

小檗碱通过PI3K/AKT信号通路调控人牙周膜干细胞的增殖和成骨分化

刘岚 魏松 张丞 马永平*

(保定市第二医院口腔科, 保定 071051)

摘要 该文旨在探讨小檗碱(berberine)对人牙周膜干细胞(hPDLSCs)增殖和成骨分化的影响及潜在的机制。体外培养hPDLSCs, 将其分为空白对照(Con)组、PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002(LY)组、小檗碱(Ber)组和小檗碱+PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002(Ber+LY)组, 采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测hPDLSCs的增殖活力, 流式细胞仪检测细胞周期分布, 酶联免疫检测仪检测碱性磷酸酶(ALP)活性, 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、骨钙蛋白(OCN)、骨膜蛋白(POSTN)和骨桥蛋白(OPN)的表达情况, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN和PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达情况。与Con组相比, Ber组hPDLSCs增殖活力, ALP的活性, S期和G₂/M期细胞比例, PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN、p-PI3K和p-AKT的表达水平均显著升高, G₀/G₁期细胞比例显著降低($P<0.05$), LY组上述指标呈相反变化($P<0.05$); 与Ber组相比, Ber+LY组hPDLSCs增殖活力, ALP的活性, S期和G₂/M期细胞比例, PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN、p-PI3K和p-AKT的表达水平均显著降低, G₀/G₁期细胞比例显著升高($P<0.05$)。小檗碱可通过激活PI3K/AKT信号通路促进hPDLSCs增殖, 并诱导hPDLSCs成骨分化。

关键词 小檗碱; 人牙周膜干细胞; 增殖; 成骨分化; PI3K/AKT信号通路

Berberine Regulates the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells through PI3K/AKT Signaling Pathway

LIU Lan, WEI Song, ZHANG Cheng, MA Yongping*

(Department of Stomatology, the No.2 Hospital of Baoding, Baoding 071051, China)

Abstract This study aims to investigate the effect and potential mechanism of berberine on the proliferation and osteogenic differentiation of hPDLSCs (human periodontal ligament stem cells). hPDLSCs were cultured *in vitro*, and were divided into blank Con (control) group, LY (PI3K/AKT signaling pathway inhibitor LY294002) group, Ber (berberine) group and Ber+LY (berberine+PI3K/AKT signaling pathway inhibitor LY294002) group. CCK-8 (cell counting kit-8) method was used to detect the proliferation activity of hPDLSCs. Flow cytometry was used to detect cell cycle distribution. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect ALP (alkaline phosphatase) activity. qRT-PCR (real-time fluorescent quantitative PCR) was used to analysis the expression of PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Cyclin D1, OCN (osteocalcin), POSTN (periostin) and OPN (osteopontin). Western blot was used to detect the expression of PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN,

收稿日期: 2023-09-11 接受日期: 2023-12-13

河北省保定市科技计划(批准号: 2141ZF006)资助的课题

*通信作者。Tel: 13303120096, E-mail: biluo0303@163.com

Received: September 11, 2023 Accepted: December 13, 2023

This work was supported by the Science and Technology Plan of Baoding City, Hebei Province (Grant No.2141ZF006)

*Corresponding author. Tel: +86-13303120096, E-mail: biluo0303@163.com

OPN and PI3K/AKT signaling pathway-related proteins. Compared with the Con group, the proliferation activity of hPDLSCs in the Ber group, ALP activity, S phase and G₂/M phase cell ratio, PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN, OPN, p-PI3K and p-AKT expression levels were significant increased, the proportion of cells in G₀/G₁ phase was significantly reduced ($P < 0.05$), while the above indicators in the LY group showed opposite changes ($P < 0.05$). Compared with the Ber group, the proliferation activity of hPDLSCs in the Ber+LY group, the activity of ALP, the ratio of cells in S phase and G₂/M phase, the expression levels of PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN, OPN, p-PI3K and p-AKT were significantly reduced, and the proportion of cells in G₀/G₁ phase was significantly increased ($P < 0.05$). Berberine can promote the proliferation of hPDLSCs and induce the osteogenic differentiation of hPDLSCs by activating the PI3K/AKT signaling pathway.

Keywords berberine; human periodontal ligament stem cells; proliferation; osteogenic differentiation; PI3K/AKT signaling pathway

由牙周炎引起的牙周支持组织的缺失是成年人牙齿脱落的主要原因^[1]。尽管常规的牙周治疗可以控制牙周疾病的进展,但无法有效地使缺失的组织再生^[2]。人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)是未分化的间充质细胞,具有高度再生和分化能力,是牙周组织再生最有希望的细胞来源之一^[3]。磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路是调控hPDLSCs成骨分化的重要途径。据报道,激活PI3K/AKT信号通路可上调成骨基因表达,促进hPDLSCs的成骨分化,而阻断该通路则产生相反的效果^[4-5]。小檗碱(berberine, Ber)又称黄连素,是黄连的活性成分之一,有多种药理特性,包括抗菌、消炎、抗癌和降低胆固醇的作用^[6-7]。有报道称,小檗碱经口服给药后,可在体内广泛分布,并且在血药浓度较低的情况下,仍具有较好的生物活性^[8]。研究显示,小檗碱能改善牙周炎^[9-10];还可改善晚期糖基化终产物诱导的hPDLSCs的成骨分化能力^[11],在牙周疾病的治疗中发挥重要作用。此外,小檗碱被报道可通过激活PI3K/AKT信号通路发挥抗凋亡作用^[12-13]。然而,小檗碱是否能调控PI3K/AKT信号通路促进hPDLSCs增殖和成骨分化尚不清楚。因此,本研究探讨了小檗碱对hPDLSCs增殖和成骨分化的影响及潜在机制,以期小檗碱在牙周组织再生中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 hPDLSCs购自美国ATCC细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器 小檗碱购自中国药品生

物制品检定所;PI3K/AKT信号通路特异性抑制剂LY294002购自美国Sigma公司;CCK-8试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司;Trizol试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;逆转录试剂盒和SYBR Green qRT-PCR检测试剂盒购自美国ThermoFisher公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测试剂盒购自北京绿源博德生物科技有限公司;Western blot相关检测试剂和引物购自上海生工生物工程有限公司;增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨膜蛋白(periostin, POSTN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、PI3K、AKT、p-PI3K和p-AKT单克隆抗体和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的IgG二抗均购自美国CST公司。Multiskan FC酶标仪购自美国ThermoFisher公司;DYCP-31DN电泳仪购自北京六一生物科技有限公司;FACSCalibur流式细胞仪购自美国Becton-Dickinson公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将hPDLSCs接种至含DMEM培养基的培养瓶中培养,培养条件设置为:5% CO₂、饱和湿度、37 °C,每隔1天更换1次新的培养液,待单层细胞铺满瓶底时扩大培养,取生长状态良好的细胞用于实验。

1.2.2 小檗碱和LY294002的最佳药物作用浓度筛选 将hPDLSCs以 1×10^4 个/mL的密度接种到96孔板中,每孔接种100 μ L,细胞进入对数生长期后分别以不同浓度(0、1、2.5、5、10、20 μ mol/L)小檗碱或不同浓度(0、0.5、1、2、4、8 μ mol/L) LY294002处理hPDLSCs, 0 μ mol/L小檗碱(或LY294002)处理hPDLSCs

细胞作对照组,同时设不接种细胞的空白孔,48 h后每孔加入10 μL CCK-8试剂37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。于490 nm波长处检测各孔吸光度(D)值,计算细胞活力,公式:细胞活力(%)=[(D 药物处理组- D 空白孔)/(D 对照组- D 空白孔)] \times 100%。

1.2.3 细胞分组处理 将hPDLSCs以 1×10^4 个/mL的密度接种到96孔板中,每孔接种100 μL ,加入DMEM培养液过夜培养,实验分为空白对照(Con)组(hPDLSCs以正常培养液培养)、抑制剂(LY)组(hPDLSCs用含1 $\mu\text{mol/L}$ LY294002的培养液培养)、小檗碱(Ber)组[hPDLSCs以含5 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱(根据预实验结果筛选出的加药浓度)的培养液培养]和小檗碱+抑制剂(Ber+LY)组(hPDLSCs以含5 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱和1 $\mu\text{mol/L}$ LY294002的培养液培养)。

1.2.4 细胞增殖检测 将hPDLSCs接种到96孔板(2×10^4 个/孔)中,待细胞贴壁后分组处理,每组设6个复孔,分别处理48 h后,行CCK-8检测,在终止培养前2 h向细胞中加入CCK-8试剂(10 μL /孔),于490 nm波长处检测各孔吸光度值,实验重复3次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期 将对数期的hPDLSCs分组处理48 h,分别收集各组细胞,加入适量预冷的70%乙醇,在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定过夜,以PBS洗去乙醇,再加入PI染色液4 $^{\circ}\text{C}$ 染色30 min, PBS洗去染液,使用流式细胞仪进行检测,分析细胞周期分布情况,实验重复3次。

1.2.6 ALP活性检测 将hPDLSCs细胞(1×10^4 个/mL)以每孔200 μL 的体积接种到96孔板中,待细胞生长汇合度达80%左右时按照1.2.1进行分组和处理,并将DMEM培养液更换为成骨诱导液,培养14天后,参照ALP活性检测试剂盒说明书,使用酶联免疫检测仪检测ALP活性,实验重复3次。

1.2.7 qRT-PCR检测基因表达 收集以成骨诱导液培养14天后的各组hPDLSCs,采用Trizol试剂盒提取总RNA,检测RNA的纯度和浓度后进行逆转录合成cDNA,然后行qRT-PCR扩增。采用以下热循环条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性3 min;然后95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸60 s,循环40次。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN基因的相对表达量。以 β -actin为内参。qRT-PCR所需引物如下:PCNA上游引物为5'-CAA GAA GGT GTT GGA GGC A-3',下游引物为5'-TCG CAG CGG TAG GTG TC-3';Cyclin D1上游引物为5'-GCG AGG AAC AGA

AGT GC-3',下游引物为5'-GAG TTG TCG GTG TAG ATG C-3';OCN上游引物为5'-TCA CAC TCC TCG CCC TAT T-3',下游引物为5'-GAT GAG GTC AGC CAA CTC G-3';POSTN上游引物为5'-TGT TGC CCT GGT TAT ATG AG-3',下游引物为5'-ACT CGG TGC AAA GTA AGT GA-3';OPN上游引物为5'-ATG ATG GCC GAG GTG ATA GT-3',下游引物为5'-ACC ATT CAA CTC CTC GCT TT-3'; β -actin上游引物为5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3',下游引物为5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'。

1.2.8 Western blot检测蛋白表达情况 提取以成骨诱导液培养14天后的各组hPDLSCs总蛋白,BCA法定量蛋白浓度后用SDS-PAGE分离等量蛋白并转膜。将膜于室温下封闭2 h后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下与一抗(PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN、PI3K、AKT、p-PI3K和p-AKT,1:1 000稀释)孵育过夜,再用二抗(1:3 000)室温下孵育膜2 h,电化学发光液显影,用ImageJ软件对条带进行灰度值分析,GAPDH为内参。

1.3 统计学分析

SPSS 21.0软件用于统计分析,计量数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,单因素方差分析和SNK- q 检验用于两组以上的比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

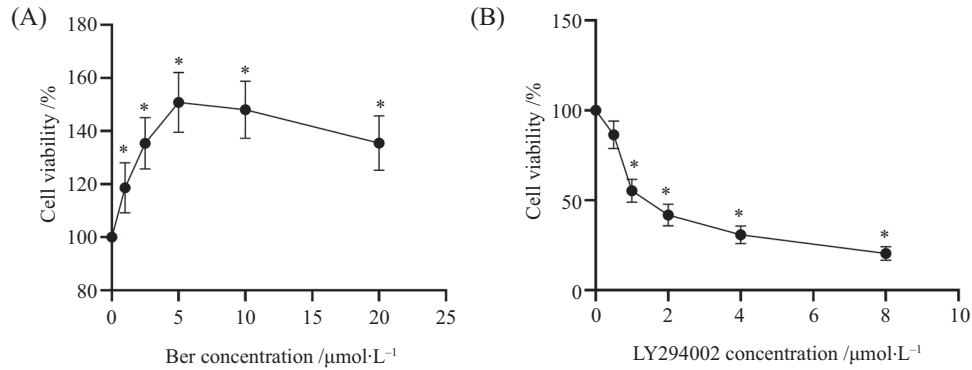
2 结果

2.1 Ber和LY294002对hPDLSCs细胞活力的影响

1、2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ Ber处理组hPDLSCs细胞活力与0 $\mu\text{mol/L}$ Ber组相比均显著升高($P<0.05$),其中5 $\mu\text{mol/L}$ Ber处理组hPDLSCs细胞活力最高(图1A),因此选择5 $\mu\text{mol/L}$ Ber进行后续实验。与0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002相比,0.5、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ LY294002处理组hPDLSCs细胞活力显著降低($P<0.05$),其中1 $\mu\text{mol/L}$ LY294002处理组hPDLSCs细胞活力接近50%(图1B),因此选择1 $\mu\text{mol/L}$ LY294002进行后续实验。

2.2 LY294002对hPDLSCs增殖和成骨分化的影响

LY组hPDLSCs增殖活力、ALP活性、S期和G₂/M期细胞比例显著低于Con组($P<0.05$);LY组G₀/G₁期细胞比例显著高于Con组($P<0.05$);LY组hPDLSCs中PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN的mRNA和蛋白水平以及p-PI3K和p-AKT蛋白

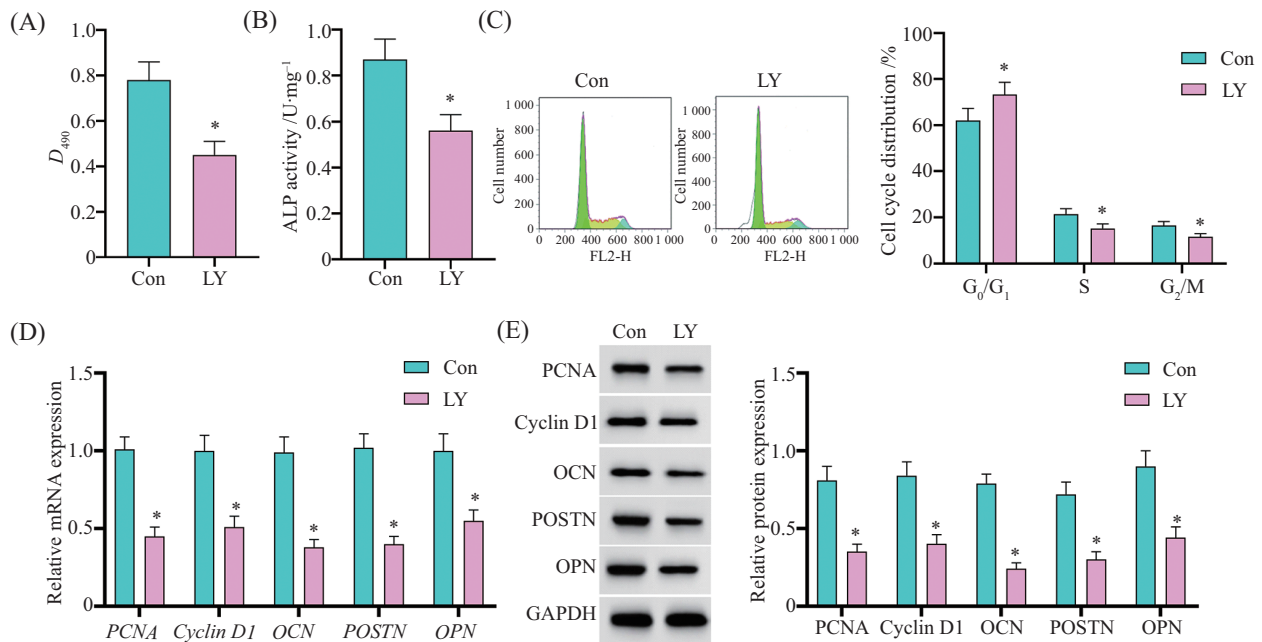


A: Ber对hPDLSCs细胞活力的影响; B: LY294002对hPDLSCs细胞活力的影响。* $P < 0.05$, 与0 μmol/L Ber或0 μmol/L LY294002相比。

A: the effect of Ber on the viability of hPDLSCs cells; B: the effect of LY294002 on the viability of hPDLSCs. * $P < 0.05$ compared with 0 μmol/L Ber or 0 μmol/L LY294002.

图1 Ber和LY294002对hPDLSCs细胞活力的影响

Fig.1 Effects of Ber and LY294002 on hPDLSCs cell viability



A: 两组hPDLSCs增殖活力比较; B: 两组hPDLSCs中ALP活性比较; C: LY294002对hPDLSCs周期分布的影响(流式细胞术); D: 两组hPDLSCs中PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN mRNA水平比较; E: 两组hPDLSCs中PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN蛋白表达比较。* $P < 0.05$, 与Con组相比。

A: comparison of proliferative activity of hPDLSCs between the two groups; B: comparison of ALP activity in hPDLSCs between the two groups; C: the effect of LY294002 on the cycle distribution of hPDLSCs (flow cytometry); D: comparison of mRNA levels of PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN and OPN in hPDLSCs of the two groups; E: comparison of protein expressions of PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN and OPN in hPDLSCs of the two groups. * $P < 0.05$ compared with Con group.

图2 LY294002对hPDLSCs增殖活力、ALP活性、细胞周期分布的影响

Fig.2 Effects of LY294002 on proliferative activity, ALP activity, cell cycle distribution of hPDLSCs

水平显著低于Con组($P < 0.05$)(图2和图3)。

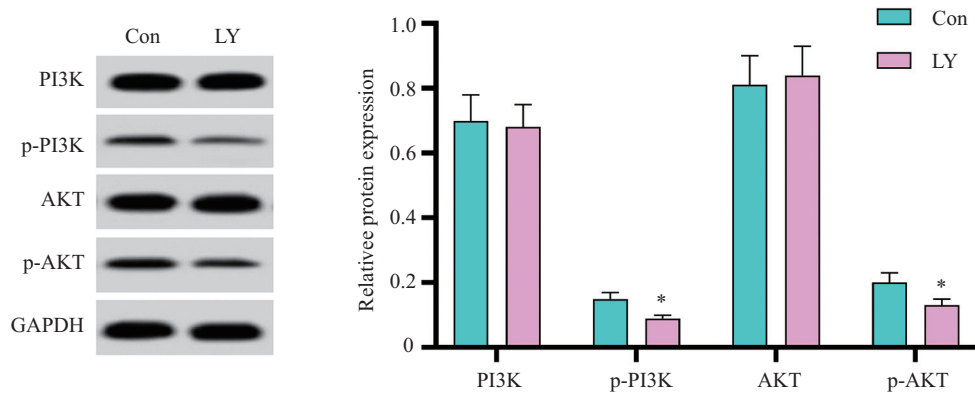
2.3 Ber对hPDLSCs增殖的影响

Ber组hPDLSCs增殖活力、S期和G₂/M期细胞比例显著高于Con组($P < 0.05$), G₀/G₁期细胞比例显著低于Con组($P < 0.05$); Ber+LY组hPDLSCs增殖活力、S期和G₂/M期细胞比例显著低于Ber组($P < 0.05$), G₀/G₁

期细胞比例显著高于Ber组($P < 0.05$)(图4)。

2.4 Ber对hPDLSCs中ALP活性以及PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN基因和蛋白表达的影响

Ber组ALP活性以及PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN的mRNA和蛋白表达量显著高于Con

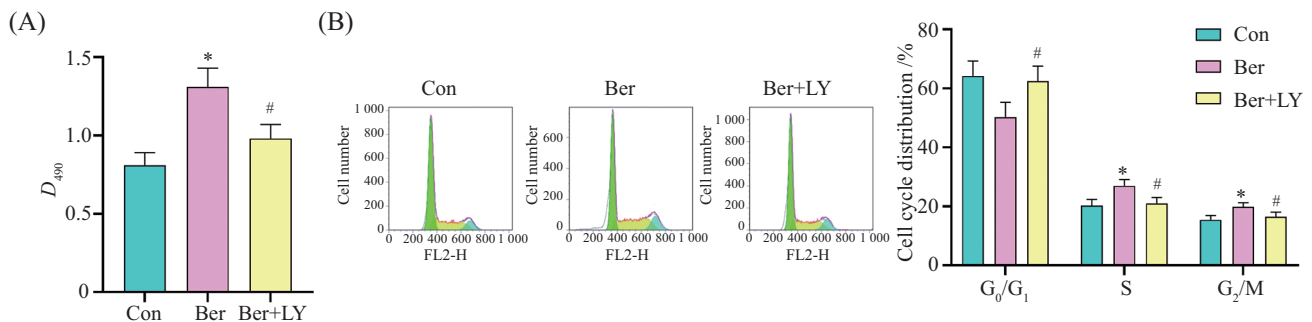


* $P < 0.05$, 与Con组相比。

* $P < 0.05$ compared with Con group.

图3 LY294002对hPDLSCs中PI3K、AKT、p-PI3K和p-AKT蛋白水平的影响

Fig.3 Effects of LY294002 on the levels of PI3K, AKT, p-PI3K and p-AKT in hPDLSCs



A: 各组hPDLSCs的增殖活力比较; B: 各组hPDLSCs周期分布(流式细胞术)比较。* $P < 0.05$, 与Con组相比; # $P < 0.05$, 与Ber组相比。

A: comparison of proliferative activity of hPDLSCs in each group; B: comparison of hPDLSCs cycle distribution (flow cytometry) in each group.

* $P < 0.05$ compared with Con group; # $P < 0.05$ compared with Ber group.

图4 Ber对hPDLSCs增殖的影响

Fig.4 Effect of Ber on the proliferation of hPDLSCs

组($P < 0.05$); Ber+LY组中ALP活性以及PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN的mRNA和蛋白表达量显著低于Ber组($P < 0.05$)(图5)。

2.5 Ber对hPDLSCs中PI3K/AKT信号通路相关蛋白表达的影响

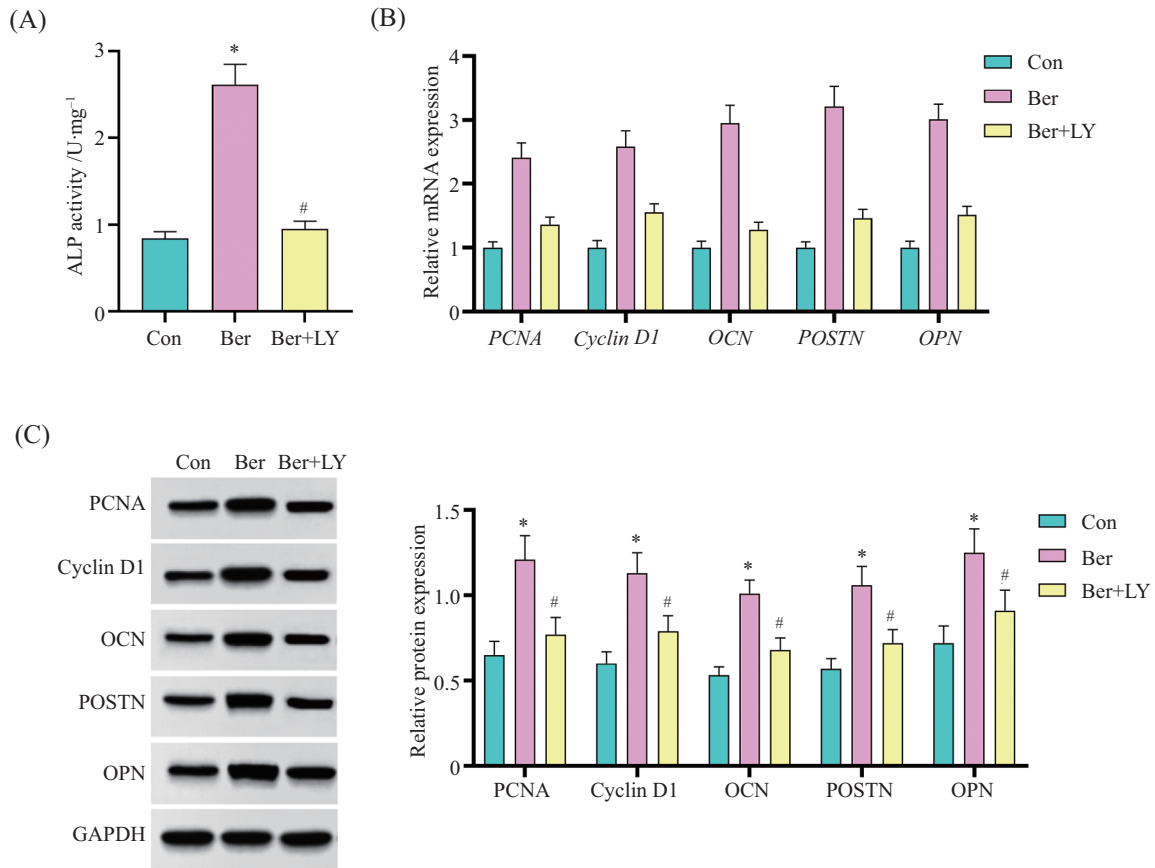
Ber组hPDLSCs中p-PI3K和p-AKT的表达水平显著高于Con组($P < 0.05$); Ber+LY组hPDLSCs中p-PI3K和p-AKT的表达水平显著低于Ber组($P < 0.05$); 各组hPDLSCs中PI3K和AKT的表达水平差异不显著($P > 0.05$)(图6)。

3 讨论

牙周病不仅严重影响口腔健康,而且与糖尿病、呼吸系统疾病和动脉粥样硬化性心血管疾病密切相关,严重影响患者的健康^[14-15]。中药与干细胞再生的结合是治疗牙周病的一种有前途的方法^[16]。从牙周

膜中分离的hPDLSCs具有自我更新和多向分化能力,能够再生牙周组织并维持牙周膜的完整性^[17]。因此,hPDLSCs被认为是牙周组织再生的可靠种子细胞。

小檗碱是一种季铵生物碱,有研究显示,小檗碱可增加骨密度,抑制破骨细胞活性,起到骨骼保护作用^[18]。本研究探讨了小檗碱对hPDLSCs增殖和成骨分化的影响。前期预实验采用不同浓度的小檗碱干预hPDLSCs,筛选出5 $\mu\text{mol/L}$ 为小檗碱的最适作用浓度。本实验采用5 $\mu\text{mol/L}$ 的小檗碱处理hPDLSCs,结果显示小檗碱处理后hPDLSCs增殖活力升高,且S期和G₂/M期细胞比例升高。细胞分化和细胞周期进程有关^[19]。前体细胞在获得完全分化状态之前继续分裂,而其终末分化通常与增殖停滞和永久性细胞周期退出有关,这在骨髓细胞和骨髓脂肪细胞中得到证实^[20]。另一项研究还观察到干细胞的增殖和分化同时增加^[21]。这表明细胞周期在分化

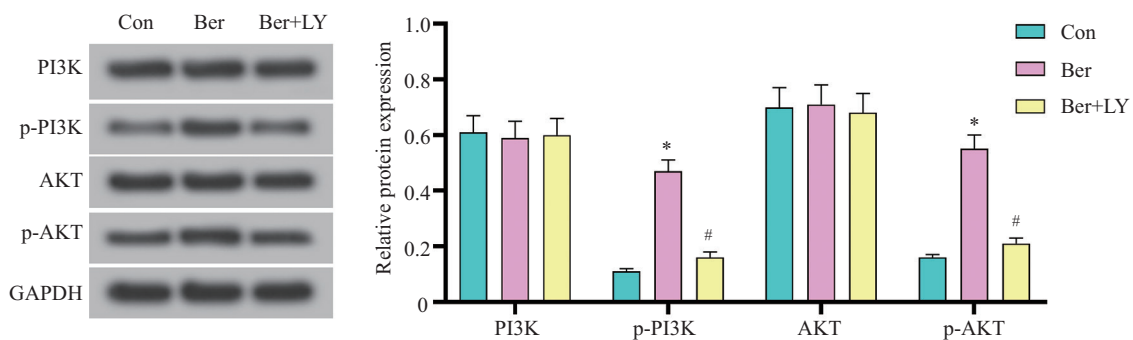


A: 各组hPDLSCs中ALP活性比较; B: 各组hPDLSCs中PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN mRNA水平比较; C: 各组hPDLSCs中PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN和OPN蛋白表达比较。**P*<0.05, 与Con组相比; #*P*<0.05, 与Ber组相比。

A: comparison of ALP activity in hPDLSCs of each group; B: comparison of mRNA levels of PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN and OPN in hPDLSCs of each group; C: comparison of protein expression of PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN and OPN in hPDLSCs of each group. **P*<0.05 compared with Con group; #*P*<0.05 compared with Ber group.

图5 Ber对hPDLSCs中ALP活性以及PCNA、Cyclin D1、OCN、POSTN、OPN基因和蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of Ber on ALP activity, and PCNA, Cyclin D1, OCN, POSTN, OPN gene and protein expression in hPDLSCs



**P*<0.05, 与Con组相比; #*P*<0.05, 与Ber组相比。

**P*<0.05 compared with Con group; #*P*<0.05 compared with Ber group.

图6 Ber对hPDLSCs中PI3K、AKT、p-PI3K和p-AKT蛋白表达的影响

Fig.6 The effects of Ber on the expression of PI3K, AKT, p-PI3K and p-AKT in hPDLSCs

过程中发生变化。Cyclin D1是细胞分化的重要调节剂^[22]。本研究检测到细胞周期和Cyclin D1表达变化可能参与了小檗碱介导的hPDLSCs成骨分化。细胞

分化是由细胞骨架的动力学决定的细胞形状的显著变化, 调节细胞骨架也会影响细胞的分化^[23-24]。本研究结果发现, 小檗碱处理的hPDLSCs中成骨细胞

相关的OCN、POSTN和OPN的基因和蛋白表达水平上调,表明小檗碱能够促进hPDLSCs的成骨分化。以上研究提示小檗碱对牙周组织再生可能起重要作用。

干细胞的多向分化潜能可以通过不同的信号转导途径(包括PI3K/AKT信号转导途径)进行调节。据报道,姜黄素可通过激活PI3K/AKT信号通路,促进hPDLSCs的成骨分化^[4];芦丁通过G蛋白偶联受体30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)介导的PI3K/AKT信号转导促进了hPDLSCs的增殖和成骨分化^[5]。以上研究表明,PI3K/AKT信号通路的活化在hPDLSCs的成骨分化中起重要的调节作用。LY294002是一种有效的PI3K/AKT抑制剂,可阻断PI3K/AKT信号通路的激活,抑制hPDLSCs的成骨分化^[4]。本实验发现,LY294002处理后,hPDLSCs的增殖和成骨分化能力以及p-PI3K和p-AKT水平均降低,这与以往的研究结果一致,表明LY294002可抑制hPDLSCs的增殖和成骨分化。小檗碱处理的hPDLSCs中PI3K和AKT磷酸化水平显著升高,提示小檗碱可能通过激活PI3K/AKT信号通路促进hPDLSCs的成骨分化。为了进一步验证PI3K/AKT途径是否参与调控hPDLSCs的成骨潜能,本研究在小檗碱处理的基础上使用了LY294002进行干预。结果显示,LY294002能够逆转小檗碱对PI3K/AKT信号通路的激活,阻碍小檗碱的促hPDLSCs增殖和成骨分化作用。以上结果提示,小檗碱可能通过激活PI3K/AKT信号通路对hPDLSCs的增殖和成骨分化发挥促进作用。

总之,小檗碱促进了hPDLSCs的增殖和成骨分化,其作用机制与激活PI3K/AKT信号通路有关。然而,本实验未进行进一步的体内研究,后续实验将对此进行补充。此外,小檗碱能否通过其他信号通路影响hPDLSCs的增殖和成骨分化仍有待进一步分析。

参考文献 (References)

- [1] HAN N, LI X, DU J, et al. The impacts of oral and gut microbiota on alveolar bone loss in periodontitis [J]. *J Periodontol Res*, 2023, 58(6): 1139-47.
- [2] NASIRI K, MASOUMI S M, AMINI S, et al. Recent advances in metal nanoparticles to treat periodontitis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1): 283.
- [3] 李慧, 孙卫国. 脂联素调控SDF-1 α /CXCR4信号轴在炎症微环境下牙周膜干细胞成骨分化中的作用[J]. *解剖学研究* (LI H, SUN W G. The role of adiponectin in regulating SDF-1 α /CXCR4 signaling axis in osteogenic differentiation of periodontal stem cells in inflammatory microenvironment [J]. *Anatomical Study*), 2023, 45(1): 15-20.
- [4] XIONG Y, ZHAO B, ZHANG W, et al. Curcumin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the PI3K/AKT/Nrf2 signaling pathway [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(7): 954-60.
- [5] ZHAO B, XIONG Y, ZHANG Y, et al. Rutin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the GPR30-mediated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Exp Biol Med*, 2020, 245(6): 552-61.
- [6] OCH A, OCH M, NOWAK R, et al. Berberine, a herbal metabolite in the metabolic syndrome: the risk factors, course, and consequences of the disease [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1351.
- [7] LU Q, FU Y, LI H. Berberine and its derivatives represent as the promising therapeutic agents for inflammatory disorders [J]. *Pharmacol Rep*, 2022, 74(2): 297-309.
- [8] 赵西子, 李文芳, 邢彦超, 等. 小檗碱体内药代动力学及药理学研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报* (ZHAO X Z, LI W F, XING Y C, et al. Research progress on pharmacokinetics and pharmacological activity of berberine *in vivo* [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*), 2020, 22(10): 86-90.
- [9] CUI Y, XIE J, FU Y, et al. Berberine mediates root remodeling in an immature tooth with apical periodontitis by regulating stem cells from apical papilla differentiation [J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12(1): 18.
- [10] WANG C, LIUC, LIANG C, et al. Role of berberine thermosensitive hydrogel in periodontitis via PI3K/AKT pathway *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6364.
- [11] ZHANG L N, WANG X X, WANG Z, et al. Berberine improves advanced glycation end products-induced osteogenic differentiation responses in human periodontal ligament stem cells through the canonical Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(6): 5440-52.
- [12] YU J, DING C, HUA Z, et al. Protective effects of berberine in a rat model of polycystic ovary syndrome mediated via the PI3K/AKT pathway [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2021, 47(5): 1789-803.
- [13] ZHANG J, SONG J, LI H, et al. Berberine protects against neomycin-induced ototoxicity by reducing ROS generation and activating the PI3K/AKT pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2023, 817: 137518.
- [14] HERRERA D, SANZ M, SHAPIRA L, et al. Association between periodontal diseases and cardiovascular diseases, diabetes and respiratory diseases: consensus report of the joint workshop by the European Federation of Periodontology (EFP) and the European arm of the World Organization of Family Doctors (WONCA Europe) [J]. *J Clin Periodontol*, 2023, 50(6): 819-41.
- [15] SUMAYIN NGAMDU K, MALLAWAARACHCHI I, DUNIPACE E A, et al. Association between periodontal disease and cardiovascular disease (from the NHANES) [J]. *Am J Cardiol*, 2022, 178: 163-8.
- [16] YU J, WU X, ZHANG W, et al. Effect of psoralen on the regulation of osteogenic differentiation induced by periodontal stem cell-derived exosomes [J]. *Hum Cell*, 2023, 36(4): 1389-402.
- [17] 冯保静, 赵西博, 张伟祥. miR-150靶向 β -catenin调控人牙周

- 膜干细胞成骨分化能力的机制研究[J]. 中华老年口腔医学杂志(FENG B J, ZHAO X B, ZHANG W X. Mechanism of miR-150-targeted β -catenin regulation on osteogenic differentiation of human periodontal stem cells [J]. Chinese Journal of Geriatric Stomatology, 2023, 21(3): 142-7,162.
- [18] ZHANG Y, MA J, ZHANG W. Berberine for bone regeneration: Therapeutic potential and molecular mechanisms [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 277: 114249.
- [19] WATANABE H, FUKUDA A, IKEDA N, et al. Syndecan-3 regulates the time of transition from cell cycle exit to initial differentiation stage in mouse cerebellar granule cell precursors [J]. Brain Res, 2023, 1807: 148317.
- [20] MANOKAWINCHOKE J, NATTASIT P, THONGNGAM T, et al. Indirect immobilized Jagged1 suppresses cell cycle progression and induces odonto/osteogenic differentiation in human dental pulp cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10124.
- [21] SEO B J, YOON S H, DO J T. Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3893.
- [22] SALEBAN M, HARRIS E L, POULTER J A. D-type cyclins in development and disease [J]. Genes, 2023, 14(7): 1445.
- [23] GUNASEKARAN S, MIYAGAWA Y, MIYAMOTO K. Actin nucleoskeleton in embryonic development and cellular differentiation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2022, 76: 102100.
- [24] NGUYEN MT, LEE W. Kank1 is essential for myogenic differentiation by regulating actin remodeling and cell proliferation in C2C12 progenitor cells [J]. Cells, 2022, 11(13): 2030.