

# 西格列汀激活基质细胞衍生因子-1/CXC趋化因子受体4信号通路对脂多糖诱导的人牙周膜干细胞增殖、凋亡、炎症和成骨分化的影响

唐小雪 周政 李启期 姜丹丹  
石河子大学第一附属医院口腔科, 石河子 832008

**[摘要]** 目的 探讨西格列汀对脂多糖(LPS)诱导的炎症微环境下人牙周膜干细胞(hPDLSCs)增殖、凋亡、炎症和成骨分化的影响及分子机制。方法 体外培养hPDLSCs,用不同浓度的西格列汀处理后检测细胞活力,以确定后续西格列汀实验浓度。采用1 μg/mL LPS刺激诱导24 h建立hPDLSCs炎症模型并分为空白组、对照组、西格列汀低浓度组(0.5 μmol/L)、西格列汀中浓度组(1 μmol/L)、西格列汀高浓度组(2 μmol/L)、西格列汀高浓度+基质细胞衍生因子-1(SDF-1)/CXC趋化因子受体4(CXCR4)通路抑制剂(AMD3100)组(2 μmol/L+10 μg/mL)。细胞计数试剂盒-8检测培养24、48、72 h后的hPDLSCs增殖活性;流式细胞术检测培养72 h后hPDLSCs凋亡情况;诱导成骨分化21 d后茜素红染色检测hPDLSCs成骨分化能力,试剂盒测定hPDLSCs中碱性磷酸酶(ALP)活性;酶联免疫吸附检测hPDLSCs培养上清液中炎症因子肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-1β、IL-6水平;实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测hPDLSCs中成骨分化相关基因Runt相关转录因子2(RUNX2)、骨钙素(OCN)、骨桥蛋白(OPN)及SDF-1和CXCR4 mRNA表达;Western blot检测hPDLSCs中SDF-1、CXCR4蛋白表达。结果 与空白组比较,对照组hPDLSCs增殖活性、矿化结节数量、染色强度、ALP活性和RUNX2、OCN、OPN mRNA及SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白表达水平显著降低,凋亡率、TNF-α、IL-1β、IL-6水平显著升高( $P<0.05$ );与对照组比较,西格列汀低、中、高浓度组hPDLSCs增殖活性、矿化结节数量、染色强度、ALP活性和RUNX2、OCN、OPN mRNA及SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白表达水平依次升高,凋亡率、TNF-α、IL-1β、IL-6水平依次降低( $P<0.05$ );AMD3100可部分逆转高浓度西格列汀对LPS诱导的hPDLSCs的作用效果( $P<0.05$ )。结论 西格列汀可能通过激活SDF-1/CXCR4信号通路促进LPS诱导的炎症微环境下hPDLSCs的增殖和成骨分化,抑制hPDLSCs凋亡和炎症反应。

**[关键词]** 西格列汀; 脂多糖; 人牙周膜干细胞; 成骨分化; 基质细胞衍生因子-1; CXC趋化因子受体4

**[中图分类号]** Q257 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023213



本文链接 开放科学标识码

**Effects of sitagliptin activation of the stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 signaling pathway on the proliferation, apoptosis, inflammation, and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells induced by lipopolysaccharide**

Tang Xiaoxue, Zhou Zheng, Li Qiqi, Jiang Dandan

**[收稿日期]** 2023-07-07; **[修回日期]** 2023-12-20

**[基金项目]** 石河子大学自主资助支持校级科研立项项目(ZZZC20-1957A)

**[作者简介]** 唐小雪, 副主任医师, 硕士, E-mail: tangxiaoxue638@163.com

**[通信作者]** 唐小雪, 副主任医师, 硕士, E-mail: tangxiaoxue638@163.com

Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832008, China

Supported by: Shihezi University Provides Independent Funding to Support University Level Scientific Research Projects (ZZZC201957A)

Correspondence: Tang Xiaoxue, E-mail: tangxiaoxue638

@163.com

**[Abstract] Objective** This study aimed to investigate the effects of sitagliptin on the proliferation, apoptosis, inflammation, and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory microenvironment and its molecular mechanism. **Methods** hPDLSCs were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of sitagliptin to detect cell viability and subsequently determine the experimental concentration of sitagliptin. An hPDLSCs inflammation model was established after 24 h of stimulation with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS and divided into blank, control, low-concentration sitagliptin (0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), medium-concentration sitagliptin (1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), and high-concentration sitagliptin (2  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ), high-concentrationsitagliptin+stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) pathway inhibitor (AMD3100) (2  $\mu\text{mol}/\text{L}$ +10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) groups. A cell-counting kit-8 was used to detect the proliferation activity of hPDLSCs after 24, 48, and 72 h culture. The apoptosis of hPDLSCs cultured for 72 h was detected by flow cytometry. After inducing osteogenic differentiation for 21 days, alizarin red staining was used to detect the osteogenic differentiation ability of hPDLSCs. The alkaline phosphatase (ALP) activity in hPDLSCs was determined using a kit. The levels of inflammatory factors [tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6] in the supernatant of hPDLSCs culture were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expressions of osteogenic differentiation genes [Runt-associated transcription factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN)], SDF-1 and CXCR4 in hPDLSCs were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Western blot analysis was used to determine SDF-1 and CXCR4 protein expression in hPDLSCs. **Results** Compared with the blank group, the proliferative activity, number of mineralized nodules, staining intensity, ALP activity, and RUNX2, OCN, OPN mRNA, SDF-1, and CXCR4 mRNA and protein expression levels of hPDLSCs in the control group significantly decreased. The apoptosis rate and levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the proliferative activity, number of mineralized nodule, staining intensity, ALP activity, and RUNX2, OCN, OPN mRNA, SDF-1, and CXCR4 mRNA and protein expression levels of hPDLSCs in low-, medium-, and high-concentration sitagliptin groups increased. The apoptosis rate and levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 decreased ( $P<0.05$ ). AMD3100 partially reversed the effect of high-concentration sitagliptin on LPS-induced hPDLSCs ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Sitagliptin may promote the proliferation and osteogenic differentiation of hPDLSCs in LPS-induced inflammatory microenvironment by activating the SDF-1/CXCR4 signaling pathway. Furthermore, it inhibited the apoptosis and inflammatory response of hPDLSCs.

**[Key words]** sitagliptin; lipopolysaccharide; human periodontal ligament stem cells; osteogenic differentiation; stromal cell derived factor-1; CXC chemokine receptor 4

牙周炎是一种慢性炎症性疾病，其发生是由于微生物菌斑的积累，如由牙龈卟啉单胞菌和福赛斯坦纳菌引起的菌斑，它们的细胞壁含有脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)，这是疾病的主要原因。牙周炎的主要特征包括牙周膜和牙槽骨的进行性丧失、牙周袋和牙龈出血<sup>[1]</sup>。近年来，随着组织工程的发展，牙周组织再生被认为是治疗牙周炎的一种有希望的方法<sup>[2]</sup>。人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs) 是一种极具前景的牙周组织再生治疗干细胞群，具有增殖、自我更新和多向分化形成牙龈、牙周膜、牙骨质和牙槽骨的功能<sup>[3]</sup>。但研究<sup>[4]</sup>表明，炎症会影响 hPDLSCs 的成骨能力。因此，在炎症微环境下改变 hPDLSCs 的成骨能力尤为重要。基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)

属于趋化因子家族，可通过激活 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 促进多种间充质干细胞的体外增殖、迁移和成骨分化，在骨缺损中诱导骨修复<sup>[5]</sup>。据报道<sup>[6]</sup>，SDF-1 可增强炎症和正常来源的 hPDLSCs 的生物活性，促进 hPDLSCs 的成骨分化。西格列汀为一种口服降糖药，通过抑制二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4) 活性来治疗 2 型糖尿病。DPP4 抑制剂的药理作用是延长肠促胰岛素激素的作用并避免 SDF-1 的降解<sup>[7]</sup>。最近的研究显示，西格列汀可通过激活 SDF-1/CXCR4 信号通路促进内皮祖细胞迁移、侵袭和血管生成<sup>[8]</sup>，并可改善糖尿病肾病肾小管损伤<sup>[9]</sup>。表明西格列汀是一种潜在的 SDF-1/CXCR4 信号通路激活剂。研究<sup>[10]</sup>发现，西格列汀可减轻牙周炎大鼠炎症反应。然而，西格列汀是否能

通过SDF-1/CXCR4信号通路调控hPDLSCs增殖和成骨分化尚不清楚。因此,本研究通过LPS刺激诱导建立hPDLSCs炎症模型,探究西格列汀对炎症微环境下hPDLSCs增殖和成骨分化的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞

hPDLSCs (武汉普诺赛生命科技有限公司)。

#### 1.1.2 药物和试剂

西格列汀 (批号20221209,杭州默沙东制药有限公司), LPS、抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸盐、地塞米松、细胞计数试剂盒-8 (CCK-8)、茜素红染液、TRIzol试剂、RIPA裂解液 (徐州博立达生物技术有限公司), SDF-1/CXCR4通路抑制剂 (AMD3100)、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 凋亡试剂盒、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 检测试剂盒、逆转录试剂盒、羊抗兔二抗 (扬州金英生物技术有限公司), 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - $\alpha$ 、白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、IL-6酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒 (Merck公司, 德国), BCA试剂盒、兔源SDF-1、CXCR4、GAPDH一抗 (Abcam公司, 美国)。

#### 1.1.3 仪器

酶标仪、显微镜、蛋白成像系统 (型号分别为CLARIOstar、PXS850-T、FC 800-C, 香港伯齐科技有限公司), 流式细胞仪 (型号SP6900, 深圳达科为生物科技公司), 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 仪 (型号QuantStudio 12K Flex, 扬州金英生物技术有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 hPDLSCs的培养和诱导分化

本实验在石河子大学医学院基础研究实验室完成。hPDLSCs接种在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的 $\alpha$ -MEM培养基中, 细胞在37℃下用1  $\mu$ g/mL LPS处理24 h以模拟体外牙周微炎症状态<sup>[11]</sup>。成骨分化: 将hPDLSCs用含50  $\mu$ mol/L抗坏血酸、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸盐和10 nmol/L地塞米松的成骨诱导培养基培养, 每3 d更换一次<sup>[12]</sup>。

### 1.2.2 西格列汀对hPDLSCs的细胞毒性测定

西格列汀储备溶液在二甲基亚砜中制备, 并在实验前用无血清培养基稀释成不同浓度。将hPDLSCs接种在96孔板中 (2 $\times$ 10<sup>4</sup>个/孔), 孵育24 h后, 用终浓度分别为0 (空白组)、0.25、0.5、1、2、4和8  $\mu$ mol/L西格列汀处理细胞24 h。24 h后, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液并在37℃下再孵育2 h。使用酶标仪于450 nm波长处测量光密度 (optical density, OD) 值, 计算细胞活力。细胞活力 (%) = (各浓度西格列汀组OD值/空白组OD值)  $\times$  100%。各组设6个平行样。

### 1.2.3 CCK-8法检测西格列汀对LPS诱导的hPDLSCs增殖活性的影响

将hPDLSCs按照密度为1 $\times$ 10<sup>6</sup>个/孔接种在6孔板中, 分为空白组、对照组、西格列汀低浓度组 (0.5  $\mu$ mol/L)、西格列汀中浓度组 (1  $\mu$ mol/L)、西格列汀高浓度组 (2  $\mu$ mol/L)、西格列汀高浓度+AMD3100组 (2  $\mu$ mol/L+10  $\mu$ g/mL)。除空白组外, 其余各组将1  $\mu$ g/mL LPS添加到hPDLSCs的培养基中在37℃下处理24 h以模拟hPDLSCs的炎症微环境。然后西格列汀低、中、高浓度组向hDLSCs的培养基中分别加入0.5、1、2  $\mu$ mol/L西格列汀; 西格列汀高浓度+AMD3100组向hPDLSCs的培养基中加入2  $\mu$ mol/L西格列汀和10  $\mu$ g/mL AMD 3100<sup>[13]</sup>, 各组设6个平行样。分别培养24、48、72 h后, 每孔加入10  $\mu$ L CCK-8溶液, 并在37℃下再孵育2 h。使用酶标仪在450 nm波长处测量每个孔的OD值, 计算增殖活性 (%) = (各处理组OD值/空白组OD值)  $\times$  100%。

### 1.2.4 流式细胞术检测hPDLSCs凋亡

按1.2.3中的方法分组和处理各组hPDLSCs并培养72 h, 用胰蛋白酶消化, 并重悬于500  $\mu$ L结合缓冲液中。随后, 加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC和5  $\mu$ L PI染色液, 混合后避光孵育30 min。最后, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

### 1.2.5 hPDLSCs成骨分化能力的测定

茜素红染色: 按照1.2.3中的方法进行分组和处理。然后加入上述成骨诱导培养基, 诱导21 d后, 用4%多聚甲醛在4℃下固定hPDLSCs 15 min。然后将细胞与添加到每个孔中的0.2%茜素红溶液一起孵育30 min。最后, 显微镜观察矿化结节形成情况。为了量化茜素红染色结果, 将400  $\mu$ L 10%氯化十六烷基吡啶加入染色的培养板中溶解矿物质沉积物, 并在562 nm处测量OD值 (OD<sub>562 nm</sub>) 来量化染色强度, 染色强度越高则OD<sub>562 nm</sub>越大。

ALP活性测定：在诱导成骨分化第21天，弃去培养液，室温下将hPDLSCs于聚乙二醇辛基苯基醚中裂解30 min，将裂解物12 000×g离心10 min，取上清液。然后将上清液加入96孔板(50 μL/孔)中，试剂盒测定上清液中ALP活性。

1.2.6 ELISA检测hPDLSCs培养上清液中炎症因子水平

按1.2.3中的方法分组和处理各组hPDLSCs并培养72 h，收集hPDLSCs培养上清液，在4 °C下12 000×g离心10 min，使用ELISA试剂盒测量上清液中炎症因子TNF-α、IL-1β、IL-6的水平。

1.2.7 RT-qPCR检测hPDLSCs中成骨分化相关基因Runt相关转录因子2(runt-associated transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和SDF-1、CXCR4 mRNA表达

收集1.2.6中的hPDLSCs，使用TRIzol试剂从hPDLSCs中提取总RNA，逆转录为cDNA。使用SYBR®Premix Ex Taq™ II试剂盒在RT-qPCR仪上

进行反应。共28 μL反应体系：3 μL cDNA、7 μL缓冲液、2 μL正向引物、2 μL反向引物、2 μL DNA聚合酶、12 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增条件：97 °C，4 min；97 °C、11 s，72 °C、19 s，76 °C、14 s，共40个循环。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法计算靶基因的相对表达量，GAPDH为mRNA的内参对照。引物由徐州博立达生物技术有限公司合成，引物序列见表1。

1.2.8 Western blot检测hPDLSCs中SDF-1、CXCR4蛋白表达

收集1.2.7中的hPDLSCs，使用RIPA裂解液将每组的hPDLSCs在冰上裂解30 min，然后使用BCA试剂盒定量提取的蛋白质浓度，将20 μg蛋白质样品进行凝胶电泳分离，并转移至聚偏二氟乙烯膜。然后，在室温下用5%脱脂牛奶封闭2 h，将膜与兔源一抗SDF-1(1:780)、CXCR4(1:760)、GAPDH(1:1950)在4 °C下孵育过夜，然后在室温下加入羊抗兔二抗(1:3150)1 h。化学发光法将蛋白条带可视化，以GAPDH为内参量化蛋白条带灰度值。

表 1 用于RT-qPCR的引物序列

Tab 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
RUNX2	CGAATGGCTAGCACGCTATTAA	GTCGCCATAACAGATTTCATCCG
OCN	TCACACTCCTCGCCCTATT	GATGTGGTCAGCCAACTCG
OPN	TCCTAGCCCCACAGACCCTT	CACACTATCACCTCGGCCAT
SDF-1	ATTCTCAACACTCCAAACTGTGC	CGGTATGAACTGAACTTGCAATG
CXCR4	AGCTGTTGGTGACACGCGTGGTCTATG	GCACTACTGGTGGCCCTTGGAGTATGA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGGA

1.3 统计学方法

数据采用SPSS 26.0软件进行统计分析，用均值±标准差表示计量资料，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验，P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

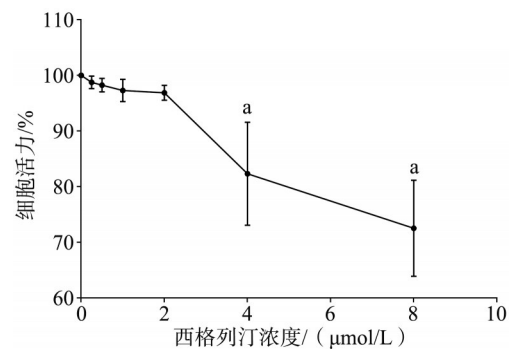
2.1 西格列汀对hPDLSCs活力的影响

与0 μmol/L比较，浓度为0.25、0.5、1、2 μmol/L的西格列汀对hPDLSCs活力无显著影响，而4和8 μmol/L的西格列汀可显著降低hPDLSCs活力(P<0.05，图1)。选择对hPDLSCs活力无显著影响的0.5、1、2 μmol/L西格列汀浓度进行后续实验。

2.2 西格列汀对LPS诱导的hPDLSCs增殖活性的影响

与空白组比较，对照组hPDLSCs增殖活性显

著降低(P<0.05)；与对照组比较，西格列汀低、中、高浓度组hPDLSCs增殖活性依次升高(P<0.05)；与西格列汀高浓度组比较，西格列汀高浓度+AMD3100组hPDLSCs增殖活性显著降低(P<0.05，表2)。



与0 μmol/L西格列汀比较，<sup>a</sup>P<0.05。

图 1 西格列汀对hPDLSCs活力的影响

Fig 1 Effect of sitagliptin on the activity of hPDLSCs

表 2 各组 hPDLSCs 增殖活性比较

Tab 2 Comparison of proliferative activity of hPDLSCs in each group % , n=6,  $\bar{x}\pm s$ 

组别	增殖活性		
	24 h	48 h	72 h
空白组	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
对照组	42.07±6.02 <sup>a</sup>	38.09±4.52 <sup>a</sup>	32.19±4.72 <sup>a</sup>
西格列汀低浓度组	60.13±8.11 <sup>b</sup>	53.38±6.90 <sup>b</sup>	48.25±5.96 <sup>b</sup>
西格列汀中浓度组	73.06±9.07 <sup>bc</sup>	67.94±8.57 <sup>bc</sup>	61.58±7.04 <sup>bc</sup>
西格列汀高浓度组	86.38±8.19 <sup>bcd</sup>	79.76±10.14 <sup>bcd</sup>	72.90±9.15 <sup>bcd</sup>
西格列汀高浓度+AMD3100组	51.74±7.08 <sup>e</sup>	45.21±6.35 <sup>e</sup>	41.55±6.03 <sup>e</sup>

注:与空白组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与对照组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ;与西格列汀低浓度组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ ;与西格列汀中浓度组比较, <sup>d</sup> $P<0.05$ ;与西格列汀高浓度组比较, <sup>e</sup> $P<0.05$ 。

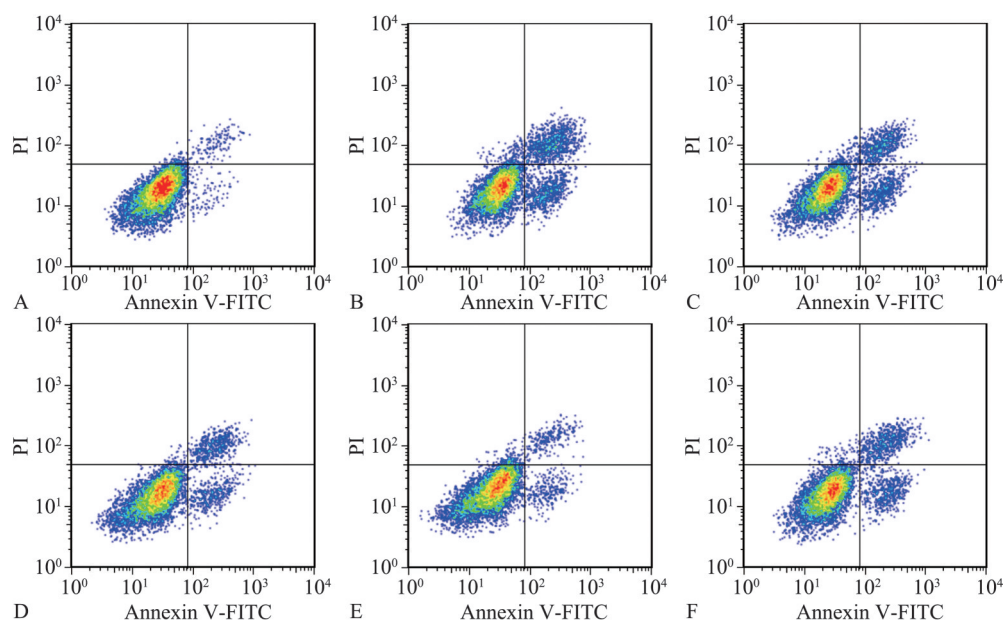
### 2.3 西格列汀对 LPS 诱导的 hPDLSCs 凋亡的影响

空白组、对照组、西格列汀低浓度组、西格列汀中浓度组、西格列汀高浓度组、西格列汀高浓度+AMD3100组 hPDLSCs 凋亡率分别为 (4.17±

0.49)%、(21.53±2.68)%、(16.85±1.94)%、(12.70±1.42)%、(8.26±0.95)%、(18.21±2.03)%。与空白组比较,对照组 hPDLSCs 凋亡率显著升高 ( $P<0.05$ );与对照组比较,西格列汀低、中、高浓度组 hPDLSCs 凋亡率依次降低 ( $P<0.05$ );与西格列汀高浓度组比较,西格列汀高浓度+AMD3100组 hPDLSCs 凋亡率显著升高 ( $P<0.05$ ,图2)。

### 2.4 西格列汀对 LPS 诱导的 hPDLSCs 成骨分化能力的影响

与空白组比较,对照组 hPDLSCs 中矿化结节数量减少,染色强度和 ALP 活性显著降低 ( $P<0.05$ );与对照组比较,西格列汀低、中、高浓度组 hPDLSCs 中矿化结节数量依次增加,染色强度和 ALP 活性依次升高 ( $P<0.05$ );与西格列汀高浓度组比较,西格列汀高浓度+AMD3100组 hPDLSCs 中矿化结节数量减少,染色强度和 ALP 活性显著降低 ( $P<0.05$ ),见图3、4。



A: 空白组; B: 对照组; C: 西格列汀低浓度组; D: 西格列汀中浓度组; E: 西格列汀高浓度组; F: 西格列汀高浓度+AMD3100组。

图 2 各组 hPDLSCs 凋亡图

Fig 2 Apoptosis map of hPDLSCs in each group

### 2.5 西格列汀对 hPDLSCs 培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平的影响

与空白组比较,对照组 hPDLSCs 培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平显著升高 ( $P<0.05$ );与对照组比较,西格列汀低、中、高浓度组 hPDLSCs 培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平依次降低 ( $P<0.05$ );与西格列汀高浓度组比较,西格列汀高浓度+AMD3100组 hPDLSCs 培养

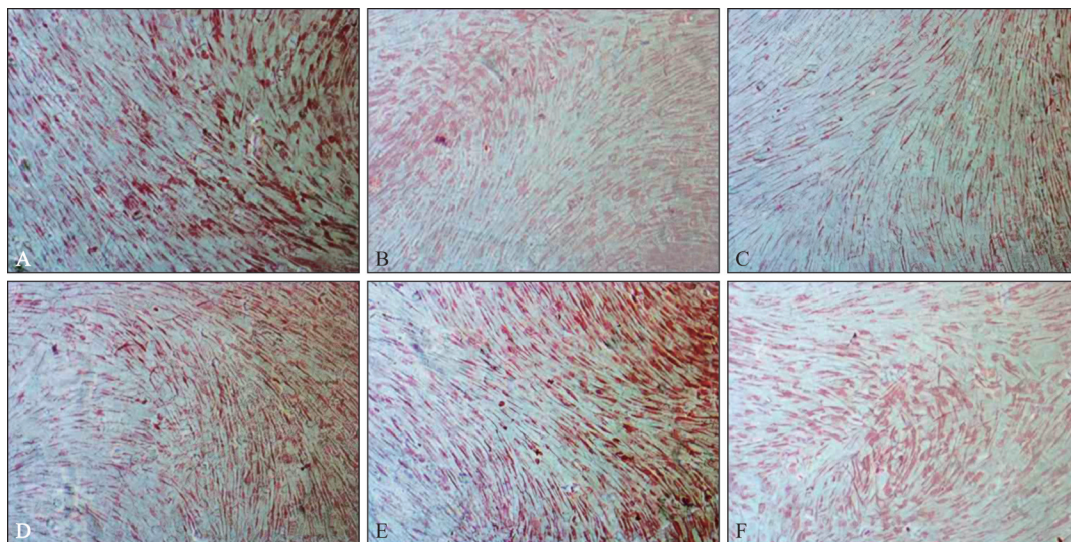
上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达水平显著升高 ( $P<0.05$ ,图5)。

### 2.6 西格列汀对 LPS 诱导的 hPDLSCs 中 RUNX2、OCN、OPN mRNA 表达水平的影响

与空白组比较,对照组 hPDLSCs 中 RUNX2、OCN、OPN mRNA 表达水平显著降低 ( $P<0.05$ );与对照组比较,西格列汀低、中、高浓度组 hPDLSCs 中 RUNX2、OCN、OPN mRNA 表达水平

依次升高 ( $P<0.05$ ); 与西格列汀高浓度组比较, 西格列汀高浓度+AMD3100组 hPDLSCs 中 RUN-

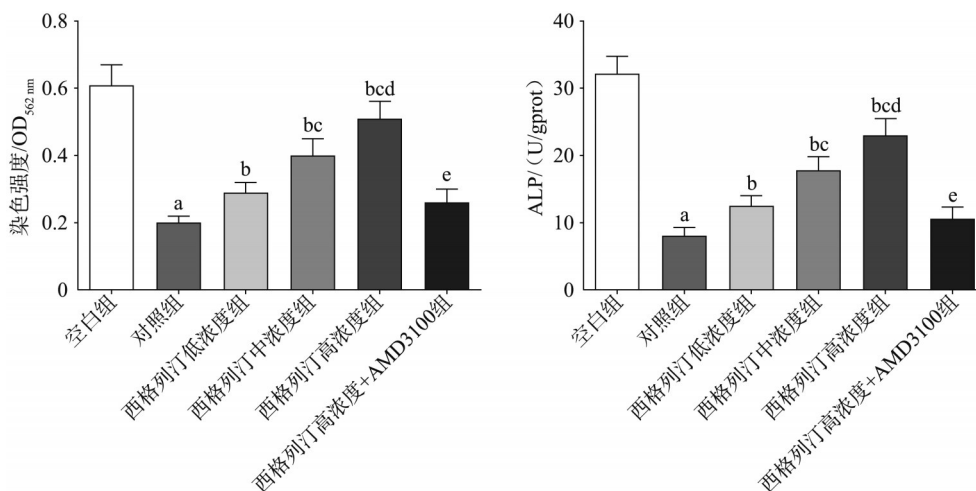
X2、OCN、OPN mRNA 表达水平显著降低 ( $P<0.05$ , 图6)。



A: 空白组; B: 对照组; C: 西格列汀低浓度组; D: 西格列汀中浓度组; E: 西格列汀高浓度组; F: 西格列汀高浓度+AMD3100组。

图3 各组hPDLSCs矿化结节形成情况 茜素红染色 ×200

Fig 3 Formation of mineralized nodules in hPDLSCs of each group alizarin red staining ×200



与空白组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与西格列汀低浓度组比较, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; 与西格列汀中浓度组比较, <sup>d</sup> $P<0.05$ ; 与西格列汀高浓度组比较, <sup>e</sup> $P<0.05$ 。

图4 各组hPDLSCs的染色强度(左)和ALP活性(右)比较

Fig 4 Comparison of staining intensity (left) and ALP activity (right) of hPDLSCs in each group

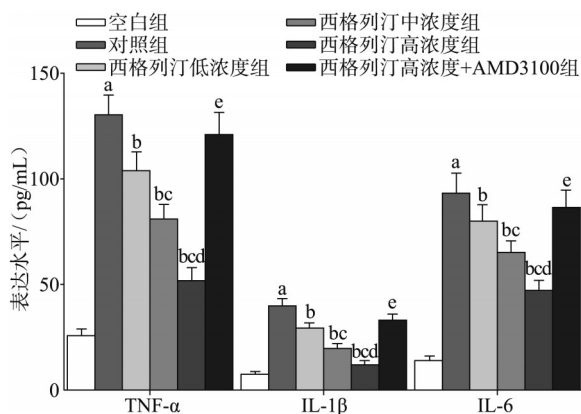
### 2.7 西格列汀对LPS诱导的hPDLSCs中SDF-1、CXCR4 mRNA和蛋白表达水平的影响

与空白组比较, 对照组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ ); 与对照组比较, 西格列汀低、中、高浓度组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 mRNA 和蛋白表达水平依次升高 ( $P<0.05$ ); 与西格列汀高浓度组比较, 西格列汀高浓度+AMD3100组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ , 图7、8)。

### 3 讨论

作为革兰阴性菌的活性致病物质, LPS可参与牙周炎的发生和进展。已有研究<sup>[14]</sup>报道, 龈沟液中LPS水平可影响牙周炎病情程度, 其水平越高, 牙周组织炎症越严重。此外, LPS已被证明可在体外抑制hPDLSCs的成骨分化<sup>[15]</sup>。在本研究中, hPDLSCs与1 μg/mL的LPS培养模拟炎症微环境。与先前的研究<sup>[16]</sup>结果一致, 当暴露于LPS时, hP-

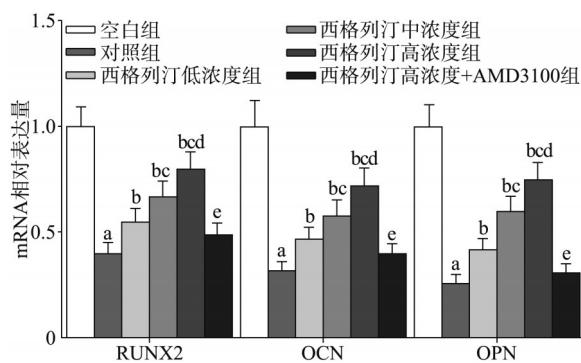
DLSCs的增殖活性显著降低,且在LPS刺激后产生了许多促炎细胞因子,包括TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 。此外,LPS刺激后ALP的活性、矿化结节的数量和成骨标志基因RUNX2、OCN和OPN mRNA的表达也降低;并且LPS触发了hPDLSCs的凋亡。这些结果证实了LPS对hPDLSCs造成的损伤。



与空白组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与西格列汀低浓度组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与西格列汀中浓度组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与西格列汀高浓度组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

图5 各组hPDLSCs培养上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6表达水平的比较

Fig 5 Comparison of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels in the culture supernatant of hPDLSCs in each group



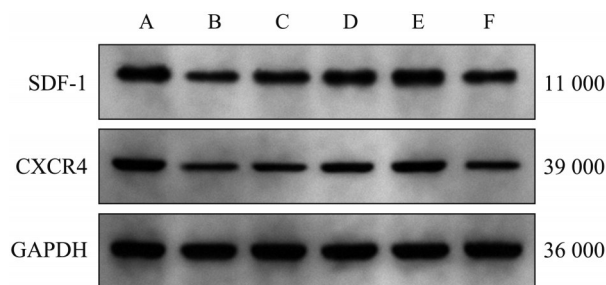
与空白组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与西格列汀低浓度组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与西格列汀中浓度组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与西格列汀高浓度组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

图6 各组hPDLSCs中RUNX2、OCN、OPN mRNA表达水平的比较

Fig 6 Comparison of mRNA expression levels of RUNX2, OCN, and OPN in hPDLSCs of each group

西格列汀为DPP4抑制剂,除了降血糖外,还具有显著的抗炎作用<sup>[17]</sup>。在一项关于糖尿病的临床试验中,西格列汀能够降低TNF- $\alpha$ 、IL-6水平<sup>[18]</sup>。牙周炎发生时,TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平

升高,其含量与牙周炎的进展关系密切<sup>[19]</sup>。目前关于西格列汀治疗牙周炎的报道极为匮乏。一项动物实验显示,西格列汀能够下调牙周炎大鼠牙龈组织炎症因子表达,但对牙槽骨和胶原组织没有显著的保护作用,这可能与药物剂量低有关<sup>[10]</sup>。细胞实验显示,西格列汀可减轻LPS诱发的人牙龈成纤维细胞炎症<sup>[20]</sup>。以上研究说明西格列汀在牙周炎进展中发挥一定的抑制作用,提示西格列汀可能是未来治疗牙周炎的靶向药物。本研究表明,西格列汀可以保护hPDLSCs免受LPS诱导的增殖活性下降;在西格列汀处理后,LPS刺激的hPDLSCs中促炎细胞因子水平也降低了。此外,LPS诱导的ALP活性抑制、矿化结节形成减少和RUNX2、OCN和OPN mRNA表达的降低均被西格列汀逆转。已知提高ALP活性可加快骨组织矿化。RUNX2是参与成骨过程的主基因,因为增加的RUNX2可以促进OPN和OCN的表达,它们都是成骨相关的标志物,并且是成骨细胞分化所必需的<sup>[21]</sup>。提示,西格列汀可促进炎症微环境下hPDLSCs的增殖和成骨分化。此外,西格列汀可以阻止LPS诱导的hPDLSCs凋亡,这进一步证实了西格列汀对炎症微环境下hPDLSCs的保护作用,提示西格列汀有成为治疗牙周炎药物的潜力,但可能存在过敏反应、皮疹、血管性水肿、肝酶升高、上呼吸道感染等不良反应。



A: 空白组; B: 对照组; C: 西格列汀低浓度组; D: 西格列汀中浓度组; E: 西格列汀高浓度组; F: 西格列汀高浓度+AMD3100组。

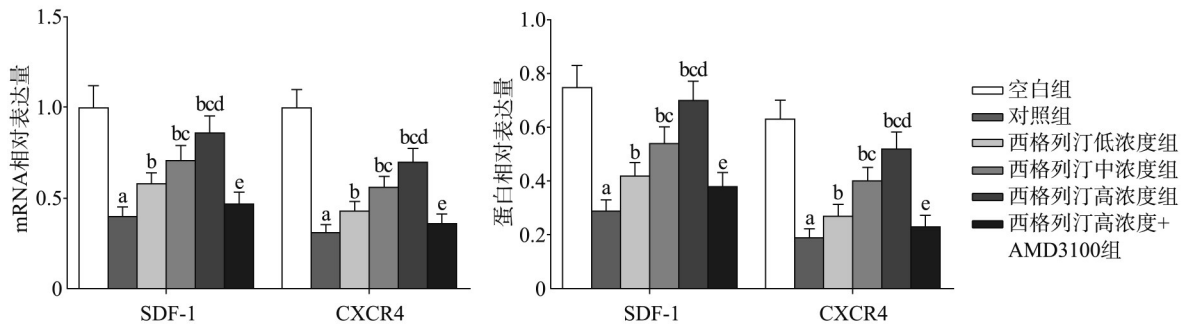
图7 各组hPDLSCs细胞中SDF-1、CXCR4蛋白印迹图

Fig 7 Western blot of SDF-1 and CXCR4 in hPDLSCs of each group

SDF-1是DPP4的底物,通过与CXCR4结合进行信号转导<sup>[22]</sup>。SDF-1可上调hPDLSCs中CXCR4的表达<sup>[13]</sup>。据报道<sup>[9]</sup>,西格列汀对DPP4的抑制可在体内外增加SDF-1和CXCR4的表达。从机制上讲,本研究结果发现LPS可以下调hPDLSCs中SDF-1、CXCR4表达,而西格列汀部分逆转了这

种作用，表明西格列汀可能通过激活 SDF-1/CXCR4 信号通路对 hPDLSCs 发挥有益效果。AMD-3100 可阻断 SDF-1 与其受体 CXCR4 结合<sup>[23]</sup>。为了验证这一假设，本研究采用 AMD3100 进行干预以抑制 SDF-1/CXCR4 信号通路的活化。结果显示，西格列汀对 LPS 诱导的 hPDLSC 增殖活性和成骨分

化能力的促进作用，对炎症反应以及 hPDLSC 凋亡的抑制作用，均可被 AMD3100 部分逆转。提示，西格列汀在炎症微环境下对 hPDLSC 增殖、凋亡、炎症和成骨分化作用效果的潜在机制可能与激活 SDF-1/CXCR4 信号通路有关。



与空白组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与对照组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与西格列汀低浓度组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；与西格列汀中浓度组比较，<sup>d</sup> $P < 0.05$ ；与西格列汀高浓度组比较，<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

图 8 各组 hPDLSCs 中 SDF-1、CXCR4 mRNA (左) 和蛋白 (右) 表达水平比较

Fig 8 Comparison of mRNA (left) and protein (right) expression levels of SDF-1 and CXCR4 in hPDLSCs of each group

综上所述，西格列汀可能通过激活 SDF-1/CXCR4 信号通路促进 LPS 诱导的炎症微环境下 hPDLSCs 的增殖和成骨分化，抑制 hPDLSCs 凋亡和炎症反应。本研究证明了西格列汀在 LPS 处理的 hPDLSCs 中对炎症和细胞增殖、凋亡的保护作用，最终促进了成骨分化，为西格列汀在缓解或治疗牙周炎中的应用提供了证据。在未来的研究中将采用体内动物实验及临床研究进一步验证西格列汀的作用及分子机制。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

[1] Li W, Zheng Q, Xu M, et al. Association between circulating 25-hydroxyvitamin D metabolites and periodontitis: results from the NHANES 2009-2012 and Mendelian randomization study[J]. J Clin Periodontol, 2023, 50(2): 252-264.

[2] Yoshino Y, Miyaji H, Nishida E, et al. Periodontal tissue regeneration by recombinant human collagen peptide granules applied with  $\beta$ -tricalcium phosphate fine particles[J]. J Oral Biosci, 2023, 65(1): 62-71.

[3] Adachi O, Sugii H, Itoyama T, et al. Decorin promotes osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. Molecules, 2022, 27(23): 8224-8239.

[4] Guo L, Li L. LIN28A alleviates inflammation, oxidative stress, osteogenic differentiation and mineralization in lipopolysaccharide (LPS)-treated human periodontal ligament stem cells[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(6): 411-419.

[5] Zhang H, Li X, Li J, et al. SDF-1 mediates mesenchymal stem cell recruitment and migration via the SDF-1/CXCR4 axis in bone defect[J]. J Bone Miner Metab, 2021, 39(2): 126-138.

[6] 李胜鸿, 彭世元, 罗小玲, 等. 柚皮素通过基质细胞衍生因子 1/趋化因子受体 4 信号轴对脂多糖作用下人牙周膜干细胞抗炎、成血管和成骨分化能力的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2023, 41(2): 175-184.

[7] Li SH, Peng SY, Luo XL, et al. Effect of naringenin on the anti-inflammatory, vascularization, and osteogenesis differentiation of human periodontal ligament stem cells via the stromal cell-derived factor 1/C-X-C motif chemokine receptor 4 signaling axis stimulated by lipopolysaccharide[J]. West China J Stomatol, 2023, 41(2): 175-184.

[8] Lin FY, Shih CM, Huang CY, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor decreases allograft vasculopathy via regulating the functions of endothelial progenitor cells in normoglycemic rats[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2021, 35(6): 1111-1127.

[9] Yu G, Liu P, Shi Y, et al. Sitagliptin stimulates endothelial progenitor cells to induce endothelialization in aneurysm necks through the SDF-1/CXCR4/NRF2 signaling pathway[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2019, 10(1):

- 823-835.
- [9] Zhang Q, He L, Dong Y, et al. Sitagliptin ameliorates renal tubular injury in diabetic kidney disease via STAT3-dependent mitochondrial homeostasis through SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 pathway[J]. *FASEB J*, 2020, 34(6): 7500-7519.
- [10] Moraes RM, Lima GM, Oliveira FE, et al. Exenatide and sitagliptin decrease interleukin 1 $\beta$ , matrix metalloproteinase 9, and nitric oxide synthase 2 gene expression but does not reduce alveolar bone loss in rats with periodontitis[J]. *J Periodontol*, 2015, 86(11): 1287-1295.
- [11] Nie M, Li H, Liu P, et al. HMBOX1 attenuates LPS-induced periodontal ligament stem cell injury by inhibiting CXCL10 expression through the NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(3): 224-233.
- [12] 郭焯, 马庆云, 赵文丽, 等. GAS5靶向miR-222-3p对牙周膜干细胞成骨分化的影响机制[J]. *实用口腔医学杂志*, 2021, 37(2): 271-274.
- Guo Y, Ma QY, Zhao WL, et al. The effects of miR-222-3p targeted by GAS5 on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. *J Pract Stomatol*, 2021, 37(2): 271-274.
- [13] 刘萍萍, 唐小莹, 袁小平. 基质细胞趋化因子-1对人牙周膜干细胞趋化因子受体——CXC亚家族受体4表达的影响研究[J]. *口腔医学研究*, 2020, 36(1): 51-55.
- Liu PP, Tang XY, Yuan XP. Effect of SDF-1 on CXCR4 expression of human periodontal stem cell chemokine receptor[J]. *J Oral Sci Res*, 2020, 36(1): 51-55.
- [14] Li X, Wang X, Luan QX. Hyperresponsiveness of human gingival fibroblasts from patients with aggressive periodontitis against bacterial lipopolysaccharide[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5): 417-423.
- [15] Chen W, Su J, Cai S, et al. Cullin3 aggravates the inflammatory response of periodontal ligament stem cells via regulation of SHH signaling and Nrf2[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3089-3100.
- [16] Chen J, Xu H, Xia K, et al. Resolvin E1 accelerates pulp repair by regulating inflammation and stimulating dentin regeneration in dental pulp stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 75-88.
- [17] Kong L, Deng J, Zhou X, et al. Sitagliptin activates the p62-Keap1-Nrf2 signalling pathway to alleviate oxidative stress and excessive autophagy in severe acute pancreatitis-related acute lung injury[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(10): 928-938.
- [18] Zhao X, Huang P, Yuan J. Influence of glimepiride plus sitagliptin on treatment outcome, blood glucose, and oxidative stress in diabetic patients[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(10): 7459-7466.
- [19] Zheng XY, Mao CY, Qiao H, et al. Plumbagin suppresses chronic periodontitis in rats via down-regulation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(8): 1150-1160.
- [20] 刘相, 康文燕, 商玲玲, 等. 西格列汀通过阻断核因子- $\kappa$ B信号通路抑制脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应[J]. *华西口腔医学杂志*, 2021, 39(2): 153-163.
- Liu X, Kang WY, Shang LL, et al. Sitagliptin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts by blocking nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *West China J Stomatol*, 2021, 39(2): 153-163.
- [21] 李颖辉, 齐芳芳, 韩行, 等. 不同浓度钙离子干预人牙周膜干细胞的增殖和成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(19): 3005-3010.
- Li YH, Qi FF, Han X, et al. Different concentrations of calcium ions interfere with the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(19): 3005-3010.
- [22] Zhao A, Chung M, Yang Y, et al. The SDF-1/CXCR4 signaling pathway directs the migration of systemically transplanted bone marrow mesenchymal stem cells towards the lesion site in a rat model of spinal cord injury[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2023, 18(2): 216-230.
- [23] 刘玄林, 熊伟. 槲皮素调节SDF-1/CXCR4轴对下肢动脉硬化闭塞症大鼠的治疗作用[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(4): 455-460.
- Liu XL, Xiong W. Therapeutic effect of quercetin on rats with arteriosclerosis occlusive disease of the lower extremities by regulating SDF-1/CXCR4 axis[J]. *Chin J Modern Appl Pharm*, 2023, 40(4): 455-460.

(本文编辑 杜冰)