

柚皮素调控叉头转录因子1/ β -连环蛋白通路对过氧化氢诱导的人牙周膜干细胞氧化损伤的保护作用研究

张丽^{1,2} 彭世元^{1,2} 唐飞扬² 蹇静薇² 袁硕声² 徐晓梅^{1,2}

1. 西南医科大学附属口腔医院正畸科, 泸州 646000;

2. 西南医科大学口颌面修复重建和再生泸州市重点实验室, 泸州 646000

[摘要] 目的 探究柚皮素(NAR)对氧化应激状态下人牙周膜干细胞(hPDLSCs)成骨潜能的保护作用及其相关机制。方法 用过氧化氢(H₂O₂)建立hPDLSCs氧化损伤模型,然后加入不同浓度的NAR及0.5 μ mol/L的叉头转录因子1(FOXO1)抑制剂AS1842856对其进行干预。利用细胞计数试剂盒法(CCK8)筛选出H₂O₂及NAR的最适作用浓度。通过碱性磷酸酶(ALP)染色和实时荧光定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组hPDLSCs中ALP、Runt相关转录因子2(RUNX2)、骨钙素(OCN)的表达情况,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)和活性氧荧光探针(DCFH-DA)染色检测各组hPDLSCs中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)以及乳酸脱氢酶(LDH)的表达情况。同时,使用qRT-PCR和蛋白印迹法(Western blot)分别检测各组FOXO1和 β -连环蛋白(β -catenin)的基因与蛋白表达水平。结果 H₂O₂暴露导致hPDLSCs氧化损伤增加,细胞内ROS水平上升,MDA、LDH表达升高($P<0.05$);成骨分化降低,ALP染色变浅和成骨分化相关基因ALP、RUNX2、OCN的信使核糖核酸(mRNA)表达水平降低($P<0.05$)。NAR共处理可缓解H₂O₂所致的hPDLSCs氧化损伤并提升其抗氧化能力、恢复其成骨能力。FOXO1抑制剂AS1842856可下调 β -catenin的表达($P<0.05$),明显减弱NAR的抗氧化作用及恢复成骨的能力($P<0.05$)。结论 NAR可以通过激活hPDLSCs内的FOXO1/ β -catenin信号通路从而提升hPDLSCs的抗氧化能力,减轻氧化应激损伤及其所致的成骨能力丧失。

[关键词] 牙周膜干细胞;叉头转录因子1/ β -连环蛋白信号通路;氧化应激;柚皮素;成骨分化

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2024468



本文链接 开放科学标识码

Investigating the protective effect of naringenin on hydrogen peroxide induced oxidative damage of human periodontal ligament stem cells by regulating the forkhead box protein O-1/ β -catenin pathway

Zhang Li^{1,2}, Peng Shiyuan^{1,2}, Tang Feiyang², Jian Jingwei², Yuan Shuosheng², Xu Xiaomei^{1,2}

1. Dept. of Orthodontics, The Affiliated Stomatological Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Oral and Maxillofacial Reconstruction and Regeneration of Luzhou Key Laboratory, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Supported by: Sichuan Science and Technology Program (2023ZYD0112); College Student Innovation and Entrepreneurship Project (2023463); Luzhou Science and Technology Program (2024LZXNYDJ041)

Correspondence: Xu Xiaomei, E-mail: xuxiaomei@swmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** Investigating the protective effect of naringenin (NAR) on the osteogenic potential of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) under oxidative stress and its related mechanisms. **Methods** The oxidative damage model of hPDLSCs was established using hydrogen peroxide (H₂O₂) and the hPDLSCs were treated with different concentrations of NAR and

[收稿日期] 2024-12-24; **[修回日期]** 2025-03-04

[基金项目] 四川省科技计划项目(2023ZYD0112);大学生创新创业项目(2023463);泸州市科技计划项目(2024LZXNYDJ041)

[第一作者] 张丽, 医师, 硕士, E-mail: 1694903428@qq.com

[通信作者] 徐晓梅, 教授, 博士, E-mail: xuxiaomei@swmu.edu.cn

0.5 $\mu\text{mol/L}$ forkhead box protein O-1 (FOXO1) inhibitor AS1842856. After that, the cell counting kit-8 (CCK8) was used to determine the optimal concentrations of H_2O_2 and NAR. The alkaline phosphatase (ALP) staining and real time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) were employed to assess the expression of ALP, runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and osteocalcin (OCN) in hPDLSCs of each group. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining were utilized to evaluate the expression of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and lactate dehydrogenase (LDH) in hPDLSCs. Meanwhile, qRT-PCR and western blot were used to detect the expression levels of FOXO1 and β -catenin, both are pathway related genes and proteins. **Results** H_2O_2 exposure led to an increase in oxidative damage in hPDLSCs, characterized by a rise in intracellular ROS levels and increased expression of MDA and LDH ($P<0.05$). At the same time, the osteogenic differentiation ability of hPDLSCs decreased, as evidenced by lighter ALP staining and reduced expression levels of osteogenic differentiation-related genes ALP, RUNX2 and OCN ($P<0.05$). Co-treatment with NAR alleviated the oxidative damage in hPDLSCs, enhanced their antioxidant capacity, and restored their osteogenic ability. The FOXO1 inhibitor AS1842856 downregulated the expression of β -catenin ($P<0.05$) and significantly diminished both the antioxidant effect of NAR and its ability to restore osteogenesis ($P<0.05$). **Conclusion** NAR can enhance the antioxidant capacity of hPDLSCs by activating the FOXO1/ β -catenin signaling pathway within hPDLSCs, thereby mitigating oxidative stress damage and alleviating the loss of osteogenic capacity.

[Key words] periodontal ligament stem cells; forkhead box protein O-1/ β -catenin signaling pathway; oxidative stress; naringenin; osteogenic differentiation

牙周炎是由病原微生物及局部刺激引起的慢性炎症性疾病, 可导致牙周支持组织的丧失, 是引起成年人牙齿缺失的重要原因^[1]。传统的牙周治疗如龈下刮治、激光^[2]、引导性组织再生术^[3]等可在一定程度上去除牙周病原体, 增加牙周附着, 但这些方法并不能恢复牙周组织原来的自然形态和功能。干细胞组织工程有望成为牙周炎治疗的新方法。

然而, 虽然人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs) 具有多向分化潜能, 是理想的组织再生来源^[4]; 但在牙周炎等炎症环境下, 细胞处于氧化应激状态, 其成骨能力会受损^[5]。因此, 改善氧化应激状态下 hPDLSCs 的抗氧化能力和成骨能力可能是牙周炎治疗获得良好效果的关键。

叉头转录因子 1/ β -连环蛋白 (forkhead box protein O-1/ β -catenin, FOXO1/ β -catenin) 信号通路是重要的氧化防御通路, 在骨代谢的调控中也起着重要的作用^[6]。叉头转录因子 1 (forkhead box protein O-1, FOXO1) 是一种涉及一系列细胞内功能的转录因子, 其可介导包括细胞的增殖、分化、凋亡、能量代谢以及氧化应激等反应^[7-8]。同时也是一种有效的氧化应激抑制剂^[9-10]。研究^[11]表明, FOXO1 可通过对抗过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和氧化应激来调节成骨细胞的新骨形成。但对于 FOXO1/ β -catenin 信号通路在牙

周炎治疗中发挥的作用, 目前尚不明确。

柚皮素 (naringenin, NAR) 是柚皮苷的苷元, 属二氢黄酮类化合物, 国内外药理学研究表明具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗纤维化等多种药理活性^[12]。NAR 可预防肝脏的氧化应激^[13], 缓解糖尿病相关并发症^[14], 促进骨髓间充质干细胞^[15]及 hPDLSCs^[16-17]的成骨分化; 也可通过上调沉默信息调节因子 1/叉头转录因子 1 (silent information regulator 1/ forkhead box protein O-1, SIRT1/FOXO1) 信号通路的表达抑制氧化应激、减轻脑缺血/再灌注损伤^[18]。这提示 FOXO1 可能参与了柚皮素的生物调节作用。但目前对于 NAR 在牙周炎治疗中的作用及其潜在分子机制仍尚不明确。

因此, 本研究拟通过过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 诱导构建 hPDLSCs 氧化损伤模型^[19], 探讨 NAR 对氧化应激状态下 hPDLSCs 的抗氧化及抗成骨损伤作用的潜在分子机制, 以期为 NAR 在牙周炎治疗中的应用提供实验基础及理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

NAR (纯度>98%, 上海思域化工科技有限公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (杭州四季青生物工程材料有限公司); 胰蛋白酶、 α -MEM 培养基、青-链霉素溶液、细胞计数试剂盒

(cell counting kit-8, CCK8)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒、BCIP/NBT 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 显色试剂盒、活性氧检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 30% H_2O_2 溶液 (Sigma 公司, 美国); 抗 FOXO1 兔抗体、抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 兔抗体、抗 β -catenin 兔抗体 (abcam 公司, 美国); 总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR (湖南艾科瑞生物工程有限公司); 总蛋白提取试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司); AS1842856 (MedChemExpress 公司, 美国)。

1.2 hPDLSCs 的分离、培养及鉴定

经西南医科大学附属口腔医院伦理委员会批准 (编号: 20221107003), 收集 10~18 周岁患者因正畸需要而拔除的健康前磨牙 (患者及家属均知情同意)。

刮取牙根中 1/3 处的牙周膜组织, 使用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的培养基于 5% CO_2 培养箱中培养。待原代细胞处于对数生长期时, 通过有限稀释法进行纯化后扩大培养, 并采用流式细胞术、成骨诱导和成脂诱导对获得的 hPDLSCs 进行鉴定。

1.3 实验设计

将 hPDLSCs 置于不同浓度的 H_2O_2 (0、100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$) 中干预 24 h 后, 利用 CCK8 法筛选出最适浓度的 H_2O_2 用以构建 hPDLSCs 氧化损伤模型。

然后, 使用 CCK8 法检测不同浓度 NAR (0、5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 的细胞毒性及其对氧化应激状态下 hPDLSCs 细胞活性的影响, 筛选出适宜浓度的 NAR 用于后续实验。再以正常 hPDLSCs 为空白对照组 (Control 组), 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 干预下的 hPDLSCs 为阴性对照组 (300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组), 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 分别与 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ NAR 共同作用下的 hPDLSCs 为实验组 (H_2O_2 +5 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组、 H_2O_2 +10 $\mu\text{mol/L}$ NAR 组), 检测 NAR 对 H_2O_2 所致的氧化应激状态下 hPDLSCs 成骨损伤的保护作用及抗氧化作用。

最后, 使用 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 FOXO1 特异性抑制剂 AS1842856 进一步验证 FOXO1/ β -catenin 信号通路在 NAR 减轻 hPDLSCs 氧化应激及保护成骨潜能中的作用。为此, 将实验设计为以下 4 组: H_2O_2 组 (加入 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)、 H_2O_2 +NAR 组 (加入 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 10 $\mu\text{mol/L}$ NAR)、 H_2O_2 +AS 组 (加入 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AS1842856),

以及 H_2O_2 +NAR+AS 组 (同时加入 300 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 、10 $\mu\text{mol/L}$ NAR 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AS1842856)。

1.4 CCK8 检测

取 P3 代 hPDLSCs, 以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每组设置 5 个复孔。待细胞完全贴壁后, 每孔按实验分组加入各自的培养基。继续培养 24 h 后, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK8 试剂的完全培养基, 在培养箱内避光孵育 30 min 后, 于酶标仪上检测各孔在 450 nm 处的吸光度值并对其进行统计分析。

1.5 ALP 染色

将 P3 代 hPDLSCs 以 2×10^5 个/孔的量接种于 6 孔板内, 待细胞融合度达 80% 时, 根据实验分组分别加入各自的培养基继续诱导培养 3 d。然后按 NBT/BCIP 碱性磷酸酶显色试剂 (蓝色) 说明书对各组细胞进行染色, 光镜下观察 ALP 的染色情况并拍照。

1.6 实时荧光定量反转录聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)

将 P3 代 hPDLSCs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板内, 待细胞融合度达 80% 时, 根据实验分组分别加入各自的培养基。继续培养 24 h, 再按照 PCR 试剂盒说明书进行后续操作。

获得 qRT-PCR 数据结果后, 以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算成骨相关基因 ALP、Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 以及信号通路相关基因 FOXO1 和 β -catenin 的相对表达量, 并进行统计分析。所用引物序列见表 1。

1.7 蛋白印迹法 (Western blot)

将 P3 代 hPDLSCs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板内, 待细胞融合度达 80% 时, 根据实验分组分别加入各自的培养基继续培养 24 h。然后提取各组细胞的总蛋白, 按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书进行蛋白浓度测定, 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, 快速封闭液封闭 20 min 后, 分别加入 1:2 000 稀释的 FOXO1、 β -catenin 和 β -actin 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 经含 Tween 20 的 Tris 盐缓冲液 (Tris Buffered Saline Tween, TBST) 洗膜后, 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗孵育 1 h, TBST 再次洗膜后, 采用电化学发光法 (electrochemiluminescence, ECL) 显影, 全自动化学发光图像分析系统采集图像,

并应用 Image J 软件对所得图像进行分析。

表 1 引物设计

Tab 1 The design of primer

引物名称	序列
RUNX2	F: GAACCCAGAAGGCACAGACA R: GGCTCAGGTAGGAGGGGTAA
ALP	F: GCCGCCCGCTTTAACC R: GTCCCACTGACTTCCTGCTT
OCN	F: TCCTTTGGGGTTTGGCCTAC R: CCAGCCTCCAGCACTGTTTA
FOXO1	F: ATTCGGTCATGCCAGCGTAT R: CAAGCGTTCATGGCAGATG
β-catenin	F: CCTAGCTGGTGGACTGCAGA R: CACCACTGGCCAGAATGATGA
β-actin	F: CGACCCGTCTACAGGTGAAC R: GAGAGGGACTCAATCAGCCG

1.8 细胞内 ROS 的测量

将 P3 代 hPDLSCs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板内，待细胞融合度达 80% 时，根据实验分组分别加入各自的培养基。处理细胞 24 h 后，加入含 $10 \mu\text{mol/L}$ 活性氧荧光探针 (DCFH-DA) 的基础培养基 1 mL 孵育细胞 20 min，荧光显微镜下观

察拍照。

1.9 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

将 P3 代 hPDLSCs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板内，待细胞融合度达 80% 时，根据实验分组分别加入各自的培养基。处理细胞 24 h 后收集上清液和细胞裂解液，按试剂盒说明书对 MDA、LDH 含量进行测量。

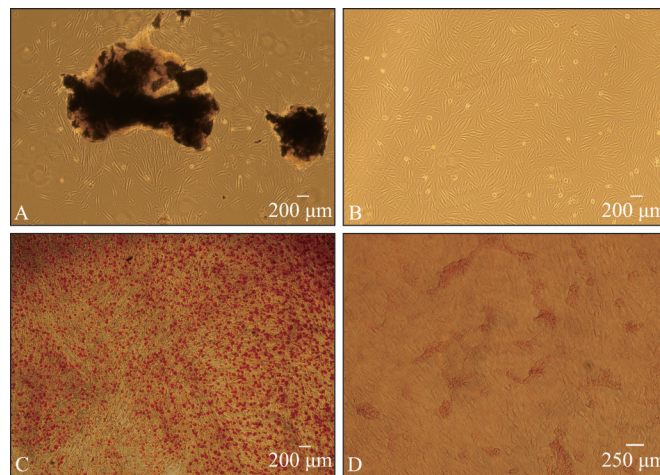
1.10 统计学处理

采用 Graph Pad Prism 6 软件对实验数据进行统计分析，计量资料以均数±标准差表示，多组间均数比较用单因素方差分析，组间多重比较用 LSD 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hPDLSCs 的鉴定及 H_2O_2 和 NAR 对 hPDLSCs 活性的影响

分离纯化获得 hPDLSCs (图 1A、B) 并对其进行茜素红及油红 O 染色，结果显示其具有良好的成骨、成脂分化潜能 (图 1C、D)。



A: 原代细胞; B: 纯化后的 hPDLSCs; C: hPDLSCs 经成骨诱导后茜素红染色; D: hPDLSCs 经成脂诱导后油红 O 染色。

图 1 细胞鉴定

Fig 1 Cell identification

流式细胞术结果显示其 CD44、CD90 抗原阳性表达，CD34、CD45 抗原阴性表达 (图 2)。

用不同浓度 H_2O_2 处理后，当 H_2O_2 浓度增加到 $300 \mu\text{mol/L}$ 时，hPDLSCs 的细胞活力与 $0 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组相比明显下降，差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3A)。

因此，在后续的实验中，用 $300 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 24 h 诱导 hPDLSCs 的氧化应激。

CCK8 结果显示， $0 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 的 NAR 处理对

hPDLSCs 的细胞活力无显著影响 ($P > 0.05$) (图 3B)，说明 $50 \mu\text{mol/L}$ 以内的 NAR 对 hPDLSCs 无毒性。

用 NAR 与 H_2O_2 共处理 24 h 时，当 NAR 浓度在 $5 \mu\text{mol/L}$ 时即可减弱 H_2O_2 的作用 ($P < 0.05$)，且 NAR 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时其对细胞的保护作用较 $5 \mu\text{mol/L}$ 时更好 ($P < 0.05$)；但 NAR 浓度在 $10 \sim 50 \mu\text{mol/L}$ 时，其对细胞的保护作用无明显差异 ($P > 0.05$) (图 3C)。

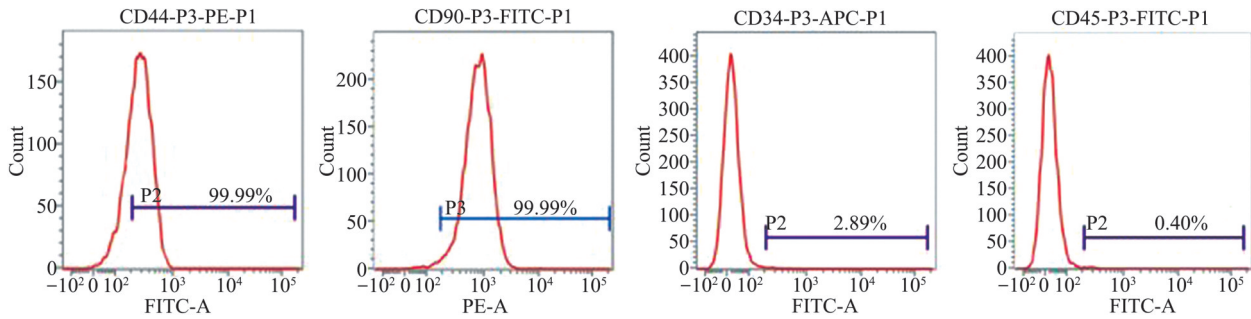
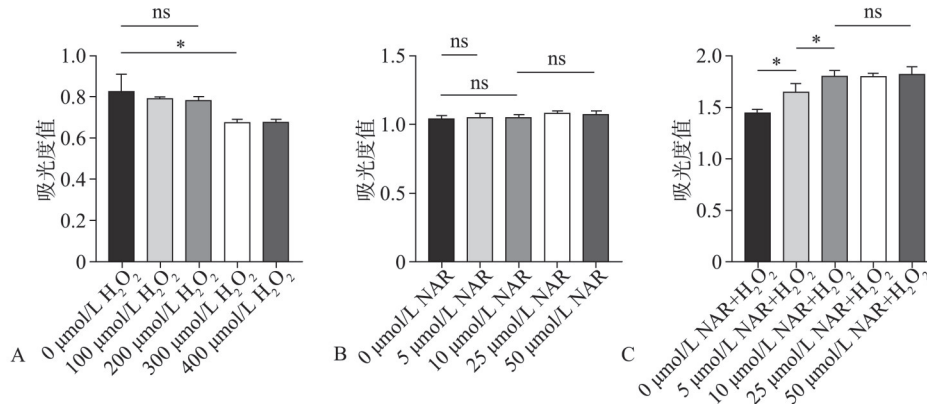


图 2 hPDLSCs的流式细胞术结果

Fig 2 The flow cytometry results of hPDLSCs



A: 不同浓度H₂O₂对hPDLSCs活性的影响; B: 不同浓度NAR对hPDLSCs活性的影响; C: 300 μmol/L H₂O₂条件下不同浓度NAR对hPDLSCs活性的影响。*代表P<0.05, ns代表P>0.05。

图 3 NAR对hPDLSCs活性的影响

Fig 3 The effects of H₂O₂ and NAR on the activity of hPDLSCs

因此, 笔者选择 10 μmol/L NAR 处理进行其抗氧化保护研究, 并以 5 μmol/L NAR 处理作为低水平保护对照组。

2.2 NAR对氧化应激状态下hPDLSCs成骨潜能的保护作用及抗氧化作用

与空白对照组相比, 300 μmol/L H₂O₂组成骨相关基因 ALP、RUNX2、OCN 的表达水平均明显降低, 差异有统计学意义 (P<0.05); 而 H₂O₂+5 μmol/L NAR 组较 300 μmol/L H₂O₂ 组可在一定程度上提高其成骨相关基因的表达水平 (P<0.05), 且 H₂O₂+10 μmol/L NAR 组成骨相关基因的表达水平进一步提高 (P<0.05) (图 4A~C)。

ALP 染色结果显示: 300 μmol/L H₂O₂ 处理组 ALP 染色比空白对照组浅; H₂O₂+5 μmol/L NAR 组与 H₂O₂+10 μmol/L NAR 组 ALP 染色均比空白对照组浅, 但均深于 300 μmol/L H₂O₂ 处理组, 且 H₂O₂+10 μmol/L NAR 处理组深于 H₂O₂+5 μmol/L NAR 处理组 (图 4D、E)。

DCFH-DA 染色结果表明, 300 μmol/L H₂O₂ 处理组 ROS 水平较空白对照组明显升高, NAR 处理可降低细胞内 ROS 水平, 且 H₂O₂+10 μmol/L NAR

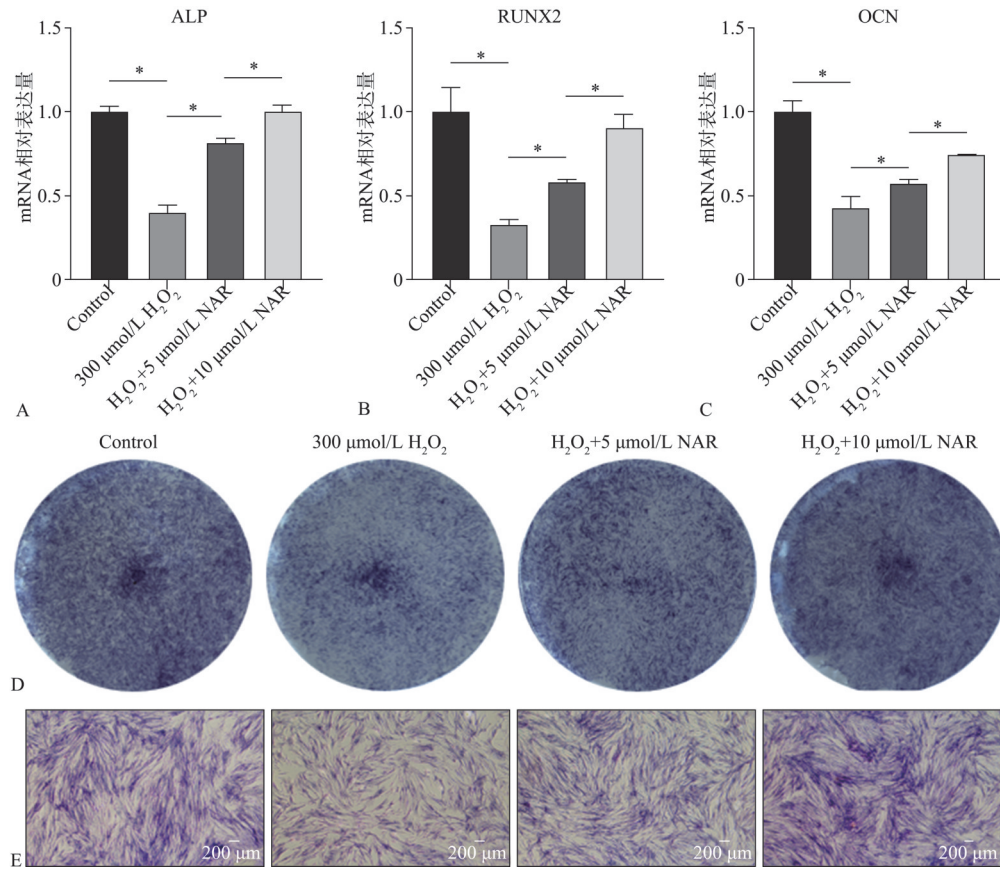
处理组 ROS 水平降低更为明显 (图 5A)。

ELISA 结果显示 300 μmol/L H₂O₂ 处理组 LDH、MDA 漏出率较空白对照组明显升高, 其差异有统计学意义 (P<0.05); 经 NAR 干预的细胞 LDH、MDA 漏出率较 300 μmol/L H₂O₂ 处理组明显降低 (P<0.05), 且 H₂O₂+10 μmol/L NAR 处理组较 H₂O₂+5 μmol/L NAR 处理组降低幅度更大 (P<0.05) (图 5B、C)。

2.3 NAR上调hPDLSCs中FOXO1、β-catenin基因及蛋白的表达

为了探究 NAR 对氧化应激状态下 hPDLSCs 的成骨潜能保护作用及抗氧化作用的潜在机制, 笔者检测了 hPDLSCs 中 FOXO1 和 β-catenin 的基因及蛋白表达水平。

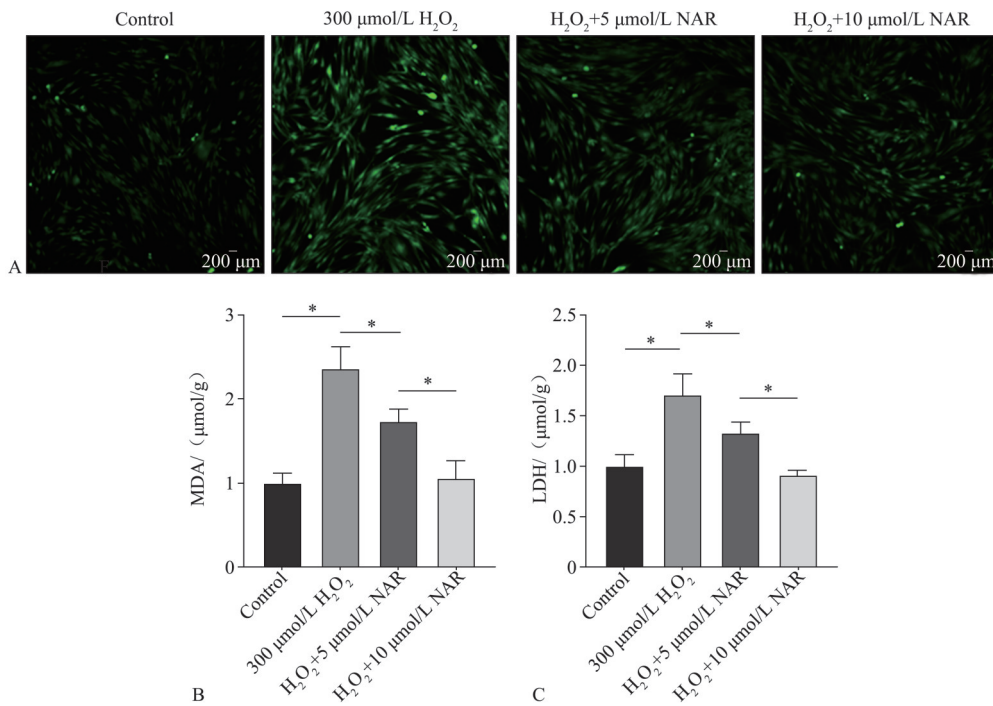
qRT-PCR 和 Western Blot 结果均显示, 与对照组相比, 300 μmol/L H₂O₂ 处理组 FOXO1 和 β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 (P<0.05), 但 NAR 共处理 (H₂O₂+NAR 组) 可增加 FOXO1 和 β-catenin 的 mRNA 和蛋白表达, 且 10 μmol/L NAR (H₂O₂+10 μmol/L NAR 组) 效果更为显著 (图 6)。



A: 各组成骨相关基因 ALP mRNA 的表达水平; B: 各组成骨相关基因 RUNX2 mRNA 的表达水平; C: 各组成骨相关基因 OCN mRNA 的表达水平; D: 各组第3天时的 ALP 染色结果大体观; E: 各组第3天时的 ALP 染色结果镜下观 (×40)。*代表 P<0.05。

图 4 NAR 对 H₂O₂ 诱导的 hPDLSCs 成骨能力的影响

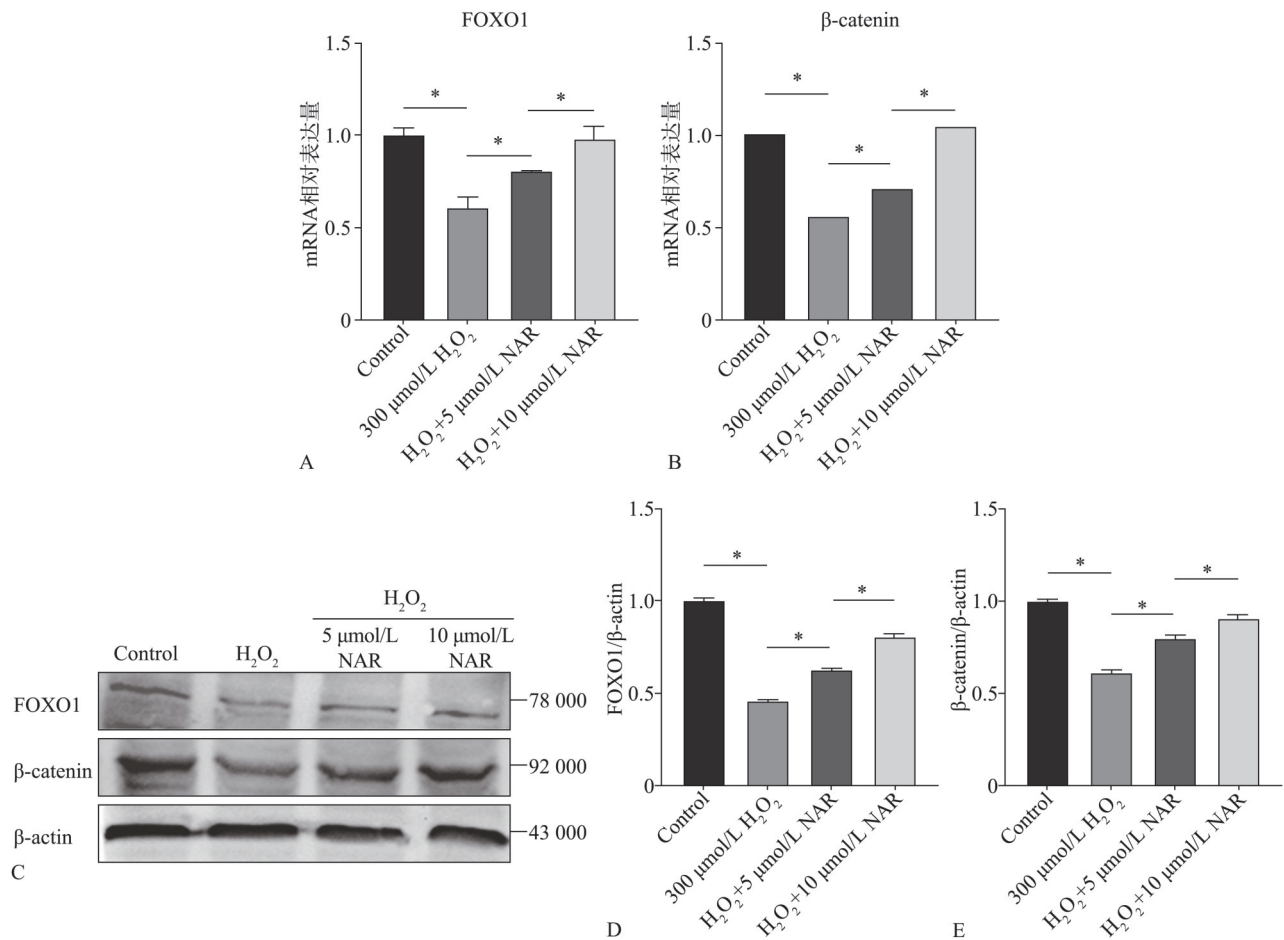
Fig 4 Effect of NAR on the osteogenic abilities of H₂O₂-induced hPDLSCs



A: ROS 检测结果 (×40); B: 各组 MDA 水平检测结果; C: 各组 LDH 水平检测结果。*代表 P<0.05。

图 5 NAR 对 H₂O₂ 诱导的 hPDLSCs 的氧化应激状态的影响

Fig 5 Effect of NAR on the oxidative stress of H₂O₂-induced hPDLSCs



A: FOXO1 mRNA 表达水平; B: β-catenin mRNA 表达水平; C: FOXO1、β-catenin 蛋白表达水平定性分析; D: FOXO1 蛋白表达半定量分析; E: β-catenin 蛋白表达半定量分析。*代表 $P < 0.05$ 。

图 6 NAR 对 H₂O₂ 诱导的 hPDLSCs 中 FOXO1、β-catenin 的调控

Fig 6 Regulation of FOXO1, β-catenin by NAR in H₂O₂-induced hPDLSCs

2.4 NAR 通过 FOXO1/β-catenin 信号通路调节 hPDLSCs 的骨形成与氧化应激状态

qRT-PCR 和 Western blot 结果均显示, 使用 FOXO1 抑制剂 AS1842856 后, 会在一定程度上减弱 NAR 上调 hPDLSCs 中 β-catenin mRNA ($P < 0.05$) (图 7A) 和蛋白表达的作用 ($P < 0.05$) (图 7B、C)。

FOXO1 抑制剂 AS1842856 也可在一定程度上阻断 NAR 对 hPDLSCs 中成骨相关基因 ALP、RUNX2、OCN 表达的促进作用 ($P < 0.05$) (图 8 A~C); ALP 染色也提示 NAR 可改善 H₂O₂ 处理导致的成骨能力降低, 而 FOXO1 抑制剂 AS1842856 可减弱这一上调作用 (图 8D、E)。

同时, NAR 共处理可明显抑制 H₂O₂ 处理导致的 ROS 上升, 而 AS1842856 处理后则会减弱这一抑制作用 (图 9A)。

ELISA 结果也显示, NAR 共处理组 MDA、LDH 的表达低于 H₂O₂ 组, 而 FOXO1 抑制剂 AS-

1842856 则可在一定程度上提高其表达水平 ($P < 0.05$) (图 9B、C)。

3 讨论

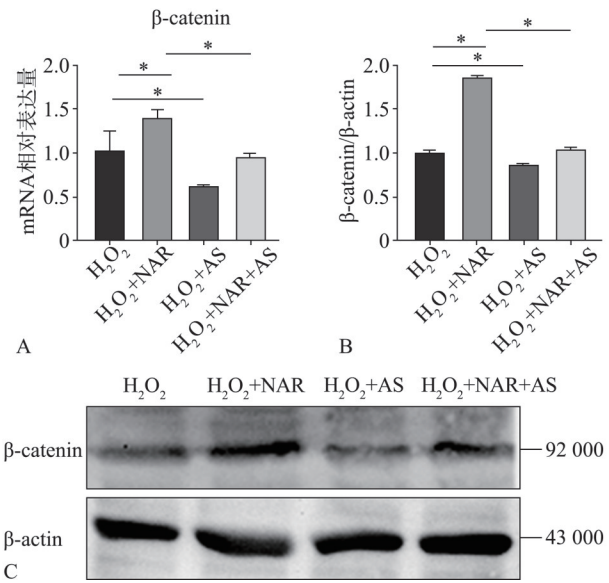
牙周炎症条件下, 菌斑及菌斑微生物如牙龈卟啉单胞菌^[20]等可破坏牙齿周围软硬组织, 引起白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 等的释放, 致使多形核粒细胞的数量和活性增加, 进而释放 ROS, 导致氧化应激状态的产生以作为宿主对感染的反应。ROS 的集聚可诱导牙龈成纤维细胞的凋亡, 激活破骨细胞, 损伤 hPDLSCs 的成骨能力, 最终导致牙龈组织、牙周韧带和牙槽骨的氧化损伤增加^[21]。

本研究中, 笔者发现 300 μmol/L H₂O₂ 即可导致 hPDLSCs 的细胞活力明显降低; 且经 300 μmol/L H₂O₂ 干预后, hPDLSCs 内 ROS 水平、MDA 及 LDH

的表达量均明显增加，但其成骨相关基因（ALP、RUNX2及OCN）的表达及ALP染色却均降低，证实300 μmol/L的H₂O₂可诱导hPDLSCs的氧化应激状态，且氧化应激状态可损伤hPDLSCs的成骨能力。这与其他学者^[21-22]的研究结果一致。

NAR是一种常见的植物化学物，广泛存在于各类膳食纤维（如柑橘类水果、番茄、无花果等）及中草药（如骨碎补等）中^[23]。大量研究表明，NAR具有抑制氧化应激状态，保护各种细胞及组织免受氧化损伤、抗炎和促进骨再生等作用^[24]，且毒性较低^[25]，故其在牙周炎的治疗中可能具有一定的临床应用前景。

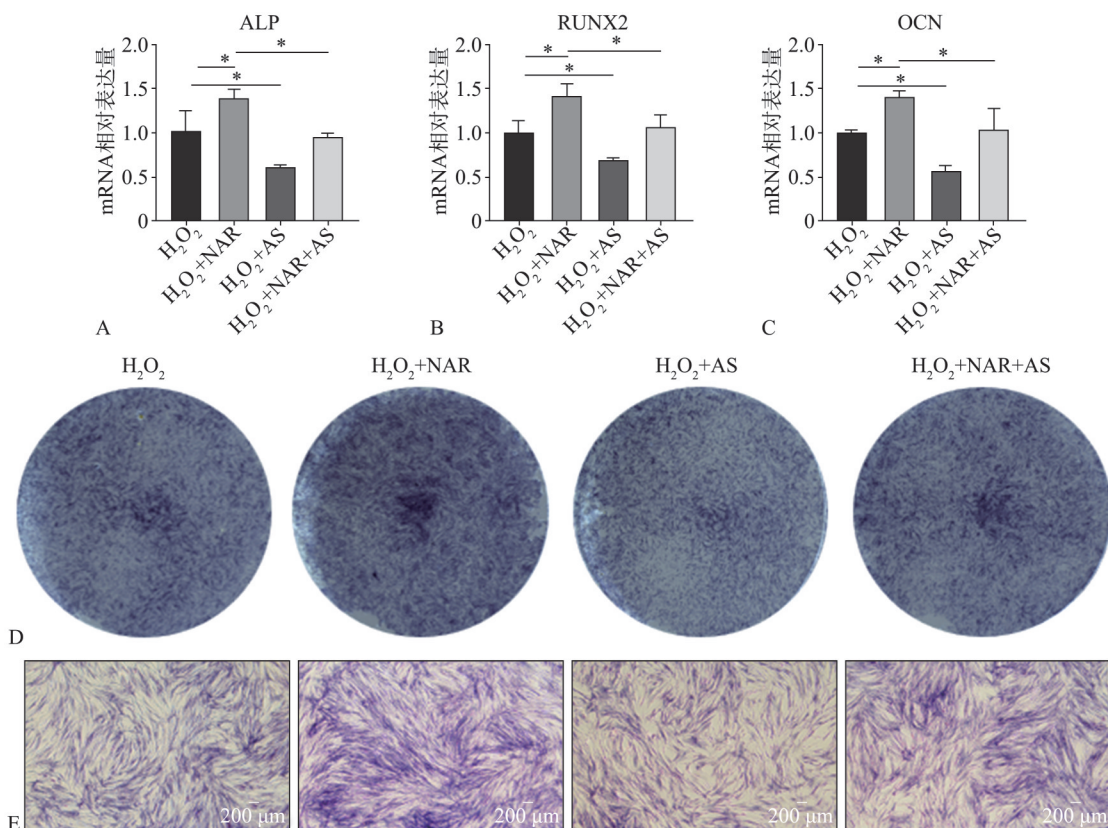
本研究中，经NAR（5、10 μmol/L）处理后，H₂O₂所致的hPDLSCs氧化应激状态得到改善，其细胞活力和成骨能力也均得到一定程度的恢复。说明适宜浓度的NAR（0~50 μmol/L）安全无毒，且可激活细胞抗氧化系统以保护hPDLSCs免受H₂O₂诱导的氧化损伤，并有助于部分恢复H₂O₂导致的细胞成骨能力受损。上述结果提示NAR有望成为牙周炎治疗的潜在新药物。



A: 使用FOXO1抑制剂后β-catenin mRNA表达水平; B: 使用FOXO1抑制剂后β-catenin蛋白表达水平半定量分析; C: 使用FOXO1抑制剂后β-catenin蛋白表达水平定性分析。*代表P<0.05。

图7 FOXO1抑制剂对hPDLSCs中β-catenin的调控

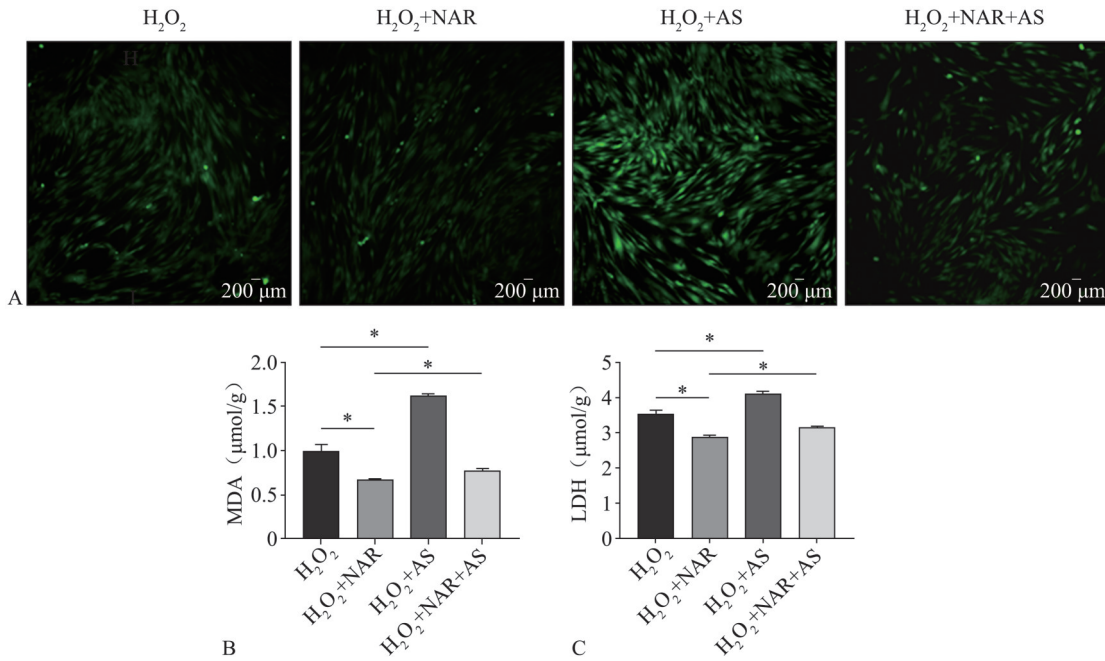
Fig 7 Regulation of β-catenin in hPDLSCs by FOXO1 inhibitors



A: 成骨相关基因ALP mRNA表达水平; B: 成骨相关基因RUNX2 mRNA表达水平; C: 成骨相关基因OCN mRNA表达水平; D: 各组第3天时的ALP染色结果大体观; E: 各组第3天时的ALP染色结果镜下观(×40)。*代表P<0.05。

图8 FOXO1/β-catenin信号通路介导NAR对H₂O₂诱导的hPDLSCs的促成骨作用

Fig 8 NAR promote the osteogenic differentiation ability of hPDLSCs induced by H₂O₂ via FOXO1/β-catenin signaling pathway



A: 各组ROS检测结果; B: 各组MDA的表达水平; C: 各组LDH的表达水平。*代表P<0.05。

图9 FOXO1/β-catenin信号通路介导NAR对H₂O₂诱导的hPDLSCs的抗氧化保护作用

Fig 9 The antioxidant effect of NAR for hPDLSCs induced by H₂O₂ via FOXO1/β-catenin signaling pathway

FOXO1不仅是细胞氧化还原平衡中最主要的调控因子,可在各种由氧化应激导致的疾病中作为氧化应激的有效抑制剂^[9-10,26];同时也对骨改建的调控起着至关重要的决定性作用^[27]。

据报道,FOXO1与氧化应激之间存在交互影响,FOXO1可通过靶向激活抗氧化相关基因进而调控细胞抗氧化因子的产生和氧化应激反应,同时FOXO1的活性又受到氧化应激相关产物(如ROS)的调节^[28]。在骨改建方面,氧化应激状态会导致FOXO1发生核转位和转录激活。进入细胞核内且处于激活状态的FOXO1一方面可直接与下游成骨分化相关基因RUNX2、ALP、OCN的启动子靶向结合,促进成骨相关基因的转录,进而发挥其促成骨分化的作用^[29];另一方面,细胞核内的FOXO1也可作为转录阻遏因子,通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体γ的转录促进成骨细胞生成^[30]。

近年来,有学者^[31]发现,β-catenin不仅是细胞成骨分化所必需的关键因子,同时也是FOXO1下游的关键细胞信号调节蛋白,其对氧化应激状态下FOXO1的激活至关重要。

在氧化应激状态下,进入细胞核内的FOXO1会与TCF/LEF复合物竞争性地结合β-catenin,激活FOXO1的转录活性^[32],促使经典的Wnt/β-catenin信号通路向FOXO1/β-catenin信号通路转

变,进而对成骨分化产生抑制作用^[33]。FOXO1/β-catenin信号通路的加入使得FOXO1在骨组织的改建过程中起着重要的双向调控作用^[29]。

目前大量研究对FOXO1在氧化应激状态下骨改建中的作用进行了探索,证实FOXO1对氧化应激状态下的成骨分化具有正向促进作用。

Wang等^[34]通过实验发现FOXO1在牙周炎患者的牙周组织中低表达。Huang等^[26]也观察到过表达FOXO1可降低TNF-α诱导的炎性hPDLSCs细胞内ROS水平,增加炎性hPDLSCs的抗氧化能力。同时,上述研究均证实过表达FOXO1可促进TNF-α诱导的^[26]和牙周炎患者牙周组织来源的^[34]炎性hPDLSCs的成骨分化。王泽凤等^[35]的研究也发现,红景天苷可通过激活FOXO1/β-catenin通路增强抗氧化应激作用,进而实现对骨质疏松大鼠的保护。

与此类似,笔者在本研究中也发现,H₂O₂作用下hPDLSCs中FOXO1和β-catenin的基因及蛋白表达均降低;而NAR可上调H₂O₂所致的氧化应激状态下hPDLSCs中FOXO1和β-catenin的基因及蛋白表达;且使用FOXO1抑制剂AS1842856后,hPDLSCs中β-catenin的基因及蛋白表达降低,NAR对氧化应激状态下hPDLSCs的保护作用减弱,其成骨潜能也降低;提示NAR对氧化应激状态下hPDLSCs氧化损伤及成骨潜能的保护作用部分是通过激活FOXO1/β-catenin通路实现的。

但是, 因为 FOXO1 和 β -catenin 两者均具有核转位趋势^[32], 且两者均可直接或间接参与细胞成骨分化的各个部分, 并与细胞内诸多因子及信号通路之间存在交互影响, 故对该信号通路在细胞成骨分化中的具体影响及深层机制仍尚有待进一步研究。

综上所述, 本研究证实, NAR 可抑制 H₂O₂ 所致的 hPDLSCs 的氧化应激及成骨潜能的损伤, 且该作用部分与 FOXO1/ β -catenin 信号通路有关。这将在一定程度上为牙周炎的治疗以及 NAR 的临床应用提供新的理论参考。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Reynolds I, Duane B. Periodontal disease has an impact on patients' quality of life[J]. Evid Based Dent, 2018, 19(1): 14-15.
- [2] Seyed-Monir A, Seyed-Monir E, Mihandoust S. Evaluation of 940-nm diode laser effectiveness on pocket depth, clinical attachment level, and bleeding on probing in chronic periodontitis: a randomized clinical single-masked split-mouth study[J]. Dent Res J (Isfahan), 2023, 20: 113.
- [3] Kikionis S, Iliou K, Karra AG, et al. Development of bi- and tri-layer nanofibrous membranes based on the sulfated polysaccharide carrageenan for periodontal tissue regeneration[J]. Mar Drugs, 2023, 21(11): 565.
- [4] di Vito A, Bria J, Antonelli A, et al. A review of novel strategies for human periodontal ligament stem cell *ex vivo* expansion: are they an evidence-based promise for regenerative periodontal therapy[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7798.
- [5] Ruangsawasdi N, Boonnak N, Pruksaniyom C, et al. Xanthones isolated from cratoxylum cochinchinensis reduced oxidative stress in periodontal ligament stem cells [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14675.
- [6] Ma XL, Tian Y, Xue KY, et al. Kaempferide enhances antioxidant capacity to promote osteogenesis through FoxO1/ β -catenin signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 911: 174555.
- [7] Zhang CL, Tan ZQ, Xie YZ, et al. Apoptosis mediates lesions induced by oxidative stress through the JNK-FoxO1 pathway[J]. Front Aging Neurosci, 2019, 11: 243.
- [8] Ren BC, Zhang YF, Liu SS, et al. Curcumin alleviates oxidative stress and inhibits apoptosis in diabetic cardiomyopathy via Sirt1-Foxo1 and PI3K-Akt signalling pathways[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(21): 12355-12367.
- [9] Huang HH, Liao D, He B, et al. Deoxyshikonin inhibited rotavirus replication by regulating autophagy and oxidative stress through SIRT1/FoxO1/Rab7 axis[J]. Microb Pathog, 2023, 178: 106065.
- [10] Wang LY, Zhao YX, Su ZY, et al. Ginkgolide A targets forkhead box O1 to protect against lipopolysaccharide-induced septic cardiomyopathy[J]. Phytother Res, 2023, 37(8): 3309-3322.
- [11] Zhou J, Wang F, Ma Y, et al. Vitamin D3 contributes to enhanced osteogenic differentiation of MSCs under oxidative stress condition via activating the endogenous antioxidant system[J]. Osteoporos Int, 2018, 29(8): 1917-1926.
- [12] Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of naringenin: a review of clinical trials [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2019, 12(1): 11.
- [13] Ji MT, Deng Z, Rong XY, et al. Naringenin prevents oxidative stress and inflammation in LPS-induced liver injury through the regulation of lncRNA-mRNA in male mice[J]. Molecules, 2022, 28(1): 198.
- [14] Raina N, Haque S, Tuli HS, et al. Optimization and characterization of a novel antioxidant naringenin-loaded hydrogel for encouraging re-epithelization in chronic diabetic wounds: a preclinical study[J]. ACS Omega, 2023, 8(38): 34995-35011.
- [15] Zhou X, Zhang Z, Jiang WW, et al. Naringenin is a potential anabolic treatment for bone loss by modulating osteogenesis, osteoclastogenesis, and macrophage polarization[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 872188.
- [16] Zhang L, He HY, Zhang M, et al. Assessing the effect and related mechanism of naringenin on the proliferation, osteogenic differentiation and endothelial differentiation of human periodontal ligament stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534: 337-342.
- [17] 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.
- 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 chemo-

- kine receptor 4 signaling axis stimulated by lipopolysaccharide[J]. West Chin J Stomatol, 2023, 41(2): 175-184.
- [18] 冯璐, 孙志梅, 陈雅静, 等. Foxo1 与肝糖代谢的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(19): 2468-2470, 2475.
- Feng L, Sun ZM, Chen YJ, et al. Research status of Foxo1 and liver glucose metabolism[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(19): 2468-2470, 2475.
- [19] Wu WL, Yang NF, Feng XJ, et al. Effect of vitamin C administration on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in periodontal ligament cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 242-248.
- [20] Gasmi Benahmed A, Kumar Mujawdiya P, Noor S, et al. *Porphyromonas gingivalis* in the development of periodontitis: impact on dysbiosis and inflammation[J]. Arch Razi Inst, 2022, 77(5): 1539-1551.
- [21] Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, et al. Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis[J]. Front Physiol, 2017, 8: 351.
- [22] Feng YL, Jiang XT, Ma FF, et al. Resveratrol prevents osteoporosis by upregulating FoxO1 transcriptional activity[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(1): 202-212.
- [23] Lu J, Chen J, Li SY, et al. Naringin and naringenin: potential multi-target agents for Alzheimer's disease[J]. Curr Med Sci, 2024, 44(5): 867-882.
- [24] Khaled SS, Soliman HA, Abdel-Gabbar M, et al. Naringin and naringenin counteract taxol-induced liver injury in Wistar rats via suppression of oxidative stress, apoptosis and inflammation[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2023, 30(39): 90892-90905.
- [25] Yajima S, Sakata R, Watanuki Y, et al. Naringenin suppresses the hyperexcitability of trigeminal nociceptive neurons associated with inflammatory hyperalgesia: replacement of NSAIDs with phytochemicals[J]. Nutrients, 2024, 16(22): 3895.
- [26] Huang X, Chen H, Xie Y, et al. FoxO1 overexpression ameliorates TNF- α -induced oxidative damage and promotes osteogenesis of human periodontal ligament stem cells via antioxidant defense activation[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 2120453.
- [27] Rached MT, Kode A, Xu LL, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts[J]. Cell Metab, 2010, 11(2): 147-160.
- [28] Klotz LO, Steinbrenner H. Cellular adaptation to xenobiotics: interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors[J]. Redox Biol, 2017, 13: 646-654.
- [29] Chen D, Gong Y, Xu L, et al. Bidirectional regulation of osteogenic differentiation by the FOXO subfamily of Forkhead transcription factors in mammalian MSCs[J]. Cell Prolif, 2019, 52(2): e12540.
- [30] Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, et al. Redox regulation of FoxO transcription factors[J]. Redox Biol, 2015, 6: 51-72.
- [31] Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, et al. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling[J]. Science, 2005, 308(5725): 1181-1184.
- [32] Li CY, Sheng MW, Lin YB, et al. Functional crosstalk between myeloid Foxo1- β -catenin axis and Hedgehog/Gli1 signaling in oxidative stress response[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(5): 1705-1719.
- [33] Guan H, Tan P, Xie L, et al. FOXO1 inhibits osteosarcoma oncogenesis via Wnt/ β -catenin pathway suppression [J]. Oncogenesis, 2015, 4(9): e166.
- [34] Wang Q, Shi W, Lin SZ, et al. FOXO1 regulates osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the METTL3 signaling pathway[J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 637.
- [35] 王泽凤, 高强, 朱煜, 等. 红景天苷调控 FoxO1/ β -catenin 通路对 2 型糖尿病骨质疏松大鼠的保护作用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(3): 55-60.
- Wang ZF, Gao Q, Zhu Y, et al. Protective effect of salidroside on type 2 diabetic osteoporosis rats by regulating the FoxO1/ β -catenin pathway[J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(3): 55-60.

(本文编辑 洪潇)