

# 基于转录组测序探讨柚皮素对脂多糖作用下人牙周膜干细胞的抗炎作用及相关机制

李俊玉<sup>1,2</sup> 徐晓梅<sup>1,2</sup> 刘兴玉<sup>1,2</sup> 曾婷<sup>1,2</sup> 张丽<sup>1,2</sup> 郑茜<sup>1,2</sup>

1. 西南医科大学附属口腔医院正畸科, 泸州 646000;

2. 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** 联合使用转录组测序 (RNA-seq) 和生信分析, 探究柚皮素 (Nar) 对脂多糖 (LPS) 刺激下的人牙周膜干细胞 (hPDLSCs) 的抗炎作用及机制。**方法** 采用细胞计数试剂盒 (CCK-8)、实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 Nar 对 LPS 刺激下 hPDLSCs 增殖及炎症因子表达情况, 筛选出 Nar 的最佳抗炎浓度。采用 RNA-seq, 以  $|\log_2FC| \geq 1$  且  $P \leq 0.05$  为标准筛选出显著差异基因 (DEGs)。采用火山图分析、京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析、String 数据库及 Cytoscape 的 MCODE 模块筛选核心基因。ELISA、qRT-PCR 和蛋白印迹实验 (Western blot) 检测对核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的影响。**结果** 适宜浓度的 Nar 可减轻 LPS 刺激下 hPDLSCs 的炎症因子表达, 促进其增殖, 20  $\mu$ mol/L Nar 抗炎效果最佳。RNA-seq 提示炎症相关信号通路显著富集。Nar 通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路产生抗炎作用, Nar 与 NF- $\kappa$ B 抑制剂 BAY 11-7802 效果相似。**结论** Nar 可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路发挥抗炎作用。Nar 可能是辅助治疗牙周炎的一种潜在的药效成分。

**[关键词]** 柚皮素; 人牙周膜干细胞; 抗炎作用; 核因子  $\kappa$ B; 转录组测序

**[中图分类号]** Q257 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2024.2023453



本文链接

开放科学标识码

## Anti-inflammatory effects and related mechanisms of naringenin in human periodontal ligament stem cells under lipopolysaccharide stimulation based on RNA sequencing

Li Junyu<sup>1,2</sup>, Xu Xiaomei<sup>1,2</sup>, Liu Xingyu<sup>1,2</sup>, Zeng Ting<sup>1,2</sup>, Zhang Li<sup>1,2</sup>, Zheng Qian<sup>1,2</sup>

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

Supported by: Sichuan Provincial Science and Technology Department Innovation Project (2022YFS0634); Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Project (2023MS080); Luzhou Science and Technology Plan Project (2022-JYJ-116)

Correspondence: Zheng Qian, E-mail: 317041990@qq.com

**[Abstract]** **Objective** RNA sequencing (RNA-seq) and bioinformatic analysis were combined and used to explore the anti-inflammatory effects and mechanisms of naringenin (Nar) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs). **Methods** Cell counting kit-8, quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were adopted to detect the effects of Nar on the proliferation and expression of inflammatory factors in LPS-stimulated hPDLSCs, screening for the optimal anti-inflammatory concentration of Nar. Differentially expressed genes (DEGs) were screened using  $|\log_2FC| \geq 1$  and  $P \leq 0.05$  as criteria. Volcano plot analysis, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis, the String database, and the MCODE module of Cytoscape were utilized to select core genes

**[收稿日期]** 2023-12-26; **[修回日期]** 2024-05-28

**[基金项目]** 四川省科技厅创新专项项目 (2022YFS0634); 四川省中医药管理局面上项目 (2023MS080); 泸州市科技计划项目 (2022-JYJ-116)

**[作者简介]** 李俊玉, 医师, 硕士, E-mail: 601169913@qq.com

**[通信作者]** 郑茜, 医师, 硕士, E-mail: 317041990@qq.com

and enriched pathways. The effects on the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway were verified using ELISA, qRT-PCR, and Western blot. **Results** Appropriate concentrations of Nar could alleviate the expression of inflammatory factors and promote the proliferation of hPDLSCs stimulated by LPS. The best anti-inflammatory effect was achieved with 20  $\mu$ mol/L Nar. RNA-seq showed significant enrichment of inflammation-related signaling pathways. The anti-inflammatory effect of Nar was mediated by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway, similar to the effect of the NF- $\kappa$ B inhibitor BAY 11-7802. **Conclusion** Nar could exert its anti-inflammatory effects by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway, making it a potential therapeutic option for the adjuvant treatment of periodontitis.

**[Key words]** naringenin; human periodontal ligament stem cells; anti-inflammatory effect; nuclear factor  $\kappa$ B; RNA sequencing

牙周炎是一种由牙周致病菌感染引发的慢性炎症性疾病<sup>[1]</sup>。持续的免疫应答与氧化应激状态会导致严重的牙周组织破坏<sup>[2-4]</sup>。传统的牙周治疗难以修复已破坏的牙周组织,而通过干细胞组织工程技术重建受损的牙周组织被认为是可行的<sup>[4-7]</sup>。人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)具备高增殖和再生潜能,是牙周组织再生及免疫调节过程中发挥关键作用的种子细胞<sup>[8-9]</sup>。然而,在牙周炎发展过程中,炎症微环境对hPDLSCs的自我更新与成骨能力产生抑制,进而损害免疫调节,影响牙周组织和牙槽骨的再生与重塑<sup>[10-11]</sup>。为了充分发挥干细胞的治疗潜力,首先需要调节宿主免疫,抑制炎症微环境,这对于维持牙周稳态及实现牙周组织的有效再生至关重要<sup>[12-14]</sup>。

柚皮素(naringenin, Nar)是一种具有抗炎、抗氧化和免疫调节作用的天然类黄酮化合物。在体内外炎症模型中进行了验证,能有效降低多种急性或慢性炎症反应<sup>[15-16]</sup>。有研究<sup>[17]</sup>表明Nar可通过抑制TLR4蛋白降低炎症介质,如诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、环氧酶2(cyclooxygenase-2, Cox-2)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL)-6的表达,从而缓解结肠炎。因此推测其可能通过抑制炎症表达来治疗牙周炎。然而在牙周领域关于Nar抗炎方面研究较少,且对其相关靶基因和通路研究存在差异。有学者<sup>[18]</sup>发现Nar能逆转炎性hPDLSCs的生物学性能,但其机制尚未完全明确。为了简化流程,明确其抗炎相关转录机制,本研究采用高通量转录组测序技术(RNA sequencing, RNA-seq)并进行生物信息学分析,拟探究Nar对炎性hPDLSCs的抗炎作用及相关分

子机制,从而为Nar作为抗炎药物辅助治疗牙周炎提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 hPDLSCs 培养纯化及鉴定

本研究经西南医科大学附属口腔医院伦理委员会批准(20221109001)。本研究使用的hPDLSCs采用组织块贴壁培养法进行培养。参与者均知情同意。收集就诊于西南医科大学附属口腔医院正颌科10~16岁青少年因正畸而拔除的无龋坏、无牙周病的健康前磨牙,刮取牙根部中1/3的牙周膜,置于含10%胎牛血清(上海碧云天生物技术有限公司)、1%青霉素-链霉素溶液(上海碧云天生物技术有限公司)的 $\alpha$ -MEM培养基(武汉普赛诺生命科技有限责任公司)的培养瓶中培养,并进行传代及纯化。使用流式细胞术检测hPDLSCs表面抗体的表达,使用成骨诱导试剂盒(广州赛业生物科技有限公司)和成脂诱导试剂盒(广州赛业生物科技有限公司)分别检测hPDLSCs的成骨和成脂分化能力。根据试剂盒说明书,在hPDLSCs汇合至50%~60%后,分别使用成骨诱导培养基及成脂诱导培养基培养hPDLSCs,每3d更换一次。第14天,茜素红染色观察细胞外基质的钙化程度。第21天,油红O染色检测细胞外脂滴的形成。

### 1.2 实验设计

参考往期实验<sup>[18]</sup>,本研究选择了有代表性的大肠杆菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为刺激源,以10  $\mu$ g/mL LPS(北京索莱宝科技有限公司)致炎hPDLSCs,加入不同浓度梯度(1、10、20、40  $\mu$ mol/L)的Nar(上海思域化工科技有限公司),筛选出最佳抗炎浓度后,对有无Nar处理后的炎性hPDLSCs行RNA-seq及生信分析,筛选出核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通

路。体外实验验证炎性hPDLSCs中最佳抗炎浓度的Nar对NF-κB信号通路的影响，进一步加入NF-κB抑制剂BAY 11-7082 (TargetMol公司, 美国)明确Nar通过NF-κB信号通路发挥抗炎作用。

### 1.3 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 测定细胞增殖

使用含有10 μg/mL LPS及1、10、20、40 μmol/L Nar的培养基处理hPDLSCs, 并设空白对照组(Control组), 分别在第1、3、5、7天, 加入CCK-8溶液(Dojindon公司, 日本), 37 °C条件下孵育1 h后, 使用酶标仪在450 nm处读取光密度(optical density, OD)值。

### 1.4 RNA-seq

设置LPS处理组(10 μg/mL LPS)及Nar处理组(10 μg/mL LPS及20 μmol/L Nar), 分别设置3个生物学重复, 处理7 d后, 进行总RNA提取与检测, 文库构建与质检, 高通量Illumina上机测序分析。测序部分由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

### 1.5 生物信息学分析

高通量测序后, 再进行RNA质控评估, 参考基因组比对, 基因表达量分析, 层次聚类热图分析, 以 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 为标准筛选样本显著差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。随后分别对上下调DEGs进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路分析, 并使用String数据库及Cytoscape的MCODE模块从下调基因筛选出核心基因。

### 1.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative timed polymerase chain reaction, qRT-PCR)

为检测炎性因子表达, 在不同条件下处理hPDLSCs 7 d后, 使用SteadyPure快速RNA提取试剂盒(杭州艾科瑞生物科技有限公司)提取总mRNA。采用Evo M-MLV反转录试剂盒(杭州艾科瑞生物科技有限公司)反转录成cDNA。利用SYBR GreenPro Taq HS预混型qPCR试剂盒(杭州艾科瑞生物科技有限公司)进行qRT-PCR, 相对定量法计算基因mRNA的相对表达量。TNF-α、IL-6、IL-8引物序列见表1。

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

在不同条件下处理hPDLSCs 7 d后, 收集细胞培养上清液。按说明书分别通过人TNF-α、IL-6、IL-8的ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)测定上清液中IL-6、IL-8、TNF-α表达量。

表 1 qRT-PCR引物序列  
Tab 1 qRT-PCR primer sequence

基因名称	引物序列 (5'-3')
TNF-α	Forward: CCCAGGGACCTCTCTAATC
	Reverse: ATGGGCTACAGGCTTGCTACT
IL-6	Forward: AGGAGACTTGCTGGTGAAA
	Reverse: GCATTTGTGGTTGGGTCAGG
IL-8	Forward: GTTGTAGCGTAGCTAGATGC
	Reverse: TTCTCGTGTGCAGTATCTACG

### 1.8 免疫印迹试验 (Western blot, WB)

为定量检测NF-κB通路相关蛋白p-IκBα、p-p65、p65和IκBα的表达, 在不同条件下处理细胞7 d后, 使用RIPA细胞裂解液(上海雅酶生物科技有限公司)裂解细胞提取蛋白, BCA蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, 添加Omni-Easy™速溶型蛋白上样缓冲液(上海雅酶生物科技有限公司), 随后在95 °C金属浴中处理5 min。收集上清液后使用10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)胶(上海雅酶生物科技有限公司)电泳分离目的蛋白。完成转膜, 封闭后, 用p-IκBα、p-p65、p65、IκBα抗体(1 : 1 500, ImmunoWay, 美国)在4 °C孵育过夜。隔天在37 °C使用二抗HRP-山羊抗兔IgG抗体(1 : 2 000, ImmunoWay公司, 美国)孵育1 h。使用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)进行显影, ImageJ软件测量灰度值, 计算p-p65/p65、IκBα/p-IκBα。

### 1.9 统计方法

多组间的比较采用单因素方差(one-way ANOVA)分析, 组间两两比较采用Tukey's法。使用GraphPad Prism 9.0统计软件进行实验数据分析处理。所有数据以均数±标准差表示。 $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

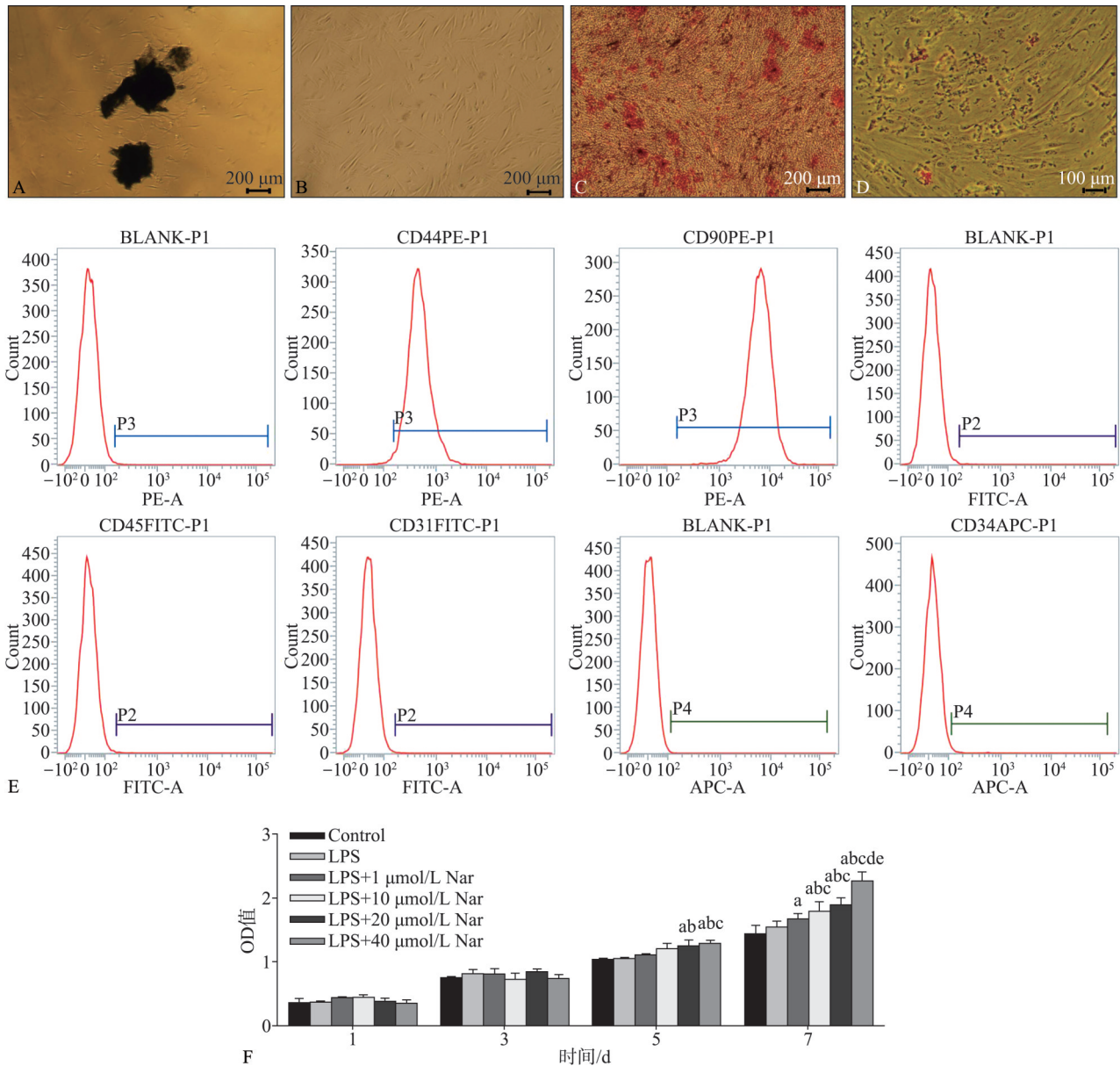
## 2 结果

### 2.1 细胞干性鉴定及LPS和Nar对hPDLSCs增殖的影响

原代培养hPDLSCs, 传代后, hPDLSCs呈长梭形状(图1A、B)。hPDLSCs具备多向分化(成骨和成脂)能力(图1C、D)。流式细胞术结果显示, hPDLSCs表面抗原CD44和CD90高表达, 呈阳性; CD45、CD31和CD34低表达, 呈阴性(图1E)。CCK-8法检测细胞增殖发现, 10 μg/mL LPS

处理对 hPDLSCs 增殖无显著影响, 1、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的 Nar 处理 7 d 均可促进 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS 作

用下 hPDLSCs 的增殖, 其中, 40  $\mu\text{mol/L}$  Nar 促进增殖作用最为明显 (图 1F)。



A: 组织块游离细胞 光学显微镜; B: 纯化后的 hPDLSCs 光学显微镜; 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; E: 流式细胞术检测 hPDLSCs 表面抗体 (BlankP1-P3 对应 CD44、CD90, BlankP1-P2 对应 CD45、31, BlankP1-P4 对应 CD34); F: 不同浓度 Nar 和 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS 作用下 hPDLSCs 的增殖变化。<sup>a</sup>与 Control 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>与 LPS+1  $\mu\text{mol/L}$  Nar 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>与 LPS+10  $\mu\text{mol/L}$  Nar 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>e</sup>与 LPS+20  $\mu\text{mol/L}$  Nar 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 1 细胞干细胞鉴定及 LPS 和 Nar 对 hPDLSCs 增殖的影响

Fig 1 Stem cell identification and the effects of LPS and Nar on the proliferation of hPDLSCs

## 2.2 Nar 对 LPS 作用下 hPDLSCs 炎症因子 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 表达的影响

RT-qPCR 检测发现 10  $\mu\text{g/mL}$  LPS 能显著上调 hPDLSCs 中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的产生和基因表达 (图 2 上)。将不同浓度 (1、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 Nar 加入炎性 hPDLSCs 后, IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的升高均得到逆转。随着 Nar 浓度的升高, 其对 IL-

6、IL-8、TNF- $\alpha$  的抑制先增加后减少。20  $\mu\text{mol/L}$  Nar 的抑制作用最显著 (图 2 下)。因此, 本研究确定 20  $\mu\text{mol/L}$  的 Nar 为实验设计浓度梯度的最佳抗炎浓度。

## 2.3 Nar 处理炎性 hPDLSCs 转录组测序生信分析

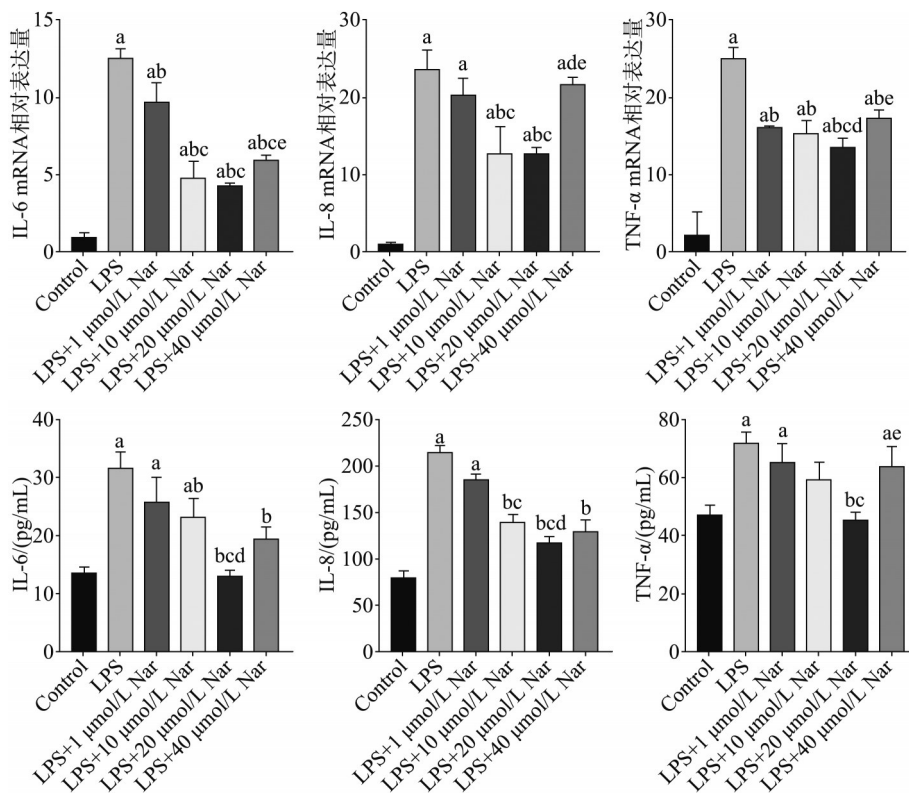
聚类热图结果显示两组具有显著性差异 (图 3A)。以  $|\log_2\text{FC}| \geq 1$  且  $P \leq 0.05$  为标准筛选出 457 个

DEGs, 其中410个为上调基因, 47个为下调基因(图3B)。排除明显的病原感染相关通路和其他疾病通路后, KEGG富集分析发现蛋白质消化吸收、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-受体相互作用、谷胱甘肽代谢、Notch信号通路、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及氨基酸生物合成等信号通路表达明显上调, 而趋化因子信号通路、IL-17信号通路、NF- $\kappa$ B信号通路、TNF信号通路以及细胞因子-细胞因子受体相互作用通路明显下调。其中下调通路多为炎症相关信号通路(图3C、D)。使用String数据库及Cytoscape的MCODE模块从下调基因中筛选出6个核心基因: CXCL5、CXCL6、CCL11、CCL20、CXCL8和前列腺素内

酯合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)(图3E)。

2.4 Nar通过NF- $\kappa$ B途径降低炎症hPDLSCs中炎症因子表达

RNA-seq结果提示Nar可能通过干扰NF- $\kappa$ B信号通路的信号传递产生抗炎作用, 于是进行进一步验证。与Control组相比, 10  $\mu$ g/mL LPS处理后的IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 等炎症因子显著上升(图4A、B), p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65占总蛋白的比例升高。加入20  $\mu$ mol/L Nar后, 与LPS组相比, IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 显著下降, p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65占总蛋白的比例下降(图4C、D)。这表明Nar可通过抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 和p65的磷酸化产生抗炎作用。



上: hPDLSCs中IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 的mRNA表达情况; 下: hPDLSCs中IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 的蛋白表达情况; <sup>a</sup>与Control组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与LPS组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>与LPS+1  $\mu$ mol/L Nar组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>d</sup>与LPS+10  $\mu$ mol/L Nar组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>e</sup>与LPS+20  $\mu$ mol/L Nar组比较,  $P < 0.05$ 。

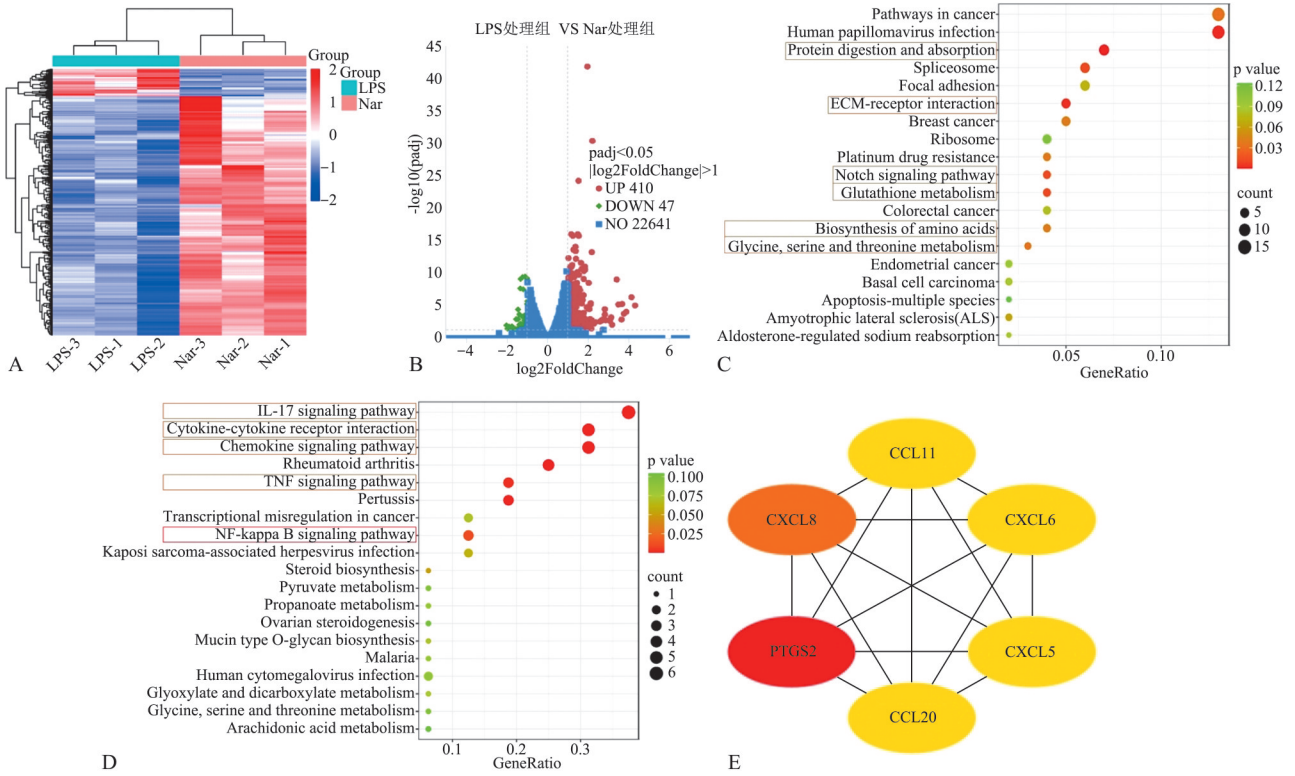
图 2 Nar对LPS作用下hPDLSCs中IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 表达的影响

Fig 2 The effects of Nar on IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  expression in hPDLSCs under LPS stimulation

2.5 BAY 11-7082通过抑制NF- $\kappa$ B通路途径对炎症hPDLSCs起抗炎作用

BAY 11-7082是一种NF- $\kappa$ B通路的抑制剂, 用于研究Nar的作用, RT-qPCR和ELISA结果显示, 与LPS组相比, 加入20  $\mu$ mol/L Nar和5  $\mu$ mol/L BAY 11-7082后IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 的表达均减少, 其中Nar比抑制剂抗炎作用更明显(图5A、B), 而

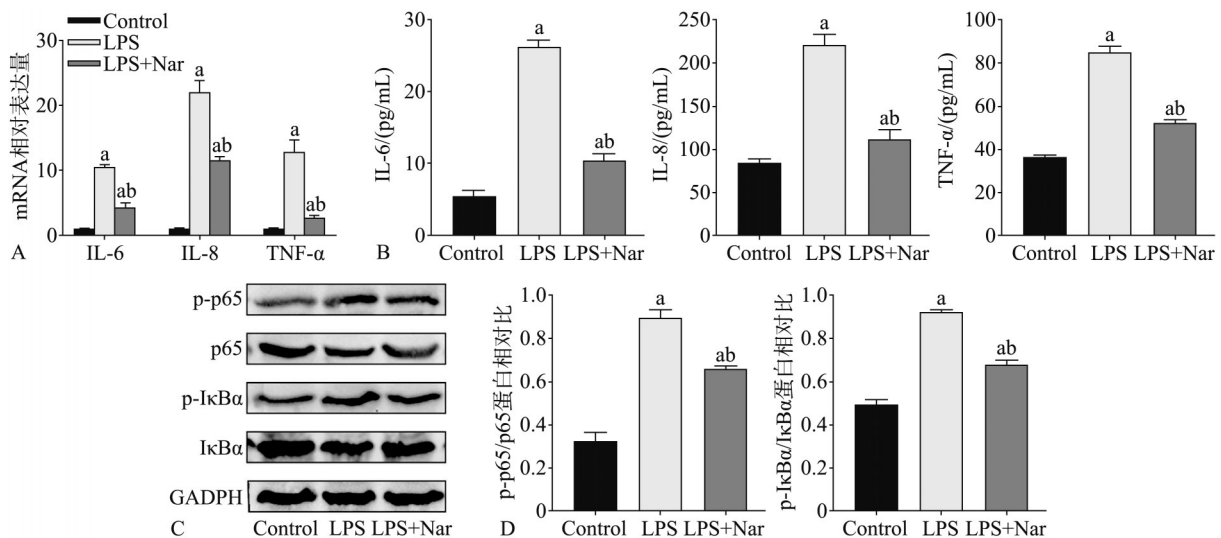
两组的p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-p65均下降, p-p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 占总蛋白比例均下降, 其中抑制剂组对p-p65占总蛋白比例下降更明显, 其余无显著差异。值得注意的是, 与单独使用Nar或抑制剂相比, 同时使用Nar及抑制剂处理, 在抑制p-p65及p-I $\kappa$ B $\alpha$ 表达方面表现协同效应(图5C、D)。



A: DEGs 聚类热图, 红色代表表达上调基因, 颜色越深, 表达越高; 蓝色代表表达下调基因, 颜色越深, 表达越低; B: DEGs 火山图, 红色点代表显著上调基因, 绿色点代表显著下调基因, 蓝色点代表差异不显著的基因; C: LPS 组与 Nar 处理组上调 DEGs 的 KEGG 分析, 点的颜色代表  $P$  值大小, 点的大小代表 KEGG 通路对应的靶基因数目; D: LPS 组与 Nar 处理组下调 DEGs 的 KEGG 分析, 点的颜色代表  $P$  值大小, 点的大小代表 KEGG 通路对应的靶基因数目; E: 下调基因中核心基因, 颜色越深, 表示与其关联靶基因数目越多。

图 3 Nar 处理炎性 hPDLSCs 的 RNA-seq 和生信分析

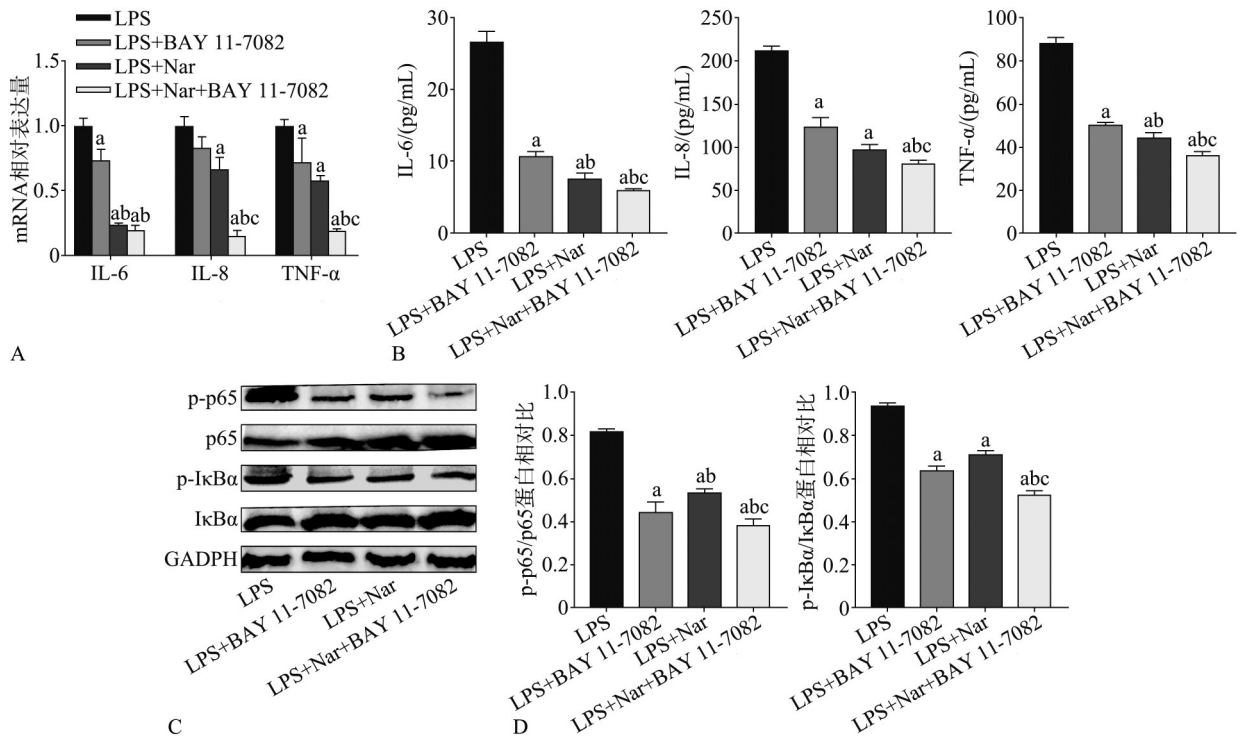
Fig 3 RNA-seq and bioinformatics analysis of inflamed hPDLSCs treated with Nar



A: hPDLSCs 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 的 mRNA 表达情况; B: hPDLSCs 中 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  的蛋白表达情况; C: hPDLSCs 中 p-p65、p65、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白表达情况; D: hPDLSCs 中 p-p65/p65、p-I $\kappa$ B $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白表达统计学分析。<sup>a</sup> 与 Control 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 4 Nar 通过 NF- $\kappa$ B 途径对炎性 hPDLSCs 的影响

Fig 4 Nar affects inflamed hPDLSCs through the NF- $\kappa$ B pathway



A: hPDLSCs中TNF-α、IL-6、IL-8的mRNA表达情况；B: hPDLSCs中IL-6、IL-8、TNF-α的蛋白表达情况；C: hPDLSCs中p-p65、p65、IκBα、p-IκBα的蛋白表达情况；D: hPDLSCs中p-p65/p65、p-IκBα/IκBα的蛋白表达统计学分析。<sup>a</sup>与LPS组比较，*P*<0.05；<sup>b</sup>与抑制剂组（LPS+BAY 11-7082）比较，*P*<0.05；<sup>c</sup>与Nar处理组（LPS+Nar）比较，*P*<0.05。

图 5 Nar与BAY 11-7082对NF-κB信号通路影响

Fig 5 Effects of Nar and BAY 11-7082 on the NF-κB signaling pathway

### 3 讨论

Nar对炎性hPDLSCs的抗炎作用在实验中得到证实。适宜浓度的Nar（1、10、20、40 μmol/L）能显著降低IL-6、IL-8、TNF-α等炎症因子在基因和蛋白水平上的表达，但对炎症因子的抑制作用并不呈浓度依赖性，20 μmol/L Nar的抗炎作用最显著。

为明确20 μmol/L Nar作用于炎性hPDLSCs的分子机制，本研究采用RNA-seq，以期识别药物与靶基因间的相互作用，探究Nar抗炎相关潜在通路。结果表明Nar作用后相关的6个枢纽基因显著下调。其中CXCL5、CXCL6、CCL11、CCL20在免疫炎症反应中起到趋化因子和促炎细胞因子的作用<sup>[19-21]</sup>。PTGS2又称环氧合酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2），评分最高，其可参与前列腺素生成，导致疼痛和炎症发展，抑制COX-2有利于抗炎和镇痛<sup>[22-25]</sup>。KEGG结果显示IL-17信号通路、NF-κB信号通路以及TNF信号通路显著下调。之前的研究<sup>[22,26]</sup>证实了这些通路与炎症疾病存在相关性。推测，Nar通过抑制牙周炎中炎症相关信号

通路，从而对炎性hPDLSCs产生保护作用。其中NF-κB信号通路同时位于IL-17信号通路和TNF信号通路下游，能够与IL-17信号通路、TNF-α信号通路形成正反馈环<sup>[23]</sup>。于是选择NF-κB信号通路做进一步实验验证。

本研究阐明了Nar通过NF-κB信号通路调控炎症的潜在机制。实验结果显示20 μmol/L Nar处理后，逆转IκBα和p65的磷酸化水平升高。这表明，Nar通过减少IκBα和p65磷酸化，从而抑制NF-κB信号通路的激活来降低炎症反应。使用IκB激酶活性的抑制剂BAY 11-7082做进一步验证。其在抗炎研究<sup>[24]</sup>中已有实证，能够在一定程度上逆转炎症环境对细胞成骨分化的不良影响。相较于BAY 11-7082，Nar在降低IL-6、IL-8和TNF-α表达方面表现得更为显著。然而，它在降低p-p65比例方面作用较弱。这表明Nar抗炎作用部分依赖于抑制NF-κB信号通路，还有其他炎症相关信号通路参与调控炎症过程。这一结论与之前的通路富集结果相吻合。

NF-κB通路一直以来被认为在免疫稳态和炎症中发挥关键作用，涉及自身免疫性疾病、肿瘤发生、慢性炎症性疾病和衰老<sup>[25,27-28]</sup>。正常情况下，

NF- $\kappa$ B二聚体通过与抑制性I $\kappa$ B蛋白结合而受限于胞浆。在受到刺激时, I $\kappa$ B $\alpha$ 会被I $\kappa$ B激酶磷酸化, NF- $\kappa$ B核易位入核, 激活数百种免疫调节蛋白、促炎细胞因子、黏附分子和生长因子<sup>[29]</sup>。研究<sup>[30]</sup>显示, NF- $\kappa$ B激活可促进肿瘤细胞增殖、存活、血管生成和侵袭, 有助于慢性炎症相关肿瘤进展。此外, NF- $\kappa$ B的激活会诱导趋化因子表达, 招募巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞、中性粒细胞及T和B细胞等免疫细胞, 进一步加剧炎症反应。因此, 在治疗各种炎症性疾病中, 选择性抑制NF- $\kappa$ B通路具有广泛应用前景<sup>[31-33]</sup>。

综上, 本研究发现20  $\mu$ mol/L Nar的抗炎作用最为显著。RNA-seq提示Nar的抗炎作用与多个炎症相关信号通路相关, 其中NF- $\kappa$ B信号通路的作用在实验中得到了验证, 为Nar辅助治疗牙周炎提供理论依据。由于炎症表达可能与时间相关, 未来研究可纳入多个时间点以评估Nar在不同阶段的作用。此外, 抑制菌斑微生物引发的炎症微环境是治疗牙周炎的主要途径。因此, 本实验重点关注了Nar的抗炎作用。后续应对可能与炎性hP-DLSCs成骨、抗氧化等作用的其他显著的富集通路行进一步实验研究。最后, 鉴于目前的研究仅为体外细胞实验, 后续工作将涵盖实验性动物模型和更详尽的机制研究。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Nikniaz S, Vaziri F, Mansouri R. Impact of resveratrol supplementation on clinical parameters and inflammatory markers in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial[J]. BMC Oral Health, 2023, 23(1): 177.
- [2] Isola G, Tartaglia GM, Santonocito S, et al. Growth differentiation factor-15 and circulating biomarkers as predictors of periodontal treatment effects in patients with periodontitis: a randomized-controlled clinical trial[J]. BMC Oral Health, 2023, 23(1): 582.
- [3] Liu S, Xie G, Chen M, et al. Oral microbial dysbiosis in patients with periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1121399.
- [4] Pan S, Li Y, He H, et al. Identification of ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis-associated genes in periodontitis-affected human periodontal tissue using integrated bioinformatic analysis[J]. Front Pharmacol, 2023, 13: 1098851.
- [5] Feng Q. Gastrodin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress, and promotes the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells through enhancing sirtuin3 expression[J]. Exp Ther Med, 2022, 23(4): 296.
- [6] Mohammadian Haftcheshmeh S, Momtazi-Borojeni AA. Berberine as a promising natural compound for the treatment of periodontal disease: a focus on anti-inflammatory properties[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(24): 11333-11337.
- [7] Bae JY, Lee DS, Cho YK, et al. Daphne jejuensis attenuates LPS-induced inflammation by inhibiting TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, and COX-2 expression in periodontal ligament cells[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(4): 387.
- [8] Yu B, Hu J, Li Q, et al. CircMAP3K11 contributes to proliferation, apoptosis and migration of human periodontal ligament stem cells in inflammatory microenvironment by regulating TLR4 via miR-511 sponging[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 633353.
- [9] Wei Y, Fu J, Wu W, et al. Quercetin prevents oxidative stress-induced injury of periodontal ligament cells and alveolar bone loss in periodontitis[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3509-3522.
- [10] Zhang K, Li C, Sun J, et al. PRMT5 inhibition ameliorates inflammation and promotes the osteogenic differentiation of LPS-induced periodontal stem cells via STAT3/NF- $\kappa$ B signaling[J]. Exp Ther Med, 2023, 25(6): 264.
- [11] Tan W, Dai F, Yang D, et al. MiR-93-5p promotes granulosa cell apoptosis and ferroptosis by the NF- $\kappa$ B signaling pathway in polycystic ovary syndrome[J]. Front Immunol, 2022, 13: 967151.
- [12] Huang X, Shen H, Liu Y, et al. Fisetin attenuates periodontitis through FGFR1/TLR4/NLRP3 inflammasome pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 95: 107505.
- [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.
- [14] Shen J, Cheng J, Zhu S, et al. Regulating effect of bicalin on IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 73: 193-200.

- [15] Mohamed EE, Ahmed OM, Zoheir KMA, et al. Naringin-dextrin nanocomposite abates diethylnitrosamine/acetaminofluorene-induced lung carcinogenesis by modulating oxidative stress, inflammation, apoptosis, and cell proliferation[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(20): 5102.
- [16] Wang Y, Li Z, Wang B, et al. Naringenin attenuates inflammation and apoptosis of osteoarthritic chondrocytes via the TLR4/TRAFF6/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e16307.
- [17] Laurindo LF, Santos AROD, Carvalho ACA, et al. Phytochemicals and regulation of NF- $\kappa$ B in inflammatory bowel diseases: an overview of *in vitro* and *in vivo* effects[J]. *Metabolites*, 2023, 13(1): 96.
- [18] 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 chemokine receptor 4 signaling axis stimulated by lipopolysaccharide[J]. *West China J Stomatol*, 2023, 41(2): 175-184.
- [19] Polosukhina D, Singh K, Asim M, et al. CCL11 exacerbates colitis and inflammation-associated colon tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2021, 40(47): 6540-6546.
- [20] Hanna DN, Smith PM, Novitskiy SV, et al. SMAD4 suppresses colitis-associated carcinoma through inhibition of CCL20/CCR6-mediated inflammation[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(5): 1334-1350.e14.
- [21] Mathur AN, Zirak B, Boothby IC, et al. Treg-cell control of a CXCL5-IL-17 inflammatory axis promotes hair-follicle-stem-cell differentiation during skin-barrier repair [J]. *Immunity*, 2019, 50(3): 655-667.e4.
- [22] Camargo LDN, Righetti RF, de Almeida FM, et al. Modulating asthma-COPD overlap responses with IL-17 inhibition[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1271342.
- [23] Lu Y, Xing C, Zhang C, et al. Promotion of IL-17/NF- $\kappa$ B signaling in autoimmune thyroid diseases[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 25(1): 51.
- [24] Wang N, Hao Y, Fu L. Trimethylamine-N-oxide promotes osteoclast differentiation and bone loss via activating ROS-dependent NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 3955.
- [25] Liu X, Lu B, Fu J, et al. Amorphous silica nanoparticles induce inflammation via activation of NLRP3 inflammasome and HMGB1/TLR4/MYD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway in HUVEC cells[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 404(Pt B): 124050.
- [26] Camargo LDN, Dos Santos TM, de Andrade FCP, et al. Bronchial vascular remodeling is attenuated by anti-IL-17 in asthmatic responses exacerbated by LPS[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1269.
- [27] Somensi N, Rabelo TK, Guimarães AG, et al. Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105743.
- [28] Zusso M, Lunardi V, Franceschini D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 148.
- [29] Wang Y, Liu P, Ma G, et al. Mechanism of dioscin ameliorating renal fibrosis through NF- $\kappa$ B signaling pathway-mediated inflammatory response[J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(4): 93.
- [30] Zhuang L, Zong X, Yang Q, et al. Interleukin-34-NF- $\kappa$ B signaling aggravates myocardial ischemic/reperfusion injury by facilitating macrophage recruitment and polarization[J]. *EBioMedicine*, 2023, 95: 104744.
- [31] Bonomini F, Favero G, Petroni A, et al. Melatonin modulates the SIRT1-related pathways via transdermal cryopass-laser administration in prostate tumor xenograft[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(20): 4908.
- [32] Tran HG, Shuayprom A, Kueanjinda P, et al. Oxyresveratrol attenuates inflammation in human keratinocyte via regulating NF- $\kappa$ B signaling and ameliorates eczematous lesion in DNCB-induced dermatitis mice[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(6): 1709.
- [33] Xie YQ, Huang JY, Chen YX, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Streblus indicus*[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1249234.

(本文编辑 杜冰)