

二甲双胍调节TLR4/NF- κ B信号通路对牙周炎小鼠炎症反应的影响

马宇^{1*} 林建² 杨舒¹ 赵沛¹

(¹昆明市口腔医院正畸科, 昆明 650000; ²昆明医科大学研究生院, 昆明 650000)

摘要 该文旨在探究二甲双胍(MET)调节Toll样受体4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路对牙周炎小鼠炎症反应的影响。构建牙周炎小鼠模型后, 将小鼠分为对照组(Control组), 模型组(Model组), 二甲双胍低、中、高剂量组(MET-L组、MET-M组、MET-H组)和高剂量二甲双胍+TLR4激活剂组(MET-H+LPS组)。用Micro-CT和HE染色对小鼠牙周组织病理情况进行观察; 用qRT-PCR检测牙周组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA表达水平; 免疫组织化学法检测牙周组织核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)表达情况; 免疫印迹检测TLR4/NF- κ B信号通路相关蛋白表达情况。与Control组比较, Model组小鼠牙槽骨有明显吸收, 骨吸收区域较大, 牙周病变较重, 小鼠牙周组织出现大量炎性细胞浸润; IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNA以及TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、RANKL表达水平升高, OPG表达水平下降($P<0.05$)。与Model组比较, MET-L、MET-M、MET-H组牙槽骨吸收逐渐减少, 炎性细胞浸润减少, 牙周病变逐渐缓解; TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA水平呈剂量依赖性降低, TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、RANKL表达水平下降, OPG表达水平上升($P<0.05$)。与MET-H组相比, MET-H+LPS组牙槽骨吸收加重, 骨吸收区域较大, 炎性细胞浸润增加; TNF- α 、IL-6、IL-1 β mRNA以及TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、RANKL表达水平升高, OPG表达水平下降($P<0.05$)。二甲双胍通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路改善牙周炎小鼠炎症反应。

关键词 牙周炎; 二甲双胍; Toll样受体4(TLR4)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路; 炎症反应

Effect of Metformin on Inflammatory Response in Periodontitis Mice by Regulating the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway

MA Yu^{1*}, LIN Jian², YANG Shu¹, ZHAO Pei¹

(¹Department of Orthodontics, Kunming Stomatological Hospital, Kunming 650000, China;

²Graduate School of Kunming Medical University, Kunming 650000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of MET (metformin) on the inflammatory response in periodontitis mice by regulating the TLR4 (Toll-like receptor 4)/NF- κ B (nuclear factor- κ B) signaling pathway. A periodontitis mouse model was constructed and the mice were separated into Control group, Model group, low, medium, and high dose metformin groups (MET-L group, MET-M group, MET-H group), and high-dose metformin+TLR4 activator group (MET-H+LPS group). The pathological changes of periodontal tissue in mice were observed by Micro-CT and HE staining. The mRNA expression levels of IL-1 β (interleukin-1 β), IL-6 (interleukin-6), and TNF- α (tumor necrosis factor- α) in periodontal tissue were detected by qRT-PCR. The expression of RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) and OPG (osteoprotegerin) in periodontal tissue was

收稿日期: 2024-07-12

接受日期: 2024-08-29

*通信作者。Tel: 15812089956, E-mail: aj4535117084d@163.com

Received: July 12, 2024

Accepted: August 29, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-15812089956, E-mail: aj4535117084d@163.com

detected by immunohistochemistry. The expression of TLR4/NF- κ B pathway-associated proteins was detected by Western blot. Compared with the Control group, the alveolar bone of mice in the Model group showed obvious absorption, with a larger bone absorption area, more severe periodontal lesions, and a large amount of inflammatory cell infiltration; the *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* mRNA, and TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B, RANKL expression levels increased, while OPG expression level decreased ($P<0.05$). Compared with the Model group, the MET-L, MET-M, and MET-H groups showed a gradual decrease in alveolar bone resorption, reduced infiltration of inflammatory cells, and gradual relief of periodontal lesions; the *TNF- α* , *IL-6*, and *IL-1 β* mRNA levels gradually decreased in a dose-dependent manner, the TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B, and RANKL expression levels decreased, while the OPG expression level increased ($P<0.05$). Compared with the MET-H group, the MET-H+LPS group showed increased alveolar bone resorption, larger bone resorption areas, and more inflammatory cell infiltration; the *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* mRNA, and TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B, RANKL expression levels increased, while OPG expression level decreased ($P<0.05$). Metformin inhibits the TLR4/NF- κ B signaling pathway and improves the inflammatory response in periodontitis mice.

Keywords periodontitis; metformin; TLR4 (Toll-like receptor 4)/NF- κ B (nuclear factor- κ B) signaling pathway; inflammatory response

牙周炎是一种由细菌驱动的口腔炎症性疾病, 可对公众健康造成威胁^[1]。牙周炎的特征是进行性局部炎症和牙槽骨丢失, 牙齿支撑结构(如牙周韧带、骨骼和牙龈)损伤, 导致咀嚼能力下降或牙齿脱落^[2]。目前, 牙周炎的标准治疗方法包括基础牙周治疗和外科牙周治疗, 以及全身或局部抗生素治疗, 但其治疗效果仍不理想^[3]。二甲双胍(metformin, MET)是一种具有多功能用途的药物, 它是一种口服抗高血糖药物, 是降低2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者血糖水平的首选一线药物。二甲双胍是从法国丁香(*Galega officinalis*)中提取的, 因其良性、无毒的性质而成为控制糖尿病患者高血糖水平的金标准药物^[4]。据报道, 二甲双胍具有降低脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的作用, 还可调控LPS抑制的自噬途径, 下调mTOR的表达, 因此推测二甲双胍可能是治疗牙周炎的潜在药物^[5]。然而二甲双胍对牙周炎小鼠炎症反应的影响尚未明确。TLR家族的Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)可以特异性识别LPS, 参与信号转导和炎症因子释放, 并在LPS诱导的牙周组织破坏中发挥重要作用。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是激活TLR2和TLR4的主要信号通路。激活的NF- κ B信号通路可以进一步促进炎症因子的募集和聚集, 扩大炎症反应。此外, NF- κ B的激活可以促进巨噬细胞M1极化以增强炎症反应, 同时激活TLR4^[6]。研究发现, 大麻二酚(cannabidiol, CBD)通过抑制TLR4/NF- κ B通

路激活, 减轻大鼠结扎诱导的牙周炎和LPS诱导的人牙周韧带细胞(human periodontal ligament cell, hPDLC)炎症^[7]。本研究通过建立牙周炎小鼠模型, 探究二甲双胍能否通过调控TLR4/NF- κ B通路对牙周炎小鼠炎症反应产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料

动物: 6周龄雄性SPF级BALB/C小鼠[许可证号: SCXK(皖)2022-0001], 90只, 体质量30~35 g, 购自安徽医科大学。本研究经昆明市口腔医院伦理审查委员会审批通过(批准号: KHLL2023-KY027)。

主要试剂: 盐酸二甲双胍(货号: YZ-100664)购自中国食品药品检定研究院; TLR4激活剂LPS(货号: 40328ES25)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 兔抗NF- κ B(货号: ab220803)、p-NF- κ B(货号: ab239882)抗体购自Abcam公司; 兔抗TLR4(货号: 48-2300)抗体购自ThermoFisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 造模 对小鼠接种细菌, 构建牙周炎小鼠模型^[8]。小鼠口腔涂抹接种浓度为 10^9 CFU/mL的牙龈卟啉单胞菌(ATCC33277)以及2%羟甲基纤维素, 接种3次, 隔天进行, 5天内完成接种。对照组小鼠接种2%羟甲基纤维素。接种4周后, 于显微镜下观察小鼠牙龈水肿、充血、牙周袋形成和牙周探诊出血等情况, 以确定牙周炎造模是否成功。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
Primers name	Primer sequences (5'→3')
TNF- α	F: TGG GCT CCC TCT CAT CAG TTC R: TCC GCT TGG TGG TTT GCT AC
IL-1 β	F: GTC CAC CAA ATT CAA TAC CG R: TCA GAA TGG CCT CCT GAG GA
IL-6	F: ATT GTA TGA ACA GCG ATG ATG CAC R: CCA GGT AGA AAC GGA ACT CCA G
β -actin	F: ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG R: TTC AGC TCA GGG ATG ACC TT

1.2.2 实验分组 用随机数字表法将小鼠分为对照组(Control组)、模型组(Model组)、药物处理组[包括二甲双胍低(MET-L组)、中(MET-M组)、高剂量组(MET-H组)以及高剂量组+TLR4激活剂组(MET-H+LPS组)], 每组15只。根据参考文献[9], 对MET-L组、MET-M组、MET-H组小鼠分别腹腔注射100、200、400 mg·kg⁻¹·d⁻¹二甲双胍; 对MET-H+LPS组小鼠腹腔注射400 mg·kg⁻¹·d⁻¹二甲双胍及0.58 mg·kg⁻¹·d⁻¹的LPS^[10](药物剂量根据小鼠的体质量换算而得到); Control组与Model组腹腔注射等剂量的生理盐水, 连续注射14天后, 对小鼠实施安乐死。

1.2.3 Micro-CT扫描观察牙周组织变化 对牙小鼠左下颌第二磨牙周围牙龈组织进行钝性分离, 然后对左下颌骨进行Micro-CT扫描, 图像分辨率为1 024像素×1 024像素, 电压为70 kV, 电流为114 μ A。用骨表面图像进行三维组织形态分析, 对牙槽骨图像进行分析。

1.2.4 HE染色观察小鼠牙周组织形态 取其中5只小鼠的牙周组织, 冲洗干净, 用4%甲醛室温固定24 h, 制为石蜡切片。将制备好的小鼠牙周组织石蜡切片用二甲苯浸泡脱蜡2次, 每次10 min, 95%、85%、75%梯度乙醇浸泡水化3次, 每次30 s, 自来水冲洗, 加苏木精室温染色10 min, 加伊红染色30 s, 漂洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜观察。

1.2.5 qRT-PCR检测基因表达情况 提取各组5只小鼠的牙周组织RNA, 将其逆转录为cDNA, 荧光定量PCR法检测小鼠牙周组织中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA的表达水平。以 β -actin为内参, 反应程序: 95 °C预变性10 min; 95 °C变性10 s, 55 °C退火

35 s, 72 °C延伸60 s, 40个循环。用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算IL-6、IL-1 β 、TNF- α mRNA的表达水平。引物序列见表1。

1.2.6 免疫组织化学法检测RANKL、OPG表达情况 对小鼠牙周组织切片进行脱蜡水化, 加柠檬酸钠修复, 加H₂O₂室温处理10 min以除去过氧化酶活性, PBS清洗2次, 加封闭液室温封闭孵育30 min, 加入核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)(1:1 000)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)(1:1 000)一抗于4 °C过夜孵育, 清洗, 加入羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育1 h。DAB显色, 苏木精室温复染5 min, 自来水冲洗返蓝, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片, 显微镜观察, 检测RANKL、OPG的吸光度(D)值。

1.2.7 Western blot检测蛋白表达情况 提取每组5只小鼠的牙周组织蛋白, 测定其浓度。取蛋白上样, 进行SDS-PAGE电泳分离蛋白, 将其转移至PVDF膜上, 脱脂牛奶室温封闭2 h, TBST洗膜。加TLR4(1:200)、NF- κ B(1:1 000)、p-NF- κ B(1:1 000)一抗, 4 °C下过夜孵育, 加二抗(1:2 000), 室温孵育2 h。ECL发光显影, β -actin作内参, 分析TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B蛋白表达量。

1.3 统计学分析

用SPSS 25.0软件分析数据, 用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示符合正态分布的实验数据, 单因素方差分析用于比较多组间差异, SNK-*q*检验用于比较两组间差异。*P*<0.05表示差异显著。

2 结果

2.1 小鼠Micro-CT检测

与Control组相比, Model组小鼠牙槽骨出现明显吸收, 骨吸收区域较大; 与Model组比较, MET-L、

MET-M、MET-H组小鼠随着药物剂量升高, 骨吸收区域逐渐减少; 与MET-H组相比, MET-H+LPS组小鼠牙槽骨吸收增多, 骨吸收区域较大(图1)。

2.2 HE染色观察小鼠牙周组织病理形态

与Control组相比, Model组小鼠牙槽骨有明显吸收, 牙周软组织退缩, 牙周病变较重, 炎性细胞浸润增加; 与Model组比较, MET-L、MET-M、MET-H组小鼠牙槽骨吸收逐渐减少, 炎性细胞浸润减少, 牙周病变逐渐缓解; 与MET-H组相比, MET-H+LPS组小鼠牙槽骨吸收加重, 炎性细胞浸润增加(图2)。

2.3 二甲双胍对牙周组织中*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*表达量的影响

与Control组比较, Model组小鼠牙周组织中*IL-6*、*TNF- α* 、*IL-1 β* mRNA表达水平上升($P<0.05$);

与Model组比较, MET-L、MET-M、MET-H组小鼠牙周组织中*IL-6*、*TNF- α* 、*IL-1 β* mRNA表达水平逐渐下降($P<0.05$); 与MET-H组相比, MET-H+LPS组小鼠牙周组织中*IL-6*、*TNF- α* 、*IL-1 β* mRNA表达水平上升($P<0.05$)(图3)。

2.4 二甲双胍对牙周组织中RANKL、OPG蛋白表达的影响

与Control组相比, Model组小鼠牙周组织中OPG表达水平下降, RANKL表达水平上升($P<0.05$); 与Model组比较, MET-L、MET-M、MET-H组小鼠牙周组织中OPG表达水平上升, RANKL表达水平呈剂量依赖性降低($P<0.05$); 与MET-H组相比, MET-H+LPS组小鼠牙周组织中OPG表达水平下降, RANKL表达水平升高($P<0.05$)(图4和图5)。

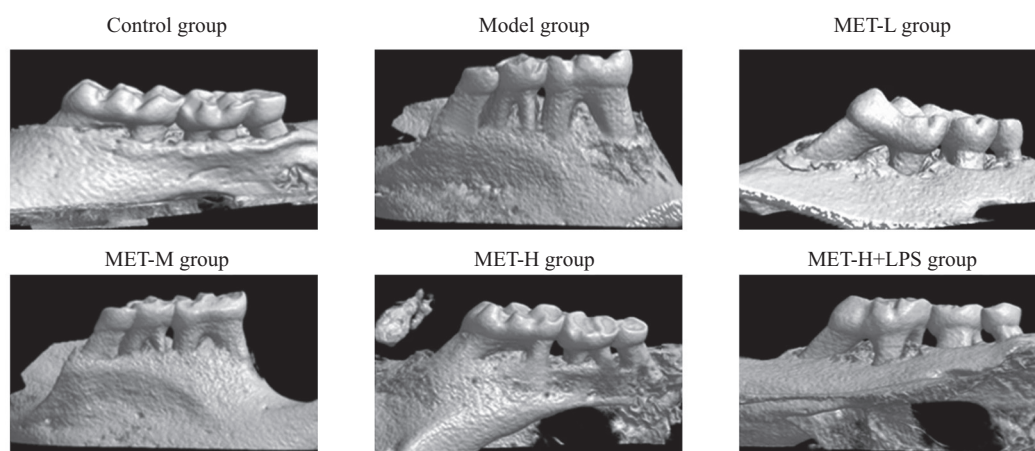


图1 牙周组织Micro-CT检测

Fig.1 Micro-CT detection of periodontal tissue

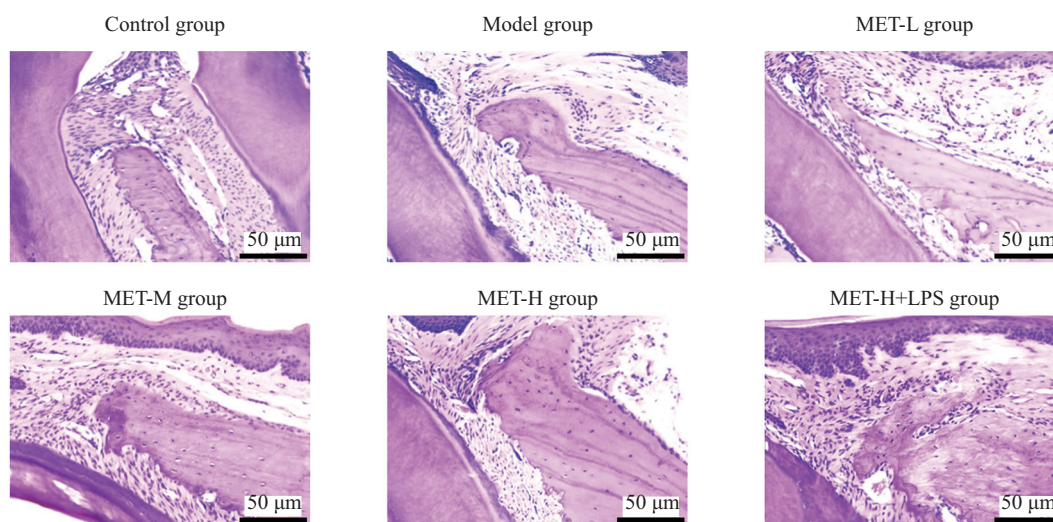
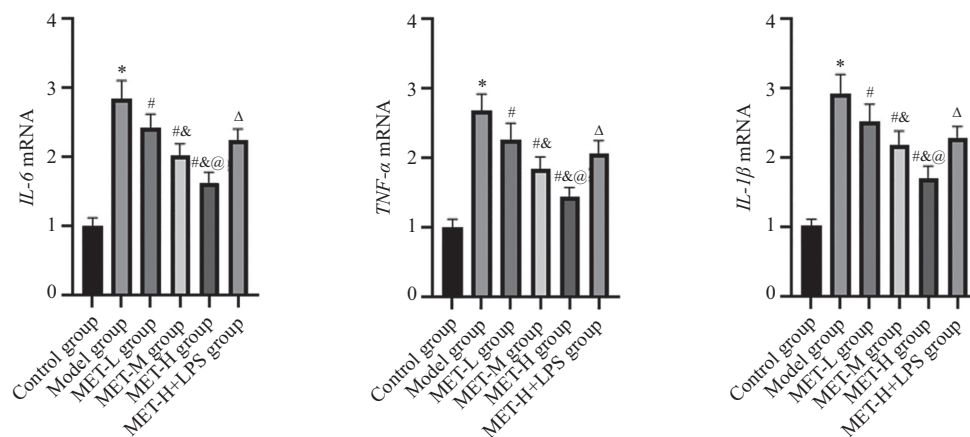


图2 牙周组织HE染色

Fig.2 HE staining of periodontal tissue



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与Model组比较; & $P < 0.05$, 与MET-L组比较; @ $P < 0.05$, 与MET-M组比较; Δ $P < 0.05$, 与MET-H组比较。

* $P < 0.05$ compared with Control group; # $P < 0.05$ compared with Model group; & $P < 0.05$ compared with MET-L group; @ $P < 0.05$ compared with MET-M group; Δ $P < 0.05$ compared with MET-H group.

图3 二甲双胍对TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA表达的影响

Fig.3 Effects of metformin on the expression of TNF-α, IL-1β and IL-6 mRNA

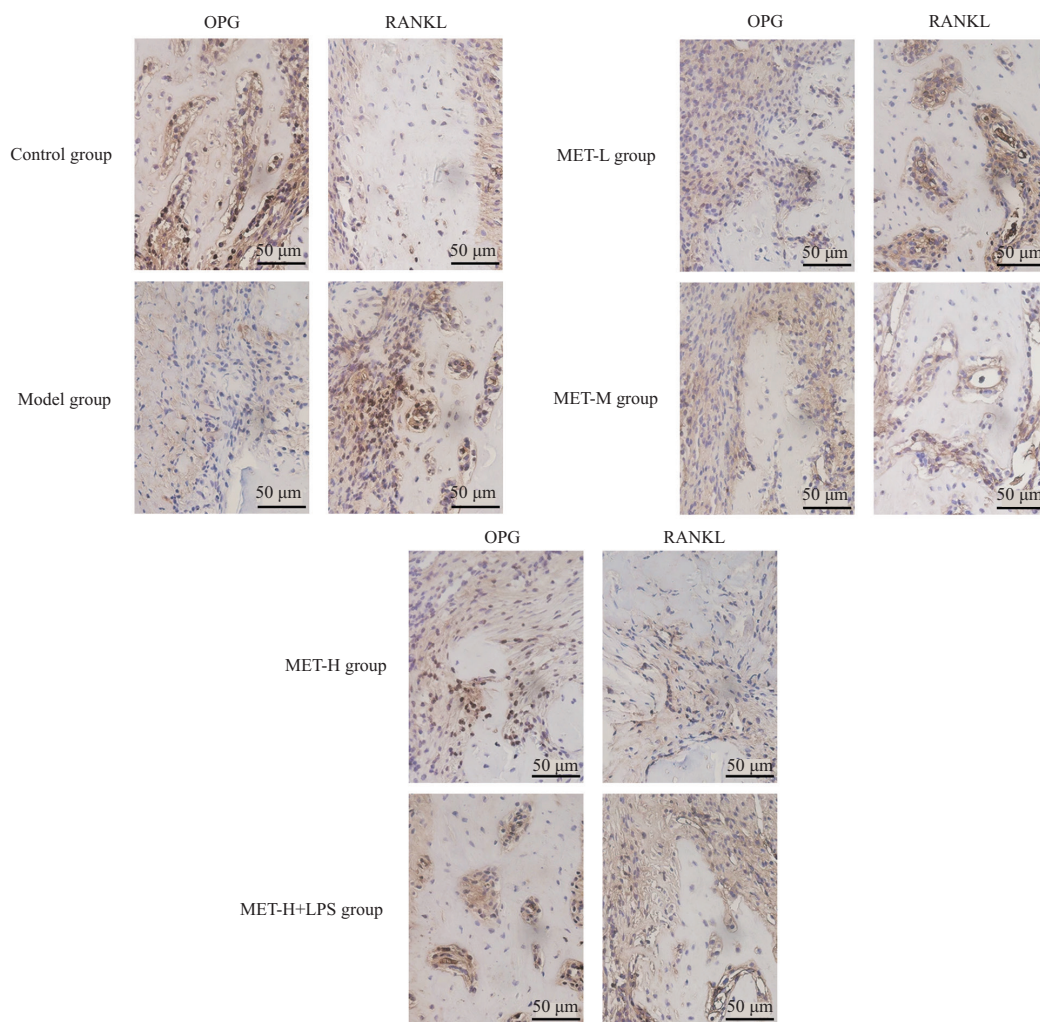
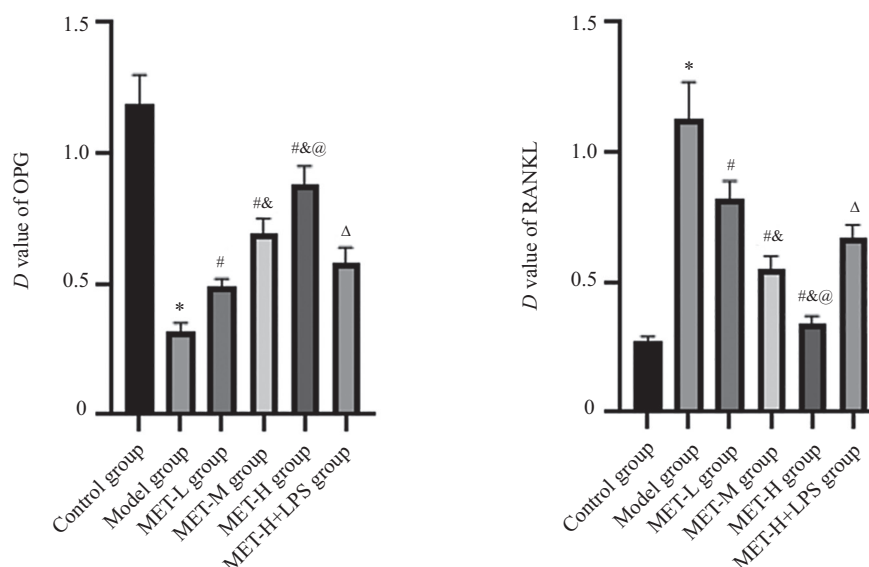


图4 免疫组化检测RANKL、OPG蛋白表达情况

Fig 4 Immunohistochemical detection of RANKL and OPG protein expression

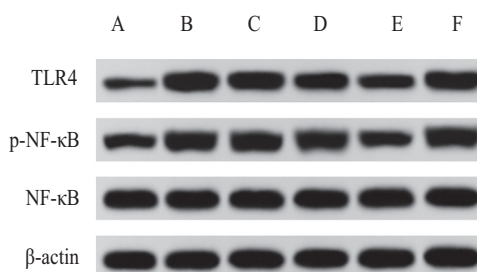


* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与Model组比较; & $P < 0.05$, 与MET-L组比较; @ $P < 0.05$, 与MET-M组比较; $\Delta P < 0.05$, 与MET-H组比较。

* $P < 0.05$ compared with the Control group; # $P < 0.05$ compared with the Model group; & $P < 0.05$ compared with MET-L group; @ $P < 0.05$ compared with MET-M group; $\Delta P < 0.05$ compared with MET-H group.

图5 二甲双胍对RANKL、OPG蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of metformin on RANKL and OPG protein expression



A: Control组; B: Model组; C: MET-L组; D: MET-M组; E: MET-H组; F: MET-H+LPS组。

A: Control group; B: Model group; C: MET-L group; D: MET-M group; E: MET-H group; F: MET-H+LPS group.

图6 Western blot检测TLR4、p-NF- κ B、NF- κ B蛋白表达情况

Fig.6 The expression of TLR4, p-NF- κ B and NF- κ B proteins was detected by Western blot

2.5 二甲双胍对TLR4/NF- κ B信号通路的影响

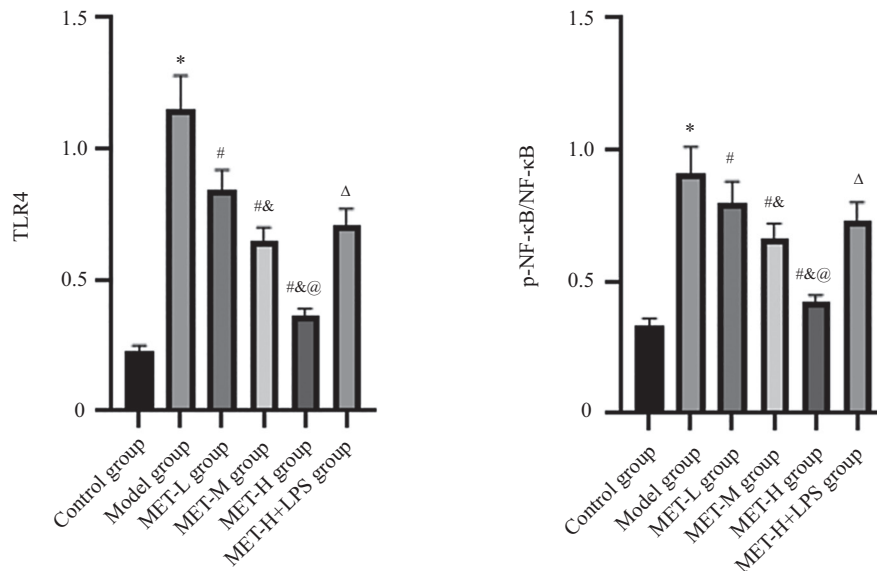
与Control组相比, Model组小鼠牙周组织中TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B表达水平升高($P < 0.05$); 与Model组比较, MET-L、MET-M、MET-H组小鼠牙周组织中TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B表达水平逐渐下降, 且呈剂量依赖性($P < 0.05$); 与MET-H组相比, MET-H+LPS组小鼠牙周组织中TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B表达水平升高($P < 0.05$)(图6和图7)。

3 讨论

牙周炎是一种由牙周组织中的细菌生物膜引起的炎症性疾病, 常见于成人, 但也可见于儿童和青少年。据报道, 全球10%~15%的人可能患有严重的

牙周炎。牙周炎相关细菌会导致牙周组织的局部破坏, 会破坏牙龈和牙槽骨, 导致牙齿脱落, 并对其他疾病的发生产生负面影响^[11-12]。牙周炎可导致先天免疫通路的激活, 导致促炎细胞因子和相关信号分子的产生^[13]。因此, 探讨牙周炎的病因及其治疗策略非常重要。

二甲双胍是一种小分子化合物。其作用和机制已被广泛研究; 然而, 二甲双胍的治疗作用仍在被不断研究。研究表明, 二甲双胍具有保护心血管系统、减轻衰老、改善血脂、促进成骨和硬组织再生的潜力^[14]。除了降血糖作用外, 二甲双胍还具有抗炎活性。外用二甲双胍是牙周治疗的潜在辅助药物。研究证实, 二甲双胍减轻了骨吸收, 减少了根尖周炎大



* $P < 0.05$, 与Control组比较; # $P < 0.05$, 与Model组比较; & $P < 0.05$, 与MET-L组比较; @ $P < 0.05$, 与MET-M组比较; Δ $P < 0.05$, 与MET-H组比较。

* $P < 0.05$ compared with the Control group; # $P < 0.05$ compared with the Model group; & $P < 0.05$ compared with MET-L group; @ $P < 0.05$ compared with MET-M group; Δ $P < 0.05$ compared with MET-H group.

图7 二甲双胍对TLR4/NF-κB信号通路的影响

Fig.7 Effects of metformin on TLR4/NF-κB signaling pathway

鼠的骨质流失,二甲双胍可能是治疗炎症性骨病的有效药物^[15]。本研究通过构建牙周炎小鼠模型,发现模型组小鼠的牙槽骨出现明显吸收且吸收区域较大,并且小鼠牙周炎病变加重,炎性细胞浸润增加;小鼠牙周组织中*IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α*、*RANKL*表达水平显著升高,*OPG*表达水平下降,说明牙周炎小鼠牙槽骨吸收较多,并出现炎症反应。用剂量不同的二甲双胍对牙周炎小鼠进行处理,发现小鼠牙周病变缓解,牙槽骨吸收减少,炎性细胞浸润减少,病情出现好转,同时牙周组织中*IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α*、*RANKL*表达水平呈药物剂量依赖性下降,*OPG*表达水平升高,说明二甲双胍能够抑制牙周炎小鼠炎症反应,抑制破骨细胞增殖,抑制牙槽骨吸收,缓解牙周病变,发挥抗炎作用。ALA等^[16]研究报道,二甲双胍通过抑制AMPK和NF-κB表达,进而抑制炎症反应,二甲双胍能够维持巨噬细胞的M1和M2亚型间的平衡。巨噬细胞极化的转变减少了炎症细胞因子(如*TNF-α*、*IL-1β*和*IL-6*)的释放,并增强了抗炎反应。因此推测二甲双胍可能通过维持巨噬细胞M1和M2之间的平衡及巨噬细胞极化抑制炎症细胞因子的释放,从而表现出抗炎作用。TAN等^[17]研究证明,二甲双胍显著抑制了hPDLC中牙龈卟啉单胞菌脂多糖诱导的炎症反应,表现为*IL-1β*和*IL-18*分泌减少。这

与本研究结果较为一致。研究发现,通过进行二甲双胍治疗改变了300多个基因的表达,这些基因涉及NF-κB通路和*TNF-α*通路等14个信号通路^[18]。这说明二甲双胍可能调节炎症相关通路中的炎症基因表达,从而发挥抗炎作用。

TLR是先天免疫和适应性免疫的关键介质,在促炎因子的刺激下被激活参与炎症反应。NF-κB是一种多向核转录因子,在细胞质中普遍存在。被TLR激活后,NF-κB易位至细胞核,并诱导一系列基因的表达,这些基因介导先天性和获得性免疫调节、细胞黏附、炎症反应。NF-κB激活*TNF-α*、*IFN-γ*、*IL-22*、*IL-4*、*IL-1β*和其他细胞因子,所有这些细胞因子都在炎症反应中发挥关键作用^[19]。研究发现,抑制TLR4/NF-κB通路能够减缓牙周炎进展,抑制炎症反应,例如丹参酸C(salvianic acid C, SAC)通过TLR4/NF-κB通路有效减轻LPS诱导的炎症和细胞凋亡,SAC可有效治疗牙周炎^[20]。LIU等^[21]研究发现,敲低*TRIM52*通过TLR4/NF-κB信号通路减轻了LPS诱导的炎症损伤,为牙周炎提供了有效的治疗靶点。KIM等^[22]研究证实,马曲普酶的下调通过抑制人牙龈成纤维细胞中的TLR4/NF-κB信号通路来抑制牙龈卟啉单胞菌脂多糖诱导的基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)和促炎

细胞因子表达。本研究通过分析发现在牙周炎小鼠中TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B上调表达,经二甲双胍处理后,TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B表达水平逐渐降低,说明二甲双胍能够抑制TLR4/NF- κ B通路从而抑制炎症反应。在此基础上,进行回复实验,使用TLR4激活剂LPS和二甲双胍共同处理牙周炎小鼠,发现上述实验结果发生了逆转,证实二甲双胍可能抑制TLR4/NF- κ B信号通路从而抑制牙周炎小鼠的炎症反应。

综上,二甲双胍抑制牙周炎小鼠的炎症反应,可能是通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路实现的,本研究初步为揭示二甲双胍在牙周炎中的治疗作用提供了理论参考。然而牙周炎的病理机制较为复杂,本研究中没有另外设置单独的LPS组,并且对于二甲双胍调控TLR4/NF- κ B信号通路的分子机制研究尚浅,二甲双胍能否通过其他通路发挥作用尚未可知,有待进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] CHEN X, WAN Z, YANG L, et al. Exosomes derived from reparative M2-like macrophages prevent bone loss in murine periodontitis models via *IL-10* mRNA [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 110.
- [2] SUN X, SUN Y, CAO S, et al. Effects of *N*-acetyl-*L*-cysteine polysulfides on periodontitis in a mouse model [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(8): e959.
- [3] KITAKA M, YOSHIMOTO T, LEVITAN M E, et al. Osteocyte RANKL drives bone resorption in mouse ligature-induced periodontitis [J]. *J Bone Miner Res*, 2023, 38(10): 1521-40.
- [4] HAMMAD UDDIN M K, KHAN SADIQ M S, AHMED A, et al. Applications of metformin in dentistry: a review [J]. *J Taibah Univ Med Sci*, 2023, 18(6): 1299-310.
- [5] SUN B, YING S, MA Q, et al. Metformin ameliorates HMGB1-mediated oxidative stress through mTOR pathway in experimental periodontitis [J]. *Genes Dis*, 2021, 10(2): 542-53.
- [6] CUI S, ZHANG Z, CHENG C, et al. Small extracellular vesicles from periodontal ligament stem cells primed by lipopolysaccharide regulate macrophage M1 polarization via miR-433-3p targeting TLR2/TLR4/NF- κ B [J]. *Inflammation*, 2023, 46(5): 1849-58.
- [7] CHEN H, LIU Y Q, YU S J, et al. Cannabidiol attenuates periodontal inflammation through inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *J Periodontal Res*, 2023, 58(4): 697-707.
- [8] 李昊, 叶枝茂, 罗谔财, 等. 增强miR-185-5p表达可减轻小鼠实验性牙周炎的炎症反应[J]. 中国组织工程研究(LI H, YE Z M, LUO Y C, et al. Enhancing the expression of miR-185-5p can reduce the inflammatory response of experimental periodontitis in mice [J]. *Tissue Engineering Research in China*), 2023, 27(35): 5676-80.
- [9] 田勇, 周颖, 古雍翔, 等. 二甲双胍预处理诱导心脏自噬减轻脓毒症小鼠的心肌损伤[J]. 中国组织工程研究(TIAN Y, ZHOU Y, GU Y X, et al. Metformin pretreatment induces cardiac autophagy to reduce myocardial injury in septic mice [J]. *Tissue Engineering Research in China*), 2024, 28(28): 4469-76.
- [10] 张晶, 贾翠楠, 何冰, 等. 金丝桃苷抑制Toll样受体4/髓样分化因子88/核因子- κ B信号通路减轻牙周炎大鼠牙周组织损伤实验研究[J]. 陕西医学杂志(ZHANG J, JIA C N, HE B, et al. Hyperoside inhibits Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor- κ B signaling pathway to reduce periodontal tissue damage in rats with periodontitis [J]. *Shanxi Medical Journal*), 2023, 52(11): 1463-7, 1472.
- [11] LIN P, NIIMI H, OHSUGI Y, et al. Application of ligature-induced periodontitis in mice to explore the molecular mechanism of periodontal disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8900.
- [12] BAI L, CHEN B Y, LIU Y, et al. A mouse periodontitis model with humanized oral bacterial community [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12(1): 842845.
- [13] CHEN M H, WANG Y H, SUN B J, et al. HIF-1 α activator DMOG inhibits alveolar bone resorption in murine periodontitis by regulating macrophage polarization [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99(1): 107901.
- [14] ZHU M, ZHAO Z, XU H H K, et al. Effects of metformin delivery via biomaterials on bone and dental tissue engineering [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15905.
- [15] HONG C Y, LIN S K, WANG H W, et al. Metformin reduces bone resorption in apical periodontitis through regulation of osteoblast and osteoclast differentiation [J]. *J Endod*, 2023, 49(9): 1129-37.
- [16] ALA M, ALA M. Metformin for cardiovascular protection, inflammatory bowel disease, osteoporosis, periodontitis, polycystic ovarian syndrome, neurodegeneration, cancer, inflammation and senescence: what is next [J]? *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2021, 4(6): 1747-70.
- [17] TAN Y, CHEN J, JIANG Y, et al. The anti-periodontitis action of metformin via targeting NLRP3 inflammasome [J]. *Arch Oral Biol*, 2020, 114(1): 104692.
- [18] YE X, WANG Y, TIAN Y, et al. Metformin alleviates junctional epithelium senescence via the AMPK/SIRT1/autophagy pathway in periodontitis induced by hyperglycemia [J]. *Heliyon*, 2024, 10(6): e27478.
- [19] YE Y, WANG P, ZHOU F. miR-489-3p inhibits TLR4/NF- κ B signaling to prevent inflammation in psoriasis [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1): 744.
- [20] DUAN Y, AN W, WU H, et al. Salvianolic acid c attenuates lps-induced inflammation and apoptosis in human periodontal ligament stem cells via toll-like receptors 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25(1): 9499-508.
- [21] LIU P, CUI L, SHEN L. Knockdown of TRIM52 alleviates LPS-induced inflammatory injury in human periodontal ligament cells through the TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20201223.
- [22] KIM J M, NOH E M, YOU Y O, et al. Downregulation of matrix metalloproteinase-1 and proinflammatory cytokines by suppressing the TLR4/NF- κ B signaling pathways in human gingival fibroblasts [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022(1): 3865844.