

基于 PI3K/Akt 通路探讨积雪草酸对健康人牙周膜细胞增殖、凋亡及成骨分化的作用机制研究

杨帆¹, 范彦利¹, 张可娟¹, 袁帅²

1. 河南省荣军医院 口腔科, 河南 新乡 453000

2. 郑州大学第一附属医院 口腔内科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 观察积雪草酸对健康人牙周膜细胞 (human periodontal ligament cells, hPDLs) 增殖、凋亡及成骨分化的作用, 探究其作用机制。方法 采用不同浓度积雪草酸处理健康 hPDLs, CCK8 法检测不同时间点积雪草酸对 hPDLs 的增殖能力的影响; 流式细胞仪检测细胞凋亡情况; 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 和茜素红染色检测细胞成骨分化情况, qRT-PCR 法检测细胞 ALP、Runx 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2) 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator nuclear factor κ B ligand, RANKL) mRNA 表达水平; Western blotting 法检测细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein gene, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (p-PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt (p-Akt) 蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 不同浓度积雪草酸对 hPDLs 增殖和凋亡无显著影响。在成骨诱导条件下, 与对照组比较, 不同浓度积雪草酸可提高 ALP、Runx2、OCN、BMP2 mRNA 表达, 减少 RANKL mRNA 表达, 上调 PI3K 和 Akt 磷酸化水平, 其中 50 μ g/mL 积雪草酸的效果最佳。结论 100 μ g/mL 以下积雪草酸对健康 hPDLs 增殖和凋亡无影响, 但可促进 hPDLs 成骨分化能力, 其作用机制可能与激活 PI3K/AKT 通路有关。

关键词: 积雪草酸; 人牙周膜细胞; 增殖; 凋亡; 成骨分化; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)11-2231-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.11.003

Based on PI3K/Akt pathway, to explore the mechanism of asiatic acid on proliferation, apoptosis and osteogenic differentiation of healthy human periodontal membrane cells

YANG Fan¹, FAN Yan-li¹, ZHANG Ke-juan¹, YUAN Shuai²

1. Department of Stomatology, Henan Rongjun Hospital, Xinxiang 453000, China

2. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To observe the effects of asiatic acid on proliferation, apoptosis, and osteogenic differentiation of healthy human periodontal ligament cells (hPDLs), and to explore its mechanism. **Methods** hPDLs were treated with different concentrations of asiatic acid. CCK8 method was used to detect the effect of asiatic acid on the proliferation of healthy hPDLs at different time points. Apoptosis was detected by flow cytometry. Osteogenic differentiation was detected by alkaline phosphatase (ALP) and alizarin red staining. The mRNA expression levels of ALP, Runx related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin (OCN), bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and receptor activator nuclear factor ligand (RANKL) were detected by RT-qPCR. Western blot was used to detect B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein gene (Bax), Caspase-3, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), p-PI3K and protein kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt) protein expression levels. **Results** Compared with control group, asiatic acid had no significant effect on the proliferation and apoptosis of hPDLs. Under osteogenic induction conditions, compared with control group, different concentrations of asiatic acid could increase the mRNA expression of ALP, Runx2, OCN and BMP2, decrease the mRNA expression of RANKL, and up regulate the phosphorylation levels of PI3K and Akt. 50 μ g/mL

收稿日期: 2021-03-10

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20190198)

作者简介: 杨帆 (1983—), 男, 本科, 主治医师, 研究方向为口腔修复学、口腔牙周病学。E-mail: e365_hh@126.com

asiatic acid had the best effect. **Conclusion** Asiatic acid below 100 $\mu\text{g/mL}$ has no effect on the proliferation and apoptosis of hPDLs, but can promote the osteogenic differentiation of healthy hPDLs, its mechanism may be related to the activation of PI3K/Akt pathway.

Key words: asiatic acid; human periodontal ligament cells; proliferation; apoptosis; osteogenic differentiation; PI3K/Akt pathway

牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLs)是牙周膜中常见细胞类型,其具有成骨和成牙骨分化潜能,是参与牙周组织再生和修复的重要细胞之一^[1]。因此,寻找和筛选促进 PDLs 成骨分化过程的药物,分析其促进 PDLs 骨向分化调节机制成为当前研究热点。积雪草酸是传统中草药积雪草的有效成分,具有抗癌、抗炎、抗氧化、保肝等药理学作用^[2-6]。研究表明,积雪草酸可促进小鼠成骨细胞分化,提高矿化能力,抑制成骨细胞凋亡^[7]。但其对健康人牙周膜细胞(human periodontal ligament cells, hPDLs)成骨分化的作用研究尚少,其作用机制尚不清晰。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路是一种密切参与到细胞生长繁殖、运动、代谢和免疫应答调节的信号通路。研究表明,激活 PI3K/Akt 通路可促进人骨髓间充质干细胞的成骨分化^[8-9]。因此,本研究以 PI3K/Akt 通路为切入点,观察积雪草酸对健康 hPDLs 增殖凋亡及成骨分化的作用并分析其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

积雪草酸(质量分数>96%,大连美仑生物技术有限公司,货号 MB6704); DMEM 培养基、胎牛血清、Transwell 小室、维生素 C、 β -甘油磷酸钠、地塞米松、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 染色液、茜素红 S 染色液、Annexin V-FITC 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号 11995、S9020、3422、A8100、G8100、D8040、G1480、G1450、CA1020); RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit(美国 Thermo Scientific,货号 K1621); 引物(日本 Takara,货号 D3810); B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein gene, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、PI3K、Akt、磷酸化 Akt(phospho-Akt, p-Akt) 兔源单克隆抗体,羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号 60178-1-Ig、60267-1-Ig、66470-2-Ig、67071-1-Ig、60203-2-Ig、66444-1-Ig、PR30011); 磷酸化 PI3K(p-PI3K, 美国 CST 公司,货号 17366)。

超净工作台(Thermo Fisher Scientific); 7500 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems); IX53 显微镜(日本奥林巴斯); Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Fisher Scientific); DYCZ-24KS 型双板垂直电泳仪(北京六一仪器厂); G:BOX 多功能凝胶成像系统(Syngene)。

1.2 hPDLs 原代培养

取因正畸需要而拔出的健康前磨牙 6 颗(拔牙前已征得患者知情同意),在超净工作台内刮取牙根中 1/3 牙周膜组织,充分剪碎后均匀平铺于 6 孔板,加入含 10%血清和 1%双抗 DMEM 培养液 2 mL,置于培养箱中培养,培养条件为 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$,每 3 天换液 1 次,当细胞生长融合至 80% 时,胰酶消化传代,取第 3~5 代 hPDLs 用于实验。经郑州大学第一附属医院口腔内科袁帅医生团队检定,本实验分离的细胞为 hPDLs。

1.3 CCK8 法检测细胞增殖能力

取对数期生长的 hPDLs,以每孔 1 000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,分为对照组和积雪草酸组,对照组使用不含药的完全培养基培养,积雪草酸组细胞使用含有 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸的完全培养基培养^[9],每组设置 5 个复孔,CCK8 法分别检测培养 1~7 d 时细胞的增殖情况,酶标仪 450 nm 波长下检测并记录吸光度(A)值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡情况

取对数期生长的 hPDLs,细胞分组同“1.3”,连续培养 7 d 后收集细胞,PBS 洗涤 3 次,1 mL binding buffer 重悬,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,每管加入 100 μL 细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC,室温避光孵育 10 min,加入 5 μL PI,室温避光孵育 5 min,加入 PBS 至 500 μL ,混匀后使用流式细胞仪检测细胞凋亡率^[10]。

1.5 Western blotting 法检测 hPDLs 中 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达

取对数期生长的 hPDLs,细胞分组同“1.3”,连续培养 7 d 后收集细胞,加入蛋白裂解液冰上裂解 20 min,离心取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,加入 loading buffer,在 EP 管中混匀后置于沸水中煮沸 5 min 使蛋白变性。配置 15% 的分离胶和 5%

的浓缩胶,每个样本取 30 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,上样后 80 V 电泳 2 h, 60 V 转膜 2 h。PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中室温环境下封闭 2 h, 封闭结束后加入各一抗稀释液(稀释比例均为 1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗涤 3 次, 加入羊抗兔二抗孵育 2 h (稀释比例为 1:1000), 洗涤 3 次, 滴加 ECL 发光液, 置于凝胶成像系统显影。以 Image J 软件分析各个蛋白对应的灰度值, 计算蛋白相对表达量, 蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值^[10]。

1.6 hPDLCS 成骨分化检测

1.6.1 ALP 染色 取对数期生长的 hPDLCS, 并以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后细胞贴壁, 更换为成骨诱导培养基(DMEM 完全培养基+10 ng/mL 地塞米松+50 mg/mL 维生素 C+10 mmol/L 的 β -甘油磷酸钠), 同时添加积雪草酸使其终浓度分别为 0 (对照)、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每 2 天更换 1 次培养基。培养 7 d 后弃上清, PBS 冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 冲洗 2 次, 滴加 ALP 孵育液放入湿盒避光孵育 20 min, PBS 清洗 2 次, 核固红复染 3 min, PBS 清洗后镜检^[10]。

1.6.2 茜素红染色 细胞处理和给药同“1.6.1”。培养 21 d 后弃上清, PBS 冲洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃固定液, 用双蒸水洗 3 次, 将水完全吸干净后缓慢加入茜素红染色液, 染色 20~30 min, 然后用双蒸水洗 5 次, 显微镜下观察并拍照。然后在各培养孔中加入 2 mL 10% 氯化十六烷基吡啶, 室温静置 30 min 后用酶标仪 562 nm 波长下检测各孔 A 值^[10]。

1.7 qRT-PCR 法检测 hPDLCS 中 ALP、Runx2、OCN、BMP2 和 RANKL mRNA 表达水平

细胞处理和给药同“1.6.1”。每 2 天更换 1 次培养基, 培养 14 d 后收集细胞, 加入 Trizol 裂解液提取细胞总 RNA, 使用 RevertAidTM first Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒合成 cDNA, 作为荧光定量模板。引物由日本 Takara 公司设计合成, 引物序列见表 1。反应体系: dNTPs 0.5 μL +5 \times Buffer 5 μL +Taq 酶 0.3 μL +MgCl₂ 1.5 μL +cDNA 模板 2 μL +上下游引物各 1 μL , 加去离子水至总体积 25 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 终止反应, 实验重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。

表 1 引物序列

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
ALP	CAGAAGAAGGACA AACTGGG	ATTGTATGTCTTGGAC AGAGC
Runx2	CCGCCTCAGTGATT TAGGGC	GGGTCTGTAATCTGA CTCTGTCC
OCN	AGGGCAGCGAGGTATCCTGAAAGCCGATG GTGAA	TGGT
BMP2	ATGTTTCGCCTGAAA CAGAGACCCA	CTTACAGCTGGACTT AAGGCGTTTC
RANKL	CAGCCTTTTGCTCATGGTACCAAGAGGACA CTCACTATTAA	GACTCACTTTAA
GAPDH	TGCTTCACCACCTT CTTGA	TCACCATCTTCCAGG AGC

1.8 Western blotting 法检测 hPDLCS 中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平

细胞处理和给药同“1.6.1”。每 2 天更换 1 次培养基, 培养 14 d 后收集细胞, 蛋白提取和 Western blotting 方法同“1.5”, 检测 hPDLCS 中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白相对表达水平。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 25.0 软件进行统计分析数据, 实验重复 3 次, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本比较采用单因素方差分析, 两样本比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 积雪草酸对 hPDLCS 增殖能力的影响

原代培养的健康 hPDLCS 呈梭形、放射状排列生长, 见图 1。CCK8 实验结果显示, 各组细胞的增殖活力随着时间推移增加, 但与对照组比较, 不同浓度积雪草酸组细胞的增殖能力无显著差异。各浓度积雪草酸组之间差异亦无统计学意义, 见图 2。



图 1 原代培养的 hPDLCS ($\times 200$)

Fig. 1 Primary cultured hPDLCS ($\times 200$)

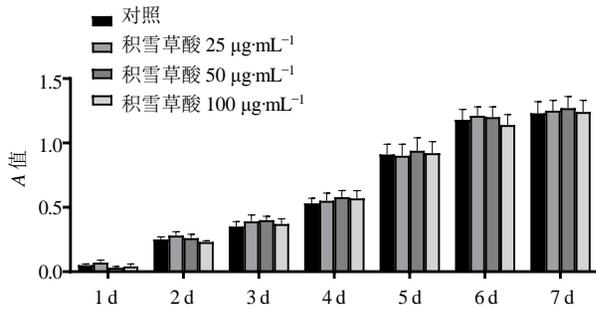


图 2 积雪草酸对 hPDLCs 增殖能力的影响

Fig. 2 The effect of asiatic acid on the proliferation of hPDLCs

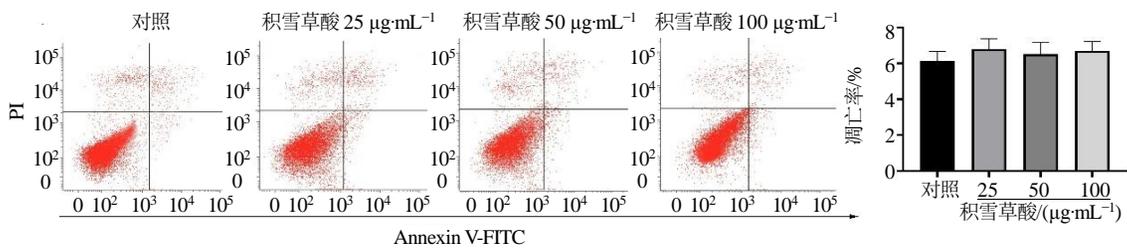


图 3 积雪草酸对 hPDLCs 凋亡的影响

Fig. 3 The effect of asiatic acid on the apoptosis of hPDLCs

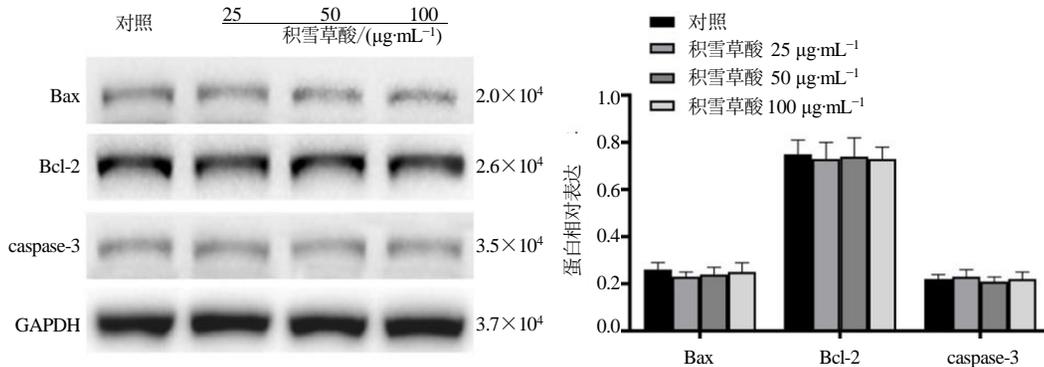


图 4 积雪草酸对 hPDLCs Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of asiatic acid on the expression of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in hPDLCs

2.4 积雪草酸对 hPDLCs 成骨分化的影响

ALP 染色和茜素红染色显示, 25 μg/mL 积雪草酸组 hPDLCs ALP 染色和茜素红染色程度与对照组相同, 50、100 μg/mL 积雪草酸组 hPDLCs ALP 染色和茜素红染色则显著加深, 矿化结节增多, 其中 50 μg/mL 积雪草酸组 hPDLCs ALP 染色和茜素红染色程度比 100 μg/mL 积雪草酸组更深, 矿化结节增多。矿化结节溶解后定量结果显示, 对照组和 25 μg/mL 积雪草酸组 A 值差异无统计学意义, 而 50、100 μg/mL 积雪草酸组 A 值显著升高, 其中 50 μg/mL 积雪草酸组 A 值高于 100 μg/mL 积雪草酸

2.2 积雪草酸对 hPDLCs 凋亡率的影响

结果显示, 不同浓度积雪草酸处理后细胞凋亡率与对照组比较无显著差异。积雪草酸各浓度组之间凋亡率差异亦无统计学意义, 见图 3。

2.3 积雪草酸对 hPDLCs Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组比较, 不同浓度积雪草酸处理后 hPDLCs Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义。各浓度积雪草酸组之间 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达差异亦无统计学意义, 见图 4。

组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5、6。

2.5 积雪草酸对 hPDLCs 中 ALP、Runx2、OCN、BMP2 和 RANKL mRNA 表达水平的影响

与对照组比较, 25、50、100 μg/mL 积雪草酸组 hPDLCs 成骨相关因子 ALP、Runx2、OCN 和 BMP2 mRNA 表达均显著升高, 破骨相关基因 RANKL mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$)。与 25 μg/mL 积雪草酸组比较, 50 μg/mL 积雪草酸组 ALP、Runx2、OCN 和 BMP2 mRNA 表达增加, RANKL mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 100 μg/mL 积雪草酸组 ALP、Runx2 和 BMP2 mRNA 表达增加, RANKL

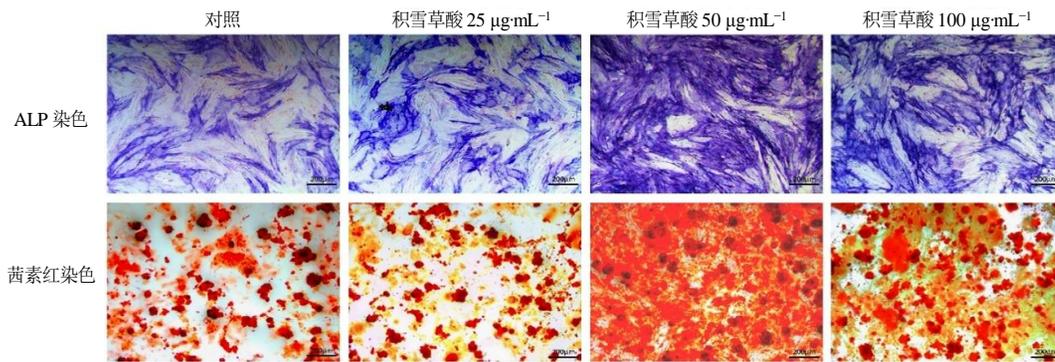
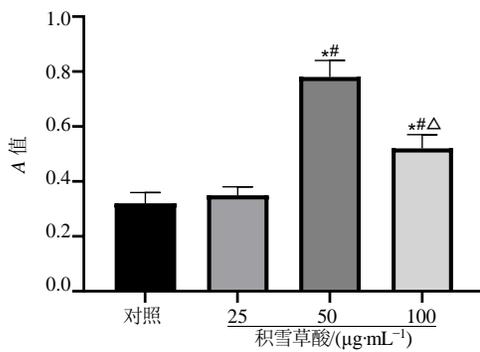


图 5 ALP 染色和茜素红染色检测积雪草酸对 hPDLs 成骨分化的影响 (×200)

Fig. 5 ALP staining and alizarin red staining were used to detect the effect of asiatic acid on the osteogenic differentiation of hPDLs (×200)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较: # $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较: $\Delta P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asiatic acid group;
 $\Delta P < 0.05$ vs 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asiatic acid group

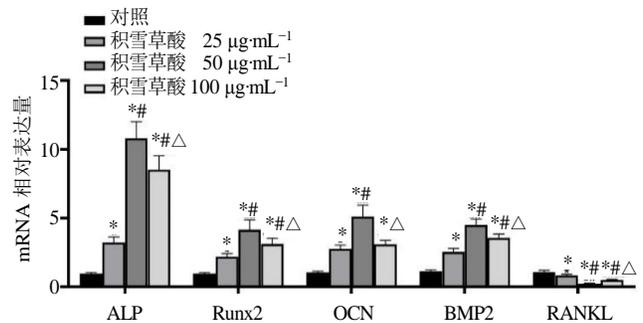
图 6 各组 hPDLs 钙结节吸光度值比较

Fig. 6 Comparison of absorbance values of hPDLs calcium nodules in each group

mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), OCN mRNA 表达与 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较差异无统计学意义。与 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组 ALP、Runx2、OCN 和 BMP2 mRNA 表达减少, RANKL mRNA 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 7。

2.6 积雪草酸对 hPDLs 中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平的影响

与对照组比较, 各浓度积雪草酸组 hPDLs PI3K 和 Akt 磷酸化水平平均高于对照组 ($P < 0.05$)。与 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较, 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组 PI3K 和 Akt 磷酸化水平均升高, 其中 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组 PI3K 和 Akt 磷酸化水平高于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$),



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较: # $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 积雪草酸组比较: $\Delta P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asiatic acid group;
 $\Delta P < 0.05$ vs 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asiatic acid group

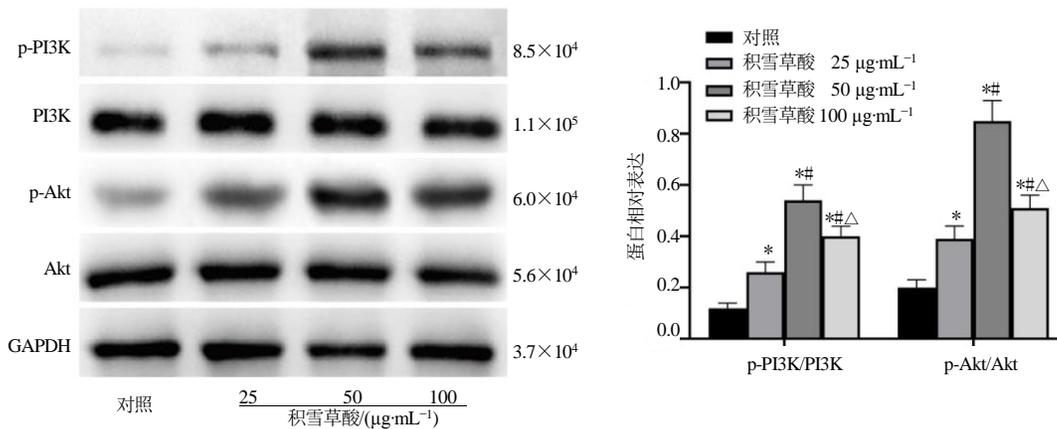
图 7 积雪草酸对 hPDLs ALP、Runx2、OCN、BMP2 和 RANKL mRNA 表达水平的影响

Fig. 7 Effect of asiatic acid on mRNA expression of ALP, Runx2, OCN, BMP2 and RANKL in hPDLs

见图 8。

3 讨论

PDLs 是牙周组织重要的功能细胞, 其增殖、凋亡及成骨分化是影响牙周组织再生和牙槽骨重建的关键因素, 诱导 hPDLs 成骨分化现已成为牙周组织工程研究热点^[11]。现代研究发现, 积雪草酸具有促进骨形成、抑制骨吸收、促进骨髓基质干细胞成骨分化、预防骨量丢失的作用, 具有较好的应用前景^[12]。但积雪草酸对 hPDLs 的研究尚少, 其作用机制尚不清晰。本研究猜测积雪草酸对健康 hPDLs 生物学功能和成骨分化可能具有一定影响。因此, 本研究检测了积雪草酸对 hPDLs 增殖能力的影响, 结果显示, 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以内, 积雪草酸对 hPDLs 增殖能力无显著影响。细胞凋亡率检测结果与上述结果一致, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下积雪草



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 25 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸组比较: # $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸组比较: $\Delta P < 0.05$
 $*P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 25 $\mu\text{g/mL}$ asiatic acid group; $\Delta P < 0.05$ vs 50 $\mu\text{g/mL}$ asiatic acid group

图 8 积雪草酸对 hPDLCs PI3K 和 Akt 磷酸化水平的影响

Fig. 8 Effect of asiatic acid on PI3K and Akt phosphorylation of hPDLCs

酸对 hPDLCs 无促凋亡作用。Bcl-2 和 Bax 是调控细胞凋亡的关键基因, Bax 过表达可促进细胞凋亡, 而 Bcl-2 可与 Bax 形成二聚体抑制 Bax 基因的表达, 从而抑制细胞凋亡, Bcl-2 和 Bax 可共同激活促凋亡因子 caspase-3 及其家族的其他因子, 引起衰老和凋亡的发生^[13]。在本研究中, 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸组细胞 Bax、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达水平无影响, 上述研究结果均表明在该剂量下, 积雪草酸对 hPDLCs 无细胞毒作用。

hPDLCs 的成骨分化潜能是牙周再生和重建的关键, ALP 是早期成骨细胞分化标志, 在骨形成和矿化过程中发挥重要作用, 其活性反映了细胞成骨分化趋势^[14]。本研究使用不同浓度积雪草酸在成骨诱导环境下处理 hPDLCs, 结果显示, 培养 7 d 后, 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸可使 hPDLCs ALP 染色显著加深, 同样的, 茜素红染色也显示 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸可使细胞染色程度加深, 矿化结节增多, 且 50 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸的作用优于 100 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸, 表明在一定剂量和成骨诱导环境下, 积雪草酸可促进 hPDLCs 的成骨分化。Runx2 是调控成骨分化的主要转录因子, 与 BMP2 一样均是较强的成骨激动剂, 在成骨细胞的形成、分化、活性和功能中具有重要作用^[15]。OCN 是骨基质中特异性非胶原蛋白, 其表达水平反映了成骨细胞活性和骨转换情况, 在骨钙代谢中发挥重要作用^[16]。RANKL 是促进破骨细胞成熟的因子, 与破骨细胞前体细胞表面 RANK 上的 TRAF6 特异性结合后, 将信号传入细胞, 促进破骨细胞前体细胞增殖、分化及增强骨细

胞骨吸收活性等^[17]。为了进一步探究积雪草酸对 hPDLCs 的成骨分化的作用, 我们检测了 hPDLCs 中 ALP、Runx2、OCN、BMP2 和 RANKL mRNA 表达水平, 与上述研究结果趋势一致, 不同浓度积雪草酸可增加 ALP、Runx2、OCN 和 BMP2 mRNA 的表达水平, 降低 RANKL mRNA 表达水平, 其中 50 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸的作用最佳。上述研究结果提示, 在成骨诱导环境下, 积雪草酸可促进 hPDLCs 的成骨分化。

PI3K/Akt 信号通路是与细胞生长、繁殖、蛋白合成、新陈代谢和凋亡等生物活动密切相关的信号通路, 参与了恶性肿瘤、内分泌、心血管及神经系统等多种疾病的发生发展过程^[18]。已有多项研究表明, 激活 PI3K/Akt 信号通路可促进 PDLCs 增殖和成骨分化, 促进成骨相关因子 ALP、Runx2、OCN 等的表达^[19-20]。在本研究中, 积雪草酸在成骨诱导条件下可显著上调 PI3K 和 Akt 磷酸化水平, 其中 50 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸的作用强于 25 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸组的作用。上述研究结果提示, 积雪草酸对 hPDLCs PI3K/AKT 信号通路具有活化作用。

综上所述, 本研究中不同浓度积雪草酸对健康 hPDLCs 的增殖和凋亡无显著影响, 但可促进 hPDLCs 成骨分化, 其中 50 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草酸在成骨诱导环境下的作用最强, 其作用机制可能与积雪草酸活化了 PI3K/Akt 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 李静雅, 税钰森, 郭永文. 循环牵张应力影响人牙周康

- 细胞成骨分化机制的研究进展 [J]. 国际口腔医学杂志, 2020, 47(6): 652-660.
- [2] Islam M T, Ali E S, Uddin S J, *et al.* Anti-cancer effects of Asiatic acid, a triterpene from centilla asiatica L: a review [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(5): 536-547.
- [3] Yu X, Zheng G, Hu Z, *et al.* Asiatic acid ameliorates obesity-related osteoarthritis by inhibiting myeloid differentiation protein-2 [J]. *Food Funct*, 2020, 11(6): 5513-5524.
- [4] Pang X H, Qiao Q, Vonglorkham S, *et al.* Asiatic acid ameliorates acute hepatic injury by reducing endoplasmic Reticulum stress and triggering hepatocyte autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110375.
- [5] Kong D J, Fu P, Zhang Q, *et al.* Protective effects of asiatic acid against pelvic inflammatory disease in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(6): 4687-4692.
- [6] 冯旭, 郭飞飞, 赵龙, 等. 积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 1037-1042.
- [7] 许燕, 肖明, 李涛, 等. 积雪草酸促进成骨细胞分化的机制 [J]. 华西药理学杂志, 2019, 34(4): 347-351.
- [8] Chen C Z, Jiang Z W, Yang G L. Laminins in osteogenic differentiation and pluripotency maintenance [J]. *Differentiation*, 2020, 114: 13-19.
- [9] Zhu X, Zhou L, Liu Z, *et al.* Telomerase enhances osteogenic differentiation of sheep bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by up-regulating PI3K/Akt pathway *in vitro* [J]. *Pol J Vet Sci*, 2020, 23(3): 359-372.
- [10] 郝春波, 邓伟, 巩蕾, 等. 积雪草酸对人牙周膜细胞增殖、迁移和成骨分化的影响 [J]. 实用口腔医学杂志, 2020, 36(4): 666-670.
- [11] Qiu W, Wu B L, Fang F C. Overview of noncoding RNAs involved in the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells [J]. *World J Stem Cells*, 2020, 12(4): 251-265.
- [12] 吴少科, 陈晓骊, 孙欣, 等. 积雪草酸对高血脂小鼠骨量丢失的保护作用 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(3): 281-289.
- [13] Campbell K J, Tait S W G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer [J]. *Open Biol*, 2018, 8(5): 180002.
- [14] Zhang J F, Zhang W B, Dai J W, *et al.* Overexpression of Dlx2 enhances osteogenic differentiation of BMSCs and MC3T3-E1 cells via direct upregulation of Osteocalcin and Alp [J]. *Int J Oral Sci*, 2019, 11(2): 12.
- [15] Wang L T, Lee Y W, Bai C H, *et al.* A rapid and highly predictive *in vitro* screening platform for osteogenic natural compounds using human Runx2 transcriptional activity in mesenchymal stem cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 607383.
- [16] 余丽金, 温广宇, 崔红旺. 绝经后血清 BMP-7、OCN 水平与骨质疏松的相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(9): 1306-1310.
- [17] 张楚天, 林燕萍. 基于 OPG/RANKL/RANK 信号通路探究中药对破骨细胞的调控作用 [J]. 康复学报, 2018, 28(5): 59-64, 70.
- [18] Fruman D A, Chiu H, Hopkins B D, *et al.* The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605-635.
- [19] Han Y Y, Wang X X, Ma D, *et al.* Ipriflavone promotes proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament cells by activating GPR30/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 137-148.
- [20] Ying Y K, Luo J. Salidroside promotes human periodontal ligament cell proliferation and osteocalcin secretion via ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5041-5045.

[责任编辑 高源]