

基于 AMPK/NLRP3 通路探讨黄芪甲苷对 Pg-LPS 诱导的人牙龈成纤维细胞损伤的保护作用及机制

张宇轩¹, 牛建华², 李焱³

1. 江汉大学 医学部, 湖北 武汉 430056
2. 山西医科大学 口腔医院 牙体牙髓病科, 山西 太原 030001
3. 山西医药学院口腔医学院, 山西 汾阳 032200

摘要: 目的 基于单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK)/NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3) 通路探讨黄芪甲苷 (AS-IV) 对牙龈卟啉单胞菌 (Pg)-脂多糖 (LPS) 诱导的人牙龈成纤维细胞 (HGFs) 损伤的保护作用机制。方法 AS-IV (0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 HGFs (加或不加 Pg-LPS 造模) 24 h, CCK-8 法检测细胞存活率, 筛选 AS-IV 作用浓度。将 HGFs 随机分为对照组、模型组、AS-IV (10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、AS-IV (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + CC (AMPK 抑制剂, Compound C, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AMPK 抑制剂) 组。对照组正常培养, 模型组和给药组细胞用 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pg-LPS 处理 12 h 后, 进一步加相应药物处理 24 h。CCK-8 和克隆形成实验检测细胞的增殖; 划痕实验检测细胞的迁移; 流式细胞仪检测细胞的凋亡率; ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素 (IL)-8、IL-18、IL-6 的表达; Western blotting 检测细胞中 AMPK、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC)、Caspase-1 蛋白的表达。结果 与对照组相比, 模型组细胞存活率、克隆数、划痕愈合率、p-AMPK/AMPK 表达显著降低 ($P<0.05$), 凋亡率、IL-8、IL-18、IL-6、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, AS-IV 组细胞存活率、克隆数、划痕愈合率、p-AMPK/AMPK 表达显著升高 ($P<0.05$), 凋亡率、IL-8、IL-18、IL-6、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达显著降低 ($P<0.05$); 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, AS-IV + CC 组细胞存活率、克隆数、划痕愈合率、p-AMPK/AMPK 表达显著降低 ($P<0.05$), 凋亡率、IL-8、IL-18、IL-6、NLRP3、ASC、Caspase-1 表达显著升高 ($P<0.05$)。结论 AS-IV 可能通过调控 AMPK/NLRP3 通路, 促进 Pg-LPS 诱导的 HGFs 增殖、迁移, 抑制细胞凋亡和炎症反应。

关键词: 人牙龈成纤维细胞; 黄芪甲苷; 单磷酸腺苷活化蛋白激酶; NOD 样受体蛋白 3; 炎症反应

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)09-3044-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.09.008

Protective effect and mechanism of astragaloside IV on Pg-LPS induced human gingival fibroblast injury based on AMPK/NLRP3 pathway

ZHANG Yuxuan¹, NIU Jianhua², LI Yan³

1. School of Medicine Jiangnan University, Wuhan 430056, China
2. Department of Endodontics, Shanxi Medical University Stomatological Hospital, Taiyuan 030001, China
3. School of Stomatology, Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of astragaloside IV (AS-IV) on Pg-LPS induced human gingival fibroblasts (HGFs) injury based on the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) pathway. **Methods** HGFs were treated with AS-IV (0, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h, with or without Pg-LPS stimulation, and cell viability was assessed by CCK-8 assay to determine the optimal concentration of AS-IV. HGFs were randomly divided into control group, model group, AS-IV groups (10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and AS-IV (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + CC (Compound C, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, an AMPK inhibitor) group. The control group was cultured under normal conditions; cells in the model and treatment groups were exposed to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Pg-LPS for 12 h, followed by corresponding drug treatments for 24 h. Cell proliferation was evaluated using CCK-8 and colony formation assays; cell migration was assessed by scratch wound healing assay; apoptosis rate was measured by flow cytometry; levels of interleukin (IL)-8, IL-18, and IL-6 in cell supernatants were detected by ELISA; and expression of AMPK,

收稿日期: 2026-04-27

基金项目: 山西省高等学校科技创新计划项目 (编号 2023L477)

作者简介: 张宇轩, 男, 本科, 研究方向为基于炎症信号通路探讨炎症疾病的发病机制。E-mail: z14841@sina.com

NLRP3, ASC, and Caspase-1 proteins was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the model group showed significantly reduced cell viability, colony number, and scratch healing rate, as well as decreased p-AMPK/AMPK expression ($P < 0.05$), while apoptosis rate and expression of IL-8, IL-18, IL-6, NLRP3, ASC, and Caspase-1 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, AS-IV-treated groups exhibited significantly improved cell viability, colony number, and scratch healing rate, along with increased p-AMPK/AMPK expression ($P < 0.05$), while apoptosis rate and expression of IL-8, IL-18, IL-6, NLRP3, ASC, and Caspase-1 were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the AS-IV $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, the AS-IV+CC group showed significantly decreased cell viability, colony number, and scratch healing rate, along with reduced p-AMPK/AMPK expression ($P < 0.05$), whereas apoptosis rate and expression of IL-8, IL-18, IL-6, NLRP3, ASC, and Caspase-1 were significantly elevated ($P < 0.05$). **Conclusion** AS-IV may promote Pg-LPS induced proliferation and migration of HGFs cells, inhibit cell apoptosis and inflammatory response by regulating the AMPK/NLRP3 pathway.

Key words: human gingival fibroblasts; astragaloside IV; adenosine monophosphate-activated protein kinase; NOD-like receptor protein 3; inflammatory response

牙周炎是牙科常见的疾病,其核心发病机制是菌斑微生物引发的持续性炎症反应,其中牙龈卟啉单胞菌(Pg)是主要致病菌^[1]。该疾病多表现为牙周组织附着力降低、牙槽骨吸收、牙齿红肿,严重时会引起牙齿脱落、全身性疼痛等,随着医疗技术的改善,临床可以采取种植修复的方式进行治疗,但是治疗后仍会发生炎症,严重影响患者的生活质量^[2]。人牙龈成纤维细胞(HGFs)是牙周组织的重要细胞,承担着维持牙周组织完整性、参与组织修复及免疫调节的重要作用,相关研究表明,Pg在牙周病原体释放的脂多糖(LPS)等多种内毒素会破坏牙周组织细胞,引起炎症损伤^[3]。因此,明确HGFs炎症反应的调控机制,是开发牙周炎新型治疗策略的关键切入点。黄芪甲苷(AS-IV)是豆科植物黄芪中的重要活性物质,其具有抗病毒、抗氧化、抗炎等作用,同时对机体免疫具有一定调控作用^[4-5]。研究发现,AS-IV在多种炎症相关疾病中发挥重要作用,可通过一定的作用机制进行调控,可通过抑制NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体,对人牙周膜细胞的炎症起到抑制作用,提示NLRP3炎症小体是连接Pg感染与HGFs炎症损伤的关键分子^[5-6]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)是调控细胞能量代谢的关键激酶,可参与调控机体能量代谢稳态过程,相关研究表明,AMPK可作用于沉默信息调节因子1(SIRT1)依赖性信号通路,进而起到抗炎作用^[7]。近期研究发现,在糖尿病肾损伤疾病中,可通过调控AMPK/NLRP3通路,抑制NLRP3炎症小体的活化,改善炎症病程的进展^[8]。但目前,AS-IV是否通过调控AMPK/NLRP3通路,对Pg-LPS诱导的HGFs炎症反应发挥调控作用,尚未见相关研究报道。本研究以Pg-LPS诱导的

HGFs作为研究对象,探究AS-IV是否通过调控AMPK/NLRP3通路发挥作用。

1 材料

1.1 细胞

人HGFs细胞(货号CTCC-008-0001,北京兰博康斯科技公司)。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 基础培养基、胎牛血清(货号C0462-838、FBS111500,北京沃比森科技公司);Pg-LPS(货号Chondrex-6224,武汉佰瑞得生物公司);AS-IV(CAS号84687-43-4,北京孚博生物公司);AMPK抑制剂Compound C(CC,CAS号866405-64-3,北京德航五洲科技公司);CCK-8试剂盒、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号UEC6005S、YZM645,无锡天萃生物公司);白细胞介素(IL)-8、IL-18 ELISA试剂盒(货号XK-E1370h、XK-E1094,上海恒科生物科技有限公司);IL-6 ELISA试剂盒(货号BKE15720、BKE8808、BKE15653,上海帛科生物技术有限公司);RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒(货号R6166、B6169,上海派森诺生物公司);SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号W003-1-1,杭州囊萤科技公司);ECL化学发光试剂盒(货号H-E-125,蒂科生物科技有限公司);抗体p-AMPK、AMPK、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱氨酸蛋白酶水解酶(Caspase)-1及羊抗兔二抗、GAPDH(货号A19700、A1229、A21906、A24165、A28207、AS056、AC027,爱博泰克公司)。

1.3 主要仪器

EnVision多功能酶标仪(美国Revvity公司);TS100倒置显微镜(南京兆坤仪器有限公司);DxP Athena流式细胞仪(Cytex Biosciences公司);

IS4000MM Pro 凝胶成像系统（北京欧比特仪器公司）。

2 方法

2.1 AS-IV浓度的筛选

在 RPMI 1640 基础培养基中（37 °C、5% CO₂）培养 HGFs 细胞，补充 15%胎牛血清、100 mg·mL⁻¹ 链霉素/青霉素。HGFs 以每孔 1×10⁴ 个的密度接种在 96 孔板上，待细胞贴壁后，分别进行 2 种处理：①用不同浓度 AS-IV（0、5、10、20、40、80 μmol·L⁻¹）处理 HGFs 细胞 24 h；②用 10 μg·mL⁻¹ Pg-LPS 处理 12 h^[9]，再加入 AS-IV（0、5、10、20、40、80 μmol·L⁻¹）处理 24 h；加入 CCK-8 溶液，孵育 1 h（在 37 °C、5% CO₂），通过酶标仪检测吸光度（A）值，计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 细胞分组

将细胞随机分为对照组、模型组、AS-IV（10、20、40 μmol·L⁻¹）组、AS-IV（40 μmol·L⁻¹）+CC（10 μmol·L⁻¹，AMPK 抑制剂）^[10]组。对照组正常培养，模型组和给药组细胞用 10 μg·mL⁻¹ Pg-LPS 处理 12 h 后，进一步加相应药物处理 24 h。

2.3 CCK-8 和克隆形成实验检测 HGFs 增殖

HGFs 以每孔 1×10⁴ 个的密度接种在 96 孔板上，按“2.2”项下方法分组处理，并加入 10 μL CCK-8 试剂，孵育 2 h。通过酶标仪检测 450 nm 处吸光度（A）值，计算细胞存活率。

取 HGFs 以每孔 1×10⁴ 个的密度接种在 6 孔板上，按“2.2”项下方法分组处理，可见克隆后，通过磷酸盐缓冲液（PBS）轻轻浸洗，固定液固定，结晶紫染色，观察并拍照，统计克隆细胞数。

2.4 划痕实验检测 HGFs 迁移

取 HGFs，胰酶消化并以每孔 3×10⁵ 个的密度接种在 6 孔板中。待完全融合至 80%以上，用无菌移液枪头划伤细胞（在划痕后加入丝裂霉素 C，10 μg·mL⁻¹ 预处理 1 h，抑制细胞增殖）并用 PBS 轻轻浸洗，按“2.2”项下方法分组处理，培养箱（37 °C、5% CO₂）中培养 24 h，对 0、24 h 创面拍照，统计划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (\text{0 h 创面面积} - \text{24 h 创面面积}) / \text{0 h 创面面积}$$

2.5 流式细胞仪检测 HGFs 凋亡

将 HGFs 以每孔 2×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板中，按“2.2”项下方法分组处理后，用冷 PBS 洗涤

2 次，在缓冲液中重悬。根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行处理，流式细胞仪检测分析 HGFs 凋亡率。

2.6 ELISA 法检测 HGFs 上清液中 IL-8、IL-18、IL-6 表达

HGFs 以每孔 2×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板中，按“2.2”项下方法分组处理后，收集细胞培养上清液并离心（3 000 r·min⁻¹、15 min），吸取上清液至新管，严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作，在酶标仪 450 nm 处检测 IL-8、IL-18、IL-6 水平。

2.7 Western blotting 检测蛋白表达

HGFs 以 2×10⁵ 个的密度接种于 6 孔板中，加入经 RIPA 裂解液裂解，3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 并提取总蛋白，使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，随后等量蛋白质经 SDS-PAGE 电泳进行分离，移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉室温封闭 1 h，与一抗 p-AMPK（1：20 000），AMPK（1：1 000）、NLRP3（1：1 000）、ASC（1：3 000）、Caspase-1（1：10 000）过夜孵育（4 °C）。二抗（1：500）室温孵育 1 h。经 ECL 化学发光液检测蛋白表达，凝胶成像系统曝光、拍照。采用 Image J 软件对蛋白表达进行分析。在结果定量中，用 GAPDH（1：2 000）对目标蛋白进行标准化。

2.8 统计学分析

数据以 SPSS 25.0 软件进行统计学分析，符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 描述，多组比较采用单因素方差分析，两两比较用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 AS-IV浓度的筛选

如表 1 所示，AS-IV处理后的 HGFs 细胞活力与 0 μmol·L⁻¹ 组比较差异不明显；与 Pg-LPS 诱导 HGFs 的 0 μmol·L⁻¹ 组相比，5 μmol·L⁻¹ AS-IV处理的细胞

表 1 AS-IV浓度的筛选（ $\bar{x} \pm s$ ，*n*=6）

Table 1 Screening of AS-IV concentration（ $\bar{x} \pm s$ ，*n*=6）

AS-IV/ (μmol·L ⁻¹)	细胞存活率/%	
	HGFs	Pg-LPS诱导的HGFs
0	100.00±0.00	46.31±3.85
5	98.71±1.01	47.39±3.66
10	96.84±3.12	65.54±5.28*
20	97.33±2.08	78.96±7.48*
40	97.26±2.51	92.33±7.59*
80	84.14±2.52	92.68±7.17*

与 0 μmol·L⁻¹ 组比较：**P*<0.05。

**P*<0.05 vs 0 μmol·L⁻¹ group.

活力无显著差异 ($P>0.05$), 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的细胞活力不断升高 ($P<0.05$); 但是 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的细胞活力值与 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 无明显差异 ($P>0.05$), 因此后续 AS-IV 浓度选择 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2 AS-IV对 HGFs 增殖的影响

与对照组相比, 模型组细胞存活率、克隆数降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, AS-IV 组细胞存活率、克隆数显著升高 ($P<0.05$), 且呈浓度相关性; 与 AS-

IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, AS-IV+CC 组细胞存活率、克隆数显著降低 ($P<0.05$)。结果见图 1、表 2。

3.3 AS-IV对 HGFs 迁移的影响

与对照组相比, 模型组细胞划痕愈合率降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, AS-IV 组细胞划痕愈合率升高 ($P<0.05$), 且呈浓度相关性; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, AS-IV+CC 组细胞划痕愈合率降低 ($P<0.05$)。见图 2、表 3。

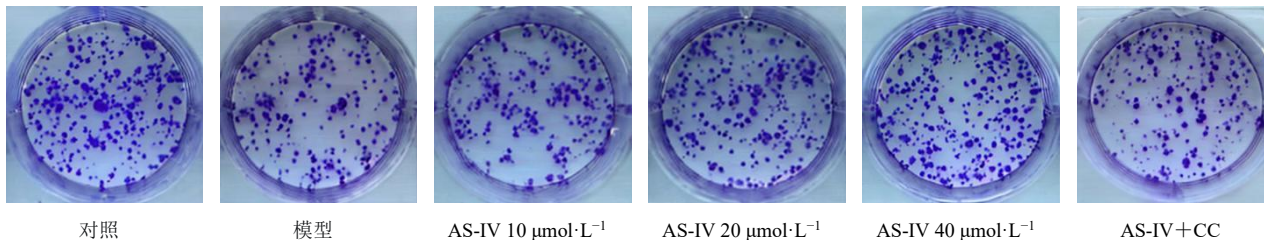


图 1 克隆形成实验检测 HGFs 的增殖

Fig. 1 Cloning formation experiment for detecting proliferation of HGFs

表 2 AS-IV 对 HGFs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of AS-IV on proliferation of HGFs cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞存活率/%	克隆数
对照	—	100.00 $\pm$ 0.00	131.28 $\pm$ 11.69
模型	—	41.52 $\pm$ 3.37*	79.63 $\pm$ 8.22*
AS-IV	10	58.89 $\pm$ 3.88#	96.23 $\pm$ 9.63#
	20	72.54 $\pm$ 4.96#	110.64 $\pm$ 10.71#
	40	89.76 $\pm$ 6.24#	129.56 $\pm$ 11.45#
AS-IV+CC	40+10	45.68 $\pm$ 3.56 Δ	82.34 $\pm$ 8.64 Δ

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: $\Delta P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; $\Delta P<0.05$ vs AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

3.4 AS-IV对 HGFs 凋亡的影响

与对照组相比, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, AS-IV 组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$), 且呈浓度相关性; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, AS-IV+CC 组细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。见表 4、图 3。

3.5 AS-IV对细胞上清液中 IL-8、IL-18、IL-6 水平的影响

与对照组相比, 模型组细胞上清液 IL-8、IL-18、IL-6 水平显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, AS-IV 组细胞上清液中 IL-8、IL-18、IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$), 且呈浓度相关性; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, AS-IV+CC 组上清液中 IL-8、IL-18、IL-6 水平显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 5。

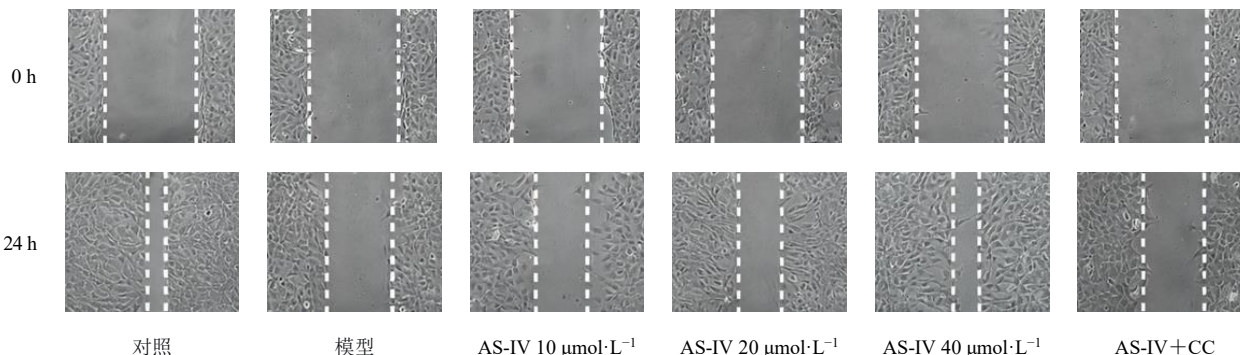


图 2 划痕实验检测 HGFs 细胞的迁移

Fig. 2 Scratch assay for detecting migration of HGFs cells

表 3 AS-IV对 HGFs 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of AS-IV on migration of HGFs cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	划痕愈合率/%
对照	—	82.37 $\pm$ 7.59
模型	—	33.69 $\pm$ 3.85*
AS-IV	10	48.92 $\pm$ 4.37 [#]
	20	63.57 $\pm$ 5.98 [#]
	40	79.86 $\pm$ 7.18 [#]
AS-IV+CC	40+10	39.33 $\pm$ 4.24 $^{\Delta}$

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; $^{\Delta}P<0.05$ vs AS-IV 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

表 4 AS-IV对 HGFs 凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of AS-IV on apoptosis rate of HGFs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%
对照	—	2.36 $\pm$ 0.21
模型	—	44.52 $\pm$ 4.63*
AS-IV	10	35.47 $\pm$ 4.13 [#]
	20	23.18 $\pm$ 2.91 [#]
	40	18.57 $\pm$ 2.24 [#]
AS-IV+CC	40+10	41.08 $\pm$ 1.87 $^{\Delta}$

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; $^{\Delta}P<0.05$ vs AS-IV 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

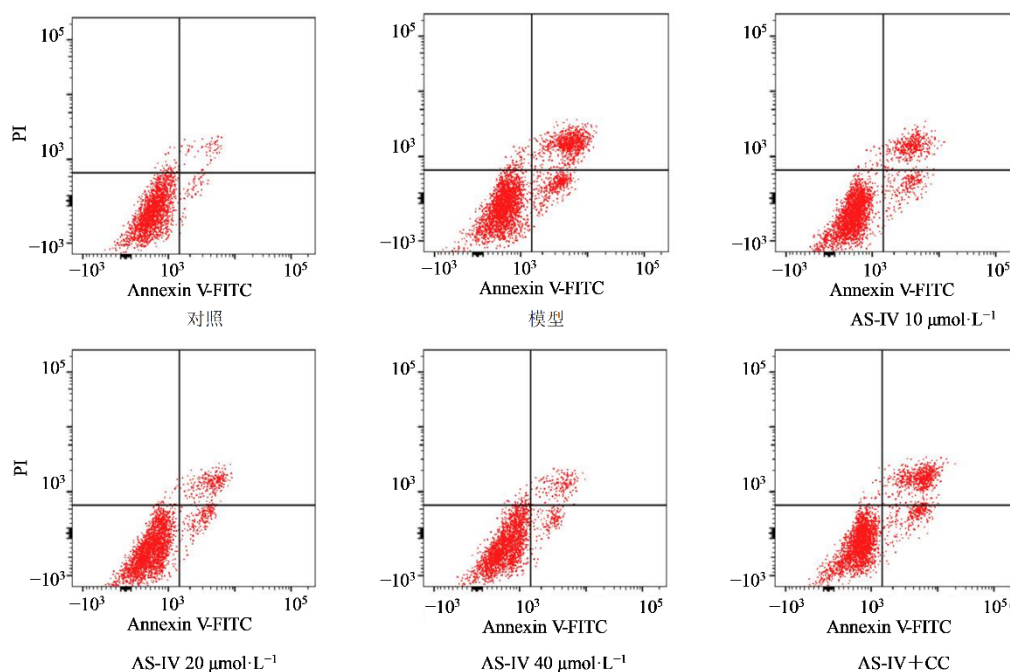


图 3 流式细胞仪检测 HGFs 凋亡

Fig. 3 Flow cytometry detection of HGFs apoptosis

表 5 AS-IV对细胞上清液中 IL-8、IL-18、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of AS-IV on expression of IL-8, IL-18, and IL-6 in cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	IL-18/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	27.38 $\pm$ 3.56	70.42 $\pm$ 8.43	29.63 $\pm$ 1.68
模型	—	252.42 $\pm$ 26.33*	165.28 $\pm$ 18.49*	110.52 $\pm$ 5.64*
AS-IV	10	184.92 $\pm$ 20.16 [#]	141.33 $\pm$ 15.23 [#]	82.43 $\pm$ 3.52 [#]
	20	139.48 $\pm$ 16.21 [#]	108.94 $\pm$ 12.74 [#]	62.79 $\pm$ 2.38 [#]
	40	76.39 $\pm$ 8.25 [#]	82.36 $\pm$ 9.56 [#]	38.62 $\pm$ 2.06 [#]
AS-IV+CC	40+10	203.16 $\pm$ 21.54 $^{\Delta}$	145.28 $\pm$ 16.22 $^{\Delta}$	90.37 $\pm$ 3.82 $^{\Delta}$

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较: $^{\Delta}P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; $^{\Delta}P<0.05$ vs AS-IV 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group.

3.6 AS-IV对 HGFs 中 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组细胞 p-AMPK/AMPK 表达显著降低 ($P<0.05$), NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$); 与模型组相比, AS-IV 组细胞 p-AMPK/AMPK 表达显著升高 ($P<0.05$), NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), 且呈浓度相关性; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, AS-IV+CC 组细胞 p-AMPK/AMPK 表达显著降低 ($P<0.05$), NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。见图 4、表 6。

4 讨论

牙周炎作为常见的牙周组织炎症性疾病, 多由菌斑微生物引起, 牙周组织出现局部炎症, 牙槽骨吸收, 导致牙齿脱落, 据报道, 我国成年人中, 牙周炎的发病率已超 80%, 给人们生活带来严重危害^[11]。

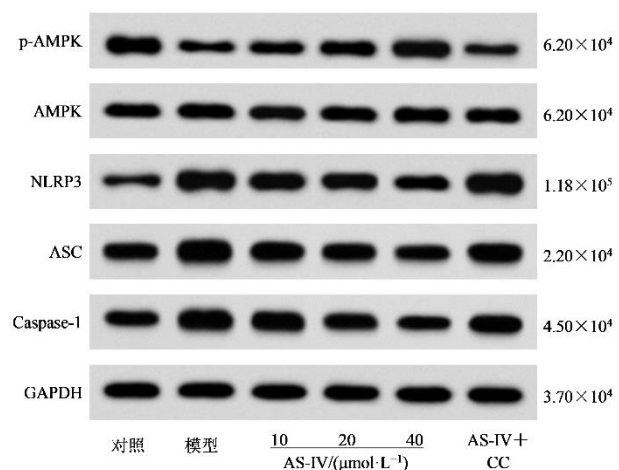


图 4 Western blotting 检测 HGFs 中 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达

Fig. 4 Western blotting detection of AMPK/NLRP3 pathway related protein expression in HGFs

表 6 AS-IV对 HGFs 中 AMPK/NLRP3 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 6 Effect of AS-IV on expression of AMPK/NLRP3 pathway related proteins in HGFs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	p-AMPK/AMPK	NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
对照	—	1.69 ± 0.23	0.53 ± 0.05	1.06 ± 0.08	0.92 ± 0.06
模型	—	$0.53 \pm 0.05^*$	$1.86 \pm 0.21^*$	$1.75 \pm 0.20^*$	$1.69 \pm 0.17^*$
AS-IV	10	$0.79 \pm 0.08^\#$	$1.52 \pm 0.17^\#$	$1.50 \pm 0.17^\#$	$1.45 \pm 0.15^\#$
	20	$1.05 \pm 0.12^\#$	$1.23 \pm 0.14^\#$	$1.37 \pm 0.15^\#$	$1.22 \pm 0.14^\#$
	40	$1.42 \pm 0.13^\#$	$0.78 \pm 0.09^\#$	$1.07 \pm 0.12^\#$	$0.96 \pm 0.10^\#$
AS-IV+CC	40+10	$0.66 \pm 0.07^\Delta$	$1.77 \pm 0.19^\Delta$	$1.66 \pm 0.18^\Delta$	$1.53 \pm 0.16^\Delta$

与对照组比较: $^*P<0.05$; 与模型组比较: $^\#P<0.05$; 与 AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较: $^\Delta P<0.05$ 。

$^*P<0.05$ vs control group; $^\#P<0.05$ vs model group; $^\Delta P<0.05$ vs AS-IV 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group.

该疾病具有免疫炎症破坏性, 多由 Pg 产生的代谢物 LPS 诱发, 促进炎症因子 IL-6 等释放, 进而引起牙周组织炎症, 造成牙周组织破坏^[12]。相关研究发现, Pg-LPS 诱导可促进基质降解酶分泌, 加速细胞外基质降解, 破坏牙周组织, 此外, 还可抑制细胞增殖、迁移等生物学行为^[13]。HGFs 作为牙龈结缔组织中的重要成分, 可直接被细菌及其代谢物的影响, 加剧炎症反应, 导致细胞功能受损^[14]。既往研究表明, Pg-LPS 诱导 HGFs 可影响细胞的增殖及成骨分化等过程, 进而导致细胞损伤, 其中, 炎症反应是引发细胞损伤的重要原因^[15-16]。在 Pg-LPS 诱导 HGFs 中, 已有多个研究证实, 多种 ILs 在细胞中发挥重要作用, 通过介导炎症介质, 进而加剧炎症反应, 促进细胞损伤^[17]。有研究发现, IL-8、IL-6 可参与 Pg-LPS 诱导 HGFs 细胞炎症反应, 可受 TXNIP/NLRP3 的负调控作用, 进一步影响细胞损

伤进程^[18-19]。此外, 研究表明 IL-18 可参与微生物 Pg-LPS 感染引发的免疫调控过程, 通过分泌 IL-18 可响应炎症反应, 加剧疾病的发生, 可作为有效检测指标^[20]。本研究采用 Pg-LPS 诱导 HGFs, 结果发现, 细胞增殖、迁移能力下降, 凋亡率升高, 炎症因子 IL-8、IL-18、IL-6 表达升高, 提示 Pg-LPS 诱导的炎症反应可能是牙周炎的重要诱因。

AS-IV 是一种三萜皂苷类化合物, 主要从豆科植物膜荚黄芪的根部提取, 中医临床中常用于治疗肺气虚、咳嗽气短等症状, 可调控机体免疫功能, 并提高抗病能力^[21]。相关研究表明, AS-IV 可用于提高免疫力, 具有抗炎、抗肿瘤等作用, 达到减轻炎症反应及组织损伤的目的^[22]。王丹等^[23]研究表明, AS-IV 在牙周组织炎症治疗中发挥重要作用, 通过阻断 Toll 样受体 4/髓样分化因子 88 (MyD88) /核因子- κB (NF- κB) 信号通路, 抑制炎症反应, 增

强免疫,抑制破骨细胞形成及骨吸收,对牙周组织重塑具有保护作用。陈亚琼等^[24]发现,AS-IV通过调控 miR-126/NF- κ B 通路,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡,进而抑制炎症反应。本研究结果发现,AS-IV可促进 Pg-LPS 诱导的 HGFs 增殖、迁移,抑制细胞凋亡及炎症因子表达,并且存在浓度相关性。提示 AS-IV可能激活 AMPK、抑制 NLRP3 炎症小体通路,发挥抑制炎症,减少凋亡的作用,促进 HGFs 细胞的修复^[5]。

AMPK 多表达于内皮细胞、骨骼肌组织中,可保护细胞功能,对细胞氧化应激、炎症反应具有调控作用。相关研究发现,在机体受到刺激后,AMPK 表达受到抑制,激活 NLRP3 炎症小体,促进细胞焦亡及炎症反应,进而引起中耳炎的发生,此外,还可参与多种炎症相关疾病的发生,如脓毒症等^[25-26]。Yuan 等^[27]发现,AMPK/NLRP3 通路 with 细胞焦亡存在密切联系,在脊髓损伤细胞中,通过激活磷酸化 AMPK,可抑制 NLRP3 表达,进而降低促炎因子 IL-6 的释放,抑制炎症反应,减少细胞损伤、焦亡。曹雪等^[28]发现,在 LPS 诱导的牙周膜干细胞中,通过调控 AMPK/NLRP3 通路,激活 AMPK 磷酸化,抑制 NLRP3 蛋白表达,可有效逆转细胞的凋亡及炎症反应,进而对细胞炎性损伤起到保护作用。本研究中发现,AS-IV可呈浓度相关性的促进 Pg-LPS 诱导的 HGFs 细胞中 p-AMPK/AMPK 蛋白表达,抑制 NLRP3 蛋白表达,可推测 AMPK/NLRP3 通路可促进 Pg-LPS 诱导的 HGFs 增殖、迁移,抑制细胞凋亡及炎症反应,进一步分析发现,AS-IV处理并加入 AMPK/NLRP3 通路抑制剂后,部分逆转了 AS-IV对 Pg-LPS 诱导的 HGFs 增殖、迁移的促进作用和凋亡的抑制作用,提示 AS-IV可能通过调控 AMPK/NLRP3 通路,提高细胞增殖、迁移能力,抑制凋亡和炎症反应,抑制牙周炎疾病发生。基于既往研究可知,AS-IV对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和迁移具有重要作用,可通过抑制 Notch 通路,起到抑制细胞增殖、迁移的作用^[29];此外,AS-IV还对星形胶质细胞炎症反应具有重要的调控作用^[30]。但是其对 Pg-LPS 诱导的 HGFs 增殖、迁移以及炎症反应的作用尚未有研究,因此,本研究创新性探究 AS-IV对 Pg-LPS 诱导的 HGFs 细胞增殖、迁移及炎症反应的影响,并进一步探究了其分子作用机制,为临床开发新型治疗方案提供新的思路。

AS-IV通过调控 AMPK/NLRP3 通路,促进 Pg-

LPS 诱导的 HGFs 细胞增殖、迁移,抑制细胞凋亡和炎症反应。本研究只局限于细胞水平,未建立动物模型及临床试验的深入探究,且未对通路进行深度验证,未探索上下游分子等调控机制,因此后续将进一步的探究和分析。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋雪,陆慧,高庆玲,等. 车前草苷通过抑制 NF- κ B/IL-6 信号通路减弱 LPS 诱导的人牙龈成纤维细胞的炎症反应 [J]. 河北医学, 2024, 30(9): 1452-1456.
Song X, Lu H, Gao Q L, et al. Plantamajoside attenuates LPS-induced inflammatory response of human gingival fibroblasts by inhibiting the NF- κ B/IL-6 signaling pathway [J]. Hebei Med, 2024, 30(9): 1452-1456.
- [2] Tavelli L, McGuire M K, Zucchelli G, et al. Extracellular matrix-based scaffolding technologies for periodontal and peri-implant soft tissue regeneration [J]. J Periodontol, 2020, 91(1): 17-25.
- [3] Qiu W, Wang Z D, Chen Z H, et al. The adiponectin receptor agonist AdipoAI attenuates periodontitis in diabetic rats by inhibiting gingival fibroblast-induced macrophage migration [J]. Br J Pharmacol, 2023, 180(18): 2436-2451.
- [4] Wan J J, Zhang Z, Wu C N, et al. Astragaloside IV derivative HHQ16 ameliorates infarction-induced hypertrophy and heart failure through degradation of lncRNA4012/9456 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 414.
- [5] Tian L L, Zhao J L, Kang J Q, et al. Astragaloside IV alleviates the experimental DSS-induced colitis by remodeling macrophage polarization through STAT signaling [J]. Front Immunol, 2021, 12: 740565.
- [6] 王素文, 赖思煜, 习利军, 等. 黄芪甲苷调节人牙周膜细胞炎症反应及成骨分化的作用及机制研究 [J]. 口腔医学研究, 2020, 36(2): 121-125.
Wang S W, Lai S Y, Xi L J, et al. Effect and mechanism of astragaloside on regulating the inflammatory response and osteogenic differentiation of hu-man periodontal ligament cells [J]. J Oral Sci Res, 2020, 36(2): 121-125.
- [7] Zhong S F, Chen W J, Wang B C, et al. Energy stress modulation of AMPK/FoxO3 signaling inhibits mitochondria-associated ferroptosis [J]. Redox Biol, 2023, 63: 102760.
- [8] Yang M, Luo S L, Jiang N, et al. DsbA-L ameliorates renal injury through the AMPK/NLRP3 inflammasome signaling pathway in diabetic nephropathy [J]. Front

- Physiol, 2021, 12: 659751.
- [9] 李坤阳, 陈栋, 左春然, 等. 姜黄素通过上调 miR-124 抑制牙龈卟啉单胞菌 LPS 诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(10): 1867-1874.
- Li K Y, Chen D, Zuo C R, et al. Curcumin inhibits *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts by up-regulating miR-124 [J]. Chin J Pathophysiol, 2020, 36(10): 1867-1874.
- [10] 李均, 徐艺, 冉阳, 等. 汉黄芩素调节 AMPK/NLRP3 信号通路对 H/R 诱导的心肌细胞凋亡的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(17): 3211-3216, 3225.
- Li J, Xu Y, Ran Y, et al. Effect of wogonin on H/R induced cardiomyocyte apoptosis by regulating the AMPK/NLRP3 signaling pathway [J]. Prog Mod Biomed, 2024, 24(17): 3211-3216, 3225.
- [11] Zhang K Y, Chen X X, Zhou R, et al. Inhibition of gingival fibroblast necroptosis mediated by RIPK3/MLKL attenuates periodontitis [J]. J Clin Periodontol, 2023, 50(9): 1264-1279.
- [12] 曹倩, 王鹏来, 姜艳秋, 等. 葛根素调节 Nrf2/HO-1 信号通路对脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2024, 24(18): 3422-3428.
- Cao Q, Wang P L, Jiang Y Q, et al. Effect of puerarin on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Prog Mod Biomed, 2024, 24(18): 3422-3428.
- [13] Yao S Q, Jiang C X, Zhang H H, et al. Visfatin regulates Pg LPS-induced proinflammatory/prodegradative effects in healthy and inflammatory periodontal cells partially via NF- κ B pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021, 1868(8): 119042.
- [14] Li L, Sun W, Yu J, et al. Effects of titanium dioxide microparticles and nanoparticles on cytoskeletal organization, cell adhesion, migration, and proliferation in human gingival fibroblasts in the presence of lipopolysaccharide [J]. J Periodontal Res, 2022, 57(3): 644-659.
- [15] Wei Y R, Peng Z J. Hsa_circ_0099630 knockdown induces the proliferation and osteogenic differentiation and attenuates the apoptosis of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced human periodontal ligament fibroblasts [J]. Ann Transl Med, 2022, 10(18): 993.
- [16] Park C M, Yoon H S. Chlorogenic acid as a positive regulator in LPS-PG-induced inflammation via TLR4/MyD88-mediated NF- κ B and PI3K/MAPK signaling cascades in human gingival fibroblasts [J]. Mediators Inflamm, 2022, 2022: 2127642.
- [17] 范晶, 高一曼, 郑圆, 等. 甘草总黄酮通过调控 MAPK/NF- κ B 信号通路对脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应的抑制作用 [J]. 中国药师, 2022, 25(12): 2101-2107.
- Fan J, Gao Y M, Zheng Y, et al. Inhibitory effect of total flavonoids of licorice on lipopolysaccharide-induced inflammatory response of human gingival fibroblasts by regulating MAPK/NF- κ B signaling pathway [J]. China Pharm, 2022, 25(12): 2101-2107.
- [18] 王欣, 束传亮. miR-17-5p 调控 TXNIP/NLRP3 信号通路对牙龈卟啉单胞菌 LPS 诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应的影响 [J]. 中国病原生物学杂志, 2025, 20(4): 460-465.
- Wang X, Shu C L. The effect of miR-17-5p on *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced inflammatory response of human gingival fibroblasts by regulating the TXNIP/NLRP3 signaling pathway [J]. J Pathog Biol, 2025, 20(4): 460-465.
- [19] 王春, 向学熔, 杨明聪, 等. 青藤碱对牙龈卟啉单胞菌脂多糖诱导的人牙龈成纤维细胞 IL-8 表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(19): 1972-1976.
- Wang C, Xiang X R, Yang M C, et al. Effect of sinomenine on IL-8 expression in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated human gingival fibroblasts [J]. J Third Mil Med Univ, 2012, 34(19): 1972-1976.
- [20] 宋雪, 陆慧, 高庆玲, 等. 车前草苷通过抑制 NF- κ B/IL-6 信号通路减弱 LPS 诱导的人牙龈成纤维细胞的炎症反应 [J]. 河北医学, 2024, 30(9): 1452-1456.
- Song X, Lu H, Gao Q L, et al. Plantamajoside attenuates LPS-induced inflammatory response of human gingival fibroblasts by inhibiting the NF- κ B/IL-6 signaling pathway [J]. Hebei Med, 2024, 30(9): 1452-1456.
- [21] 张怡, 侯仙明, 张拴成, 等. 黄芪甲苷通过调控 Caspase-1 介导的经典焦亡途径抑制细胞焦亡缓解脑缺血/再灌注损伤的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(2): 325-329.
- Zhang Y, Hou X M, Zhang S C, et al. Astragaloside IV improves cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting pyroptosis via regulating Caspase-1-mediated classical pyroptosis pathway [J]. Chin J Immunol, 2024, 40(2): 325-329.
- [22] Liang J J, Yang C Y, Li P C, et al. Astragaloside IV inhibits AOM/DSS-induced colitis-associated tumorigenesis via activation of PPAR γ signaling in mice [J]. Phytomedicine, 2023, 121: 155116.
- [23] 王丹, 刘雨笛, 邵丽萍, 等. 黄芪甲苷抑制

- TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路对牙周炎正畸大鼠牙周组织重塑的影响 [J]. 实用口腔医学杂志, 2023, 39(6): 722-729.
- Wang D, Liu Y D, Shao L P, et al. The impacts of astragaloside IV on periodontal tissue remodeling in orthodontic rats with periodontitis by inhibiting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. J Pract Stomatol, 2023, 39(6): 722-729.
- [24] 陈亚琼, 高鹏, 沈慧. 黄芪甲苷通过 miR-126/NF- κ B 信号通路调控人牙龈成纤维细胞增殖及凋亡的分子机制 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(4): 921-925.
- Chen Y Q, Gao P, Shen H. Molecular mechanism of astragaloside IV regulating proliferation and apoptosis of human gingival fibroblasts through miR-126/NF- κ B signal pathway [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(4): 921-925.
- [25] 李艳峰, 卢振民. 基于 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡探究牡荆素对大鼠分泌性中耳炎的抑制作用 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(10): 2397-2404.
- Li Y F, Lu Z M. Exploring the inhibitory effect of vitex in on otitis media with effusion in rats based on AMPK/NLRP3 pathway mediated pyroptosis [J]. Drugs Clin, 2023, 38(10): 2397-2404.
- [26] 谢航, 李华, 李海涛, 等. 当归多糖调控 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡对脓毒症大鼠肠道损伤的改善作用 [J]. 中国医科大学学报, 2024, 53(12): 1057-1063, 1070.
- Xie H, Li H, Li H T, et al. Effect of Angelica sinensis polysaccharides on intestinal injury in septic rats by regulating AMPK/NLRP3 pathway-mediated pyroptosis [J]. J China Med Univ, 2024, 53(12): 1057-1063, 1070.
- [27] Yuan Y J, Fan X Y, Guo Z P, et al. Metformin protects against spinal cord injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. Anal Cell Pathol, 2022, 2022: 3634908.
- [28] 曹雪, 朱桃燕. 非瑟酮调节 AMPK/NLRP3 信号通路对 LPS 诱导的牙周膜干细胞炎性损伤的影响 [J]. 临床口腔医学杂志, 2023, 39(2): 72-76.
- Cao X, Zhu T Y. Influence of fisetin on LPS-induced inflammatory injury of periodontal ligament stem cells through AMPK/NLRP3 signaling pathway [J]. J Clin Stomatol, 2023, 39(2): 72-76.
- [29] 于婧文, 郭敏芳, 张冰心, 等. 黄芪甲苷可抑制炎症诱导星形胶质细胞激活及炎症反应 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(31): 5022-5028.
- Yu J W, Guo M F, Zhang B X, et al. Astragaloside inhibits astrocyte activation and inflammatory response induced by inflammation [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(31): 5022-5028.
- [30] 蒋智永, 席庆春, 李旋, 等. 黄芪甲苷调节 Notch 信号通路对瘢痕疙瘩成纤维细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2025, 47(4): 832-840.
- Jiang Z Y, Xi Q C, Li X, et al. The impacts of astragaloside IV on the proliferation and migration of human keloid fibroblasts by regulating the Notch signaling pathway [J]. Chin J Cell Biol, 2025, 47(4): 832-840.

[责任编辑 兰新新]