 组细胞增殖率、迁移率、侵袭细胞数均显著降低，细胞凋亡率均显著升高；经 1 mg/L 黄芩苷干预后，上述指标均显著改善，证明了黄芩苷可以促进 LPS 诱导的 hPDLSCs 的增殖、迁移和侵袭，抑制其凋亡，具有良好的医学应用前景。Cyclin D1 是细胞增殖过程中的标志蛋白，作为细胞周期蛋白依赖性激酶 4（Cyclin-dependent kinase 4，CDK4）和 CDK6 的变构调节剂，可调节从 G1 期到 S 期的转变，Cyclin D1 的高表达可促进细胞增殖[15]。细胞凋亡是一种多种因素诱导程序性细胞死亡的生物学过程，caspase-3 是执行细胞凋亡的关键因子，活化后可切割多种底物，在细胞凋亡中具有重要作用[16]。本研究结果显示，LPS 可抑制细胞 Cyclin D1 mRNA 及蛋白表达，促进 caspase-3 mRNA 及蛋白表达，而 1 mg/L 黄芩

苷可扭转LPS的上述作用，提示黄芩苷可能是通过上调Cyclin D1和下调caspase-3来促进LPS诱导的hPDLSCs增殖，抑制其凋亡。

在牙周疾病发生机制中，JAK2/STAT3信号通路一直是研究的热点，牙周膜干细胞是牙周组织中重要的细胞类型，干扰牙周膜干细胞的行为会影响牙周组织的发生和进展[17]。有研究表明，JAK2/STAT3信号通路与根尖周炎的炎症过程有关，JAK2、STAT3及其磷酸化蛋白的表达量在根尖周炎过程中增加[18]。本研究结果显示，LPS可促进p-JAK2和p-STAT3蛋白表达；1 mg/L黄芩苷可降低p-JAK2和p-STAT3蛋白表达，提示黄芩苷可能抑制了JAK2/STAT3通路的信号转导。在1 mg/L黄芩苷组中加入JAK2/STAT3信号通路抑制剂AG490进行JAK2/STAT3通路验证实验的结果显示，与1 mg/L黄芩苷组比较，抑制剂组细胞增殖率、迁移率、侵袭细胞数、Cyclin D1 mRNA及蛋白表达水平均显著升高，细胞凋亡率、caspase-3 mRNA及蛋白表达、p-JAK2和p-STAT3蛋白表达水平均显著降低，提示黄芩苷可能通过下调p-JAK2、p-STAT3、caspase-3蛋白表达水平，上调Cyclin D1蛋白表达水平来促进细胞增殖、迁移及侵袭，并诱导细胞凋亡。

综上所述，黄芩苷可促进LPS诱导的hPDLSCs增殖、迁移和侵袭，抑制其凋亡及炎症反应，其作用机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路的活化有关。

参考文献

[1] BARTOLD P M. Lifestyle and periodontitis：the emergence of personalized periodontics[J]. Periodontol 2000，2018，78(1)：7-11.

[2] KWON T，LAMSTER I B，LEVIN L. Current concepts in the management of periodontitis[J]. Int Dent J，2021，71(6)：462-476.

[3] TOMOKIYO A，WADA N，MAEDA H. Periodontal ligament stem cells：regenerative potency in periodontium[J]. Stem Cells Dev，2019，28(15)：974-985.

[4] CRUZ MARTÍNEZ C，DIAZ GÓMEZ M，OH M S. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry：a review[J]. Pharm Biol，2017，55(1)：1992-1998.

[5] CHANAJ-KACZMAREK J，OSMAŁEK T，SZYMAŃSKA E，et al. Development and evaluation of thermosensitive hydrogels with binary mixture of *Scutellariae baicalensis* radix extract and chitosan for periodontal diseases treatment[J]. Int J Mol Sci，2021，22(21)：11319.

[6] 毛友兵，王洒. 基于JAK/STAT3信号转导通路探讨黄芩苷预处理对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中医急症，2019，28(7)：1180-1183.

[7] 李月. 利拉鲁肽通过JAK2/STAT3信号通路影响糖尿病牙周炎的发生发展[D]. 兰州：兰州大学，2020.

[8] 喻茂文，柳建磊，汤洪波，等. LINC00963靶向miR-525-5p调控LPS诱导的牙周膜细胞损伤的机制研究[J]. 实用口腔医学杂志，2022，38(4)：455-460.

[9] 黄琼，李婧，李长宏. 黄芩苷对人牙周膜干细胞生物学特性的影响及作用机制[J]. 西部医学，2021，33(10)：1463-1467.

[10] 梁又德，刘鑫，宋大为，等. 白血病抑制因子通过JAK2/STAT3信号通路对牙周膜细胞增殖影响的研究[J]. 临床口腔医学杂志，2019，35(6)：335-339.

[11] CARVALHO C V，SARAIVA L，BAUER F P F，et al. Orthodontic treatment in patients with aggressive periodontitis[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop，2018，153(4)：550-557.

[12] 卢惠冰，徐雄均，杨伟湘，等. 黄芩苷口腔缓释膜辅助治疗慢性牙周炎临床观察[J]. 新中医，2018，50(11)：156-159.

[13] HUANG T，LIU Y N，ZHANG C L. Pharmacokinetics and bioavailability enhancement of baicalin：a review[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet，2019，44(2)：159-168.

[14] BAILLY C. The implication of the PD-1/PD-L1 checkpoint in chronic periodontitis suggests novel therapeutic opportunities with natural products[J]. Jpn Dent Sci Rev，2020，56(1)：90-96.

[15] LU J J，HU Y J，TANG Z Y，et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide enhances the proliferation of human periodontal ligament cells via upregulation of cyclin D1，cyclin A and cyclin B1[J]. Exp Ther Med，2022，23(1)：2.

[16] WU Y Q，ZHUANG J B，ZHAO D，et al. Interaction between caspase-3 and caspase-5 in the stretch-induced programmed cell death in the human periodontal ligament cells[J]. J Cell Physiol，2019，234(8)：13571-13581.

[17] 徐秋，邱新毓，高洁，等. 骨髓间充质干细胞外泌体调控STAT3通路促进牙周膜干细胞成骨分化[J]. 口腔生物医学，2022，13(1)：35-39.

[18] 张晨，刘珺，赵涵，等. Janus蛋白酪氨酸激酶2/信号转导和转录激活因子3信号转导通路在人慢性根尖周炎中的表达[J]. 口腔医学研究，2019，35(1)：84-88.

（收稿日期：2022-11-14　修回日期：2023-03-10）

（编辑：曾海蓉）