

原儿茶酸调节MEK/ERK信号通路对LPS诱导的牙周膜干细胞炎性损伤的影响

李素霞 俞逸峰 袁芳*

(联勤保障部队第九〇〇医院仓山区口腔科, 福州 350002)

摘要 该研究探讨原儿茶酸(PCA)调节丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路对LPS诱导的牙周膜干细胞(PDLSCs)炎性损伤的影响。该研究将PDLSCs分为对照组、LPS(1.0 $\mu\text{g/mL}$)组、LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组、LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组、LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126(20 $\mu\text{mol/L}$ MEK抑制剂U0126)组, 24 h后, CCK-8法检测细胞增殖; ELISA试剂盒检测炎症因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)水平; 流式细胞术检测凋亡; 各组PDLSCs在成骨诱导培养基中孵育, 随后以茜素红染色检测矿化结节; ALP试剂盒检测其含量; qRT-PCR检测成骨因子及炎症因子表达水平; Western blot检测MEK/ERK通路相关蛋白表达水平。实验结果显示, 与对照组相比, LPS组 D_{450} 、ALP、染色强度/ D_{562} 、runt相关转录因子2(RUNX2) mRNA及蛋白、骨钙素(OCN) mRNA及蛋白、MEK、p-ERK/ERK表达水平降低, 凋亡率、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平及mRNA表达水平增加($P<0.05$); 与LPS组相比, LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组、LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组 D_{450} 、ALP、染色强度/ D_{562} 、RUNX2 mRNA及蛋白、OCN mRNA及蛋白、MEK、p-ERK/ERK表达水平增加, 凋亡率、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平及mRNA表达水平降低, 组间差异显著($P<0.05$); 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126组 D_{450} 、ALP、染色强度/ D_{562} 、RUNX2 mRNA及蛋白、OCN mRNA及蛋白、MEK、p-ERK/ERK表达水平降低, 凋亡率、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平及mRNA表达水平增加($P<0.05$)。PCA激活MEK/ERK信号通路减轻LPS诱导的PDLSCs炎性损伤。

关键词 原儿茶酸; MEK/ERK信号通路; 脂多糖; 牙周膜干细胞; 炎性损伤

The Effect of Protocatechuic Acid on LPS Induced Inflammatory Injury in Periodontal Ligament Stem Cells by Regulating the MEK/ERK Signaling Pathway

LI Suxia, YU Yifeng, YUAN Fang*

(Department of Stomatology, Cangshan Campus, Joint Logistics Support Force Ninth 00 Hospital, Fuzhou 350002, China)

Abstract This study was to explore the effect of PCA (protocatechuic acid) on LPS induced inflammatory injury in PDLSCs (periodontal ligament stem cells) by regulating the MEK (mitogen-activated protein kinase kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) signaling pathway. In this study, PDLSCs were divided into the control group, LPS (1.0 $\mu\text{g/mL}$) group, LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group, and LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126 (20 $\mu\text{mol/L}$ MEK inhibitor U0126) group. After 24 h, cell proliferation was detected by the CCK-8 method; levels of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) were measured using ELISA kits; apoptosis was detected by flow cytometry. PDLSCs from each group were incubated in osteogenic induction medium, subsequently, alizarin red staining was used to detect mineralized nodules; the content was measured by ALP kit; the expression levels of os-

收稿日期: 2025-07-22

接受日期: 2025-09-30

*通信作者。Tel: 13675023607, E-mail: yfang476@163.com

Received: July 22, 2025

Accepted: September 30, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13675023607, E-mail: yfang476@163.com

teogenic factors and inflammatory factors were detected by qRT-PCR; and the expression levels of proteins related to the MEK/ERK pathway were detected by Western blot. The experimental results showed that, compared with the control group, the LPS group showed a decrease in D_{450} , ALP, staining intensity/ D_{562} , RUNX2 (runt related transcription factor 2) mRNA and protein, OCN (osteocalcin) mRNA and protein, MEK, and p-ERK/ERK expression, and an increase in apoptosis rate, IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels and mRNA expression ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group and LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group showed an increase in D_{450} , ALP, staining intensity/ D_{562} , RUNX2 mRNA and protein, OCN mRNA and protein, MEK, and p-ERK/ERK expression, and a decrease in apoptosis rate, IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels and mRNA expression, with prominent differences between the groups ($P<0.05$). Compared with the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group, the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+inhibitor group showed a decrease in D_{450} , ALP, staining intensity/ D_{562} , RUNX2 mRNA and protein, OCN mRNA and protein, MEK, and p-ERK/ERK expression, and an increase in apoptosis rate, IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels and mRNA expression ($P<0.05$). PCA activates the MEK/ERK signaling pathway to alleviate LPS induced inflammatory injury in PDLSCs.

Keywords protocatechuic acid; MEK/ERK signaling pathway; lipopolysaccharide; periodontal ligament stem cells; inflammatory injury

牙周炎是一种慢性炎症,严重威胁着患者口腔健康,其病理特征为牙槽骨和牙齿支持组织的破坏,使牙周韧带退化和丧失,最终可能导致牙齿脱落^[1]。牙周炎患者局部牙周组织中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是常见的毒力因子,其作用于牙周组织,可促使炎症因子的产生,破坏牙周微环境,损害牙周组织,甚至可能通过体循环影响其他器官和系统,增加患慢性疾病如心血管疾病、糖尿病和类风湿性关节炎的风险^[2]。牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)是间充质干细胞的一个特殊亚群,具有自我更新能力和多向分化潜力,在牙周组织工程领域,PDLSCs被视作最具应用前景的细胞类型之一,能够有效促进牙周组织再生,然而在炎症微环境下,PDLSCs的功能会受到影响,如何保护其功能成为亟待解决的问题^[3]。原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)是一种天然存在的酚酸,在水果、蔬菜以及某些中草药中最为常见,研究已证实,PCA具有抗氧化、抗肿瘤以及抗炎等多种生物活性^[4],如已有研究显示其在LPS诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应中发挥抗炎作用^[5]。但在牙周炎中,PCA对PDLSCs的影响尚未得到充分研究。丝裂原活化蛋白激酶家族由一组细胞内丝氨酸/苏氨酸激酶组成,其包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38和c-Jun氨基末端激酶家族,能够触发多种细胞过程,包括增殖、炎症和细胞死亡,以响应不同的细胞外刺激,丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)/ERK通

路在炎症中具有特别重要的意义,当细胞受到外界炎症刺激时,MEK被激活,并磷酸化ERK使其进入到细胞核内,激活转录因子,调控下游炎症相关基因的表达,促进促炎细胞因子的合成与释放,加重炎症反应^[6]。最近研究发现牙周病的发生与MEK/ERK信号通路有关,激活该通路有助于炎症细胞因子表达^[7]。但PCA能否通过MEK/ERK信号通路减轻LPS诱导的PDLSCs炎症损伤尚未报道,本研究通过建立LPS诱导的PDLSCs牙周炎体外模型,旨在深入探索PCA对PDLSCs炎症损伤的影响及潜在作用机制。与以往研究相比,本研究的创新点在于首次将PCA、PDLSCs以及MEK/ERK信号通路三者联系起来,研究PCA在牙周炎炎症微环境下对PDLSCs炎症损伤的保护作用及机制,有望为牙周炎的治疗提供新的潜在靶点和治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)提供PDLSCs,采用DMEM培养基培养,培养条件为37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 ,当细胞扩增至80%融合时进行传代,每3天更换一次培养基。

1.2 主要材料

PCA(货号:YT-P001)、LPS(货号:YT-L003)、茜素红(货号:YT-A005)购自北京伊塔生物科技有限公司;MEK抑制剂U0126(货号:RWD-U0126-10mg)购自上海嵘崑达实业有限公司;碱性磷酸酶(alka-

line phosphatase, ALP)试剂盒(货号: SHR-ALP-001)购自南京赛泓瑞生物科技有限公司; MEK(货号: ab32091)、ERK(货号: ab17942)、p-ERK(货号: ab201015)抗体, HRP偶联二抗(货号: ab6721)购自Abcam公司; 炎症因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)ELISA试剂盒(货号: EKS-001、EKS-002、EKS-003)购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司; CCK-8试剂盒(货号: GK10001)购自上海吉至生化科技公司; 十六烷基氯化吡啶(批号: C8510)购自Sigma-Aldrich公司; Triton X-100(批号: T8200)购自北京索莱宝科技有限公司; RIPA裂解液(批号: P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司; 10% SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号: C600522)购自南京金斯瑞生物科技有限公司; ECL发光试剂(批号: WBKLS0500)购自Millipore公司; 总RNA提取试剂盒(批号: DP430)购自北京天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒(批号: RR047A)购自TaKaRa公司; SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(批号: ES008)购自广州东盛生物科技有限公司; 抗坏血酸(批号: A101214)、地塞米松(批号: D104422)、 β -甘油磷酸钠(批号: G100222)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Annexin V-异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡试剂盒(批号: KGA108)购自南京凯基科技发展有限公司。

酶标仪(型号: Elx800™ Absorbance Microplate Reader)、qRT-PCR仪(型号: CFX96™ Real-Time System)购自Bio-Rad公司; 全自动凝胶成像系统(型号: OI1000型)购自广州光仪生物科技有限公司; 倒置显微镜(型号: CKX53型)购自Olympus公司; 流式细胞仪(型号: BD FACSCanto™ II)购自BD公司; CO₂培养箱(型号: Heracell™ 150i)购自ThermoFisher Scientific公司; 高速离心机(型号: Allegra™ X-30R)购自Beckman Coulter公司。

1.3 细胞分组及处理

PDLSCs进行分组处理。对照(control)组: PDLSCs常规培养, 不做处理; LPS组: 以1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS诱导PDLSCs 24 h^[8]; LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组: 以1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS诱导PDLSCs, 同时加入5 $\mu\text{mol/L}$ PCA处理24 h; LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组: 以1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS诱导PDLSCs, 同时加入10 $\mu\text{mol/L}$ PCA处理24 h^[5]; LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126组: 以1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS诱导PDLSCs, 同时加入10 $\mu\text{mol/L}$ PCA、20 $\mu\text{mol/L}$ 的

MEK抑制剂U0126处理24 h^[9]。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖

以每孔 1×10^4 个PDLSCs接种于96孔板中, 根据分组更换培养基, 培养24 h, 加入10 μL CCK-8溶液, 进一步孵育2 h(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂), 使用酶标仪测量450 nm的吸光度(D)值。

1.5 ELISA试剂盒检测炎症因子水平

以每孔 5×10^4 个细胞接种PDLSCs, 根据分组更换培养基, 培养24 h, 收集上清液, 并按照试剂盒说明操作, 加入终止溶液后, 在450 nm处测量吸光度值, 并使用标准曲线数据进行线性回归, 计算样品中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

将处理PDLSCs重悬于结合缓冲液中, 然后加入Annexin V-异硫氰酸荧光素和碘化丙啶, 经流式仪检测细胞凋亡率。

1.7 茜素红染色检测矿化结节

将PDLSCs以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种在6孔板中, 根据分组更换培养基, 在成骨诱导培养基(100 nmol/L地塞米松、10% FBS、50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸和10 mmol/L β -甘油磷酸钠组成)中培养21天, 每3天更换一次成骨诱导培养基, 加入4%多聚甲醛溶液, 在室温下固定30 min; 固定完成后, 弃去固定液, 用蒸馏水冲洗, 加入2%茜素红溶液在室温下染色30 min, 用蒸馏水冲洗PDLSCs, 采用CKX53型倒置显微镜拍摄染色结果, 然后通过添加10%十六烷基氯化吡啶进行溶解并定量染色强度。

1.8 ALP试剂盒检测ALP含量

各组PDLSCs在成骨诱导培养基(成分组成同上)中培养, 使用聚乙二醇辛基苯基醚中裂解PDLSCs, 提取上清液, 并取适量细胞裂解液接种在96孔板中, 与显色底物在37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 终止溶液终止反应, 在405 nm处检测吸光度值以计算ALP活性。

1.9 qRT-PCR检测成骨因子及炎症因子表达水平

提取接受14天成骨诱导的PDLSCs细胞中的总RNA, 采用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA, 利用SYBR GreenPro Taq HS预混型qPCR试剂盒进行qRT-PCR, 相对定量法计算基因mRNA的相对表达, 引物序列见表1。

1.10 Western blot检测MEK/ERK通路相关蛋白表达情况

各组PDLSCs经成骨诱导培养基培养, 用RIPA

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

引物名称(NCBI核酸序列登录号)	方向	序列(5'→3')	碱基数/bp
Primer name (NCBI nucleic acid sequence accession number)	Direction	Sequence (5'→3')	Base number /bp
TNF-α (NM_000594.4)	F	CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC	125
	R	ATG GGC TAC AGG CTT GTC ACT	
IL-6 (NM_000600.4)	F	AGG AGA CTT GCC TGG TGA AA	185
	R	GCA TTT GTG GTT GGG TCA GG	
IL-1β (NM_000576.4)	F	GGA CAG GAT ATG GAG CAA CAA GTG G	143
	R	TCA TCT TTC AAC ACG CAG GAC AGG	
RUNX2 (NM_004348.4)	F	CCA CCG AGA CCA ACA GAG TC	164
	R	TCA CTG TGC TGA AGA GGC TG	
OCN (NM_007541.4)	F	CCA CCG AGA CAC CAT GAG AG	137
	R	CGC CTG GGT CTC TTC ACT AC	
β-actin (NM_001101.5)	F	CTT CGC GGG CGA CGA T	125
	R	CCA CAT AGG AAT CCT TCT GAC C	

裂解物分离总细胞蛋白,使用10% SDS-PAGE凝胶分离等量总蛋白,随后转膜、封闭,在4 °C下用一抗(MEK、p-ERK、ERK)探测过夜,一抗稀释比为1:1 000,随后在室温下与适当的HRP偶联二抗孵育2 h,二抗稀释比为1:2 000,ECL发光试剂曝光,使用ImageJ分析每个蛋白质条带灰度值。

1.11 统计分析

SPSS 26.0软件分析结果,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示数据,数据均满足状态分布及方差齐性,采用单因素方差分析,当单因素方差分析结果显示组间存在统计学差异,两两比较行SNK-*q*检验; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCA提高PDLSCs中D₄₅₀值

与对照组相比,LPS组D₄₅₀降低($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+5 μmol/L PCA组、LPS+10 μmol/L PCA组D₄₅₀增加($P<0.05$);与LPS+5 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA组D₄₅₀增加($P<0.05$);与LPS+10 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA+U0126组D₄₅₀降低($P<0.05$);见图1。

2.2 PCA抑制PDLSCs凋亡

与对照组相比,LPS组凋亡率增加($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+5 μmol/L PCA组、LPS+10 μmol/L PCA组凋亡率降低($P<0.05$);与LPS+5 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA组凋亡率降低($P<0.05$);与LPS+10 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L

PCA+U0126组凋亡率增加($P<0.05$);见图2和图3。

2.3 PCA抑制PDLSCs中IL-1β、IL-6和TNF-α mRNA表达

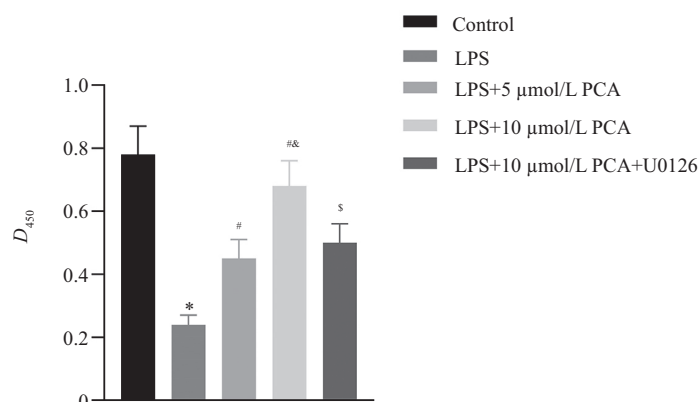
与对照组相比,LPS组IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA表达水平增加($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+5 μmol/L PCA组、LPS+10 μmol/L PCA组IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA表达水平降低($P<0.05$);与LPS+5 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA组IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA表达水平降低($P<0.05$);与LPS+10 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA+U0126组IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA表达水平增加($P<0.05$);见图4。

2.4 PCA上调PDLSCs中RUNX2、OCN mRNA的表达

与对照组相比,LPS组RUNX2、OCN mRNA表达水平降低($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+5 μmol/L PCA组、LPS+10 μmol/L PCA组RUNX2、OCN mRNA表达水平增加($P<0.05$);与LPS+5 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA组RUNX2、OCN mRNA表达水平增加($P<0.05$);与LPS+10 μmol/L PCA组相比,LPS+10 μmol/L PCA+U0126组RUNX2、OCN mRNA表达水平降低($P<0.05$);见图5。

2.5 PCA降低PDLSCs中IL-1β、IL-6和TNF-α的水平

与对照组相比,LPS组IL-1β、IL-6和TNF-α增加($P<0.05$);与LPS组相比,LPS+5 μmol/L PCA组、LPS+10 μmol/L PCA组IL-1β、IL-6和TNF-α降低($P<0.05$);



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较; $^sP < 0.05$, 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; $^sP < 0.05$ compared with the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group.

图1 PDLSCs中 D_{450} 变化

Fig.1 The D_{450} changes in PDLSCs

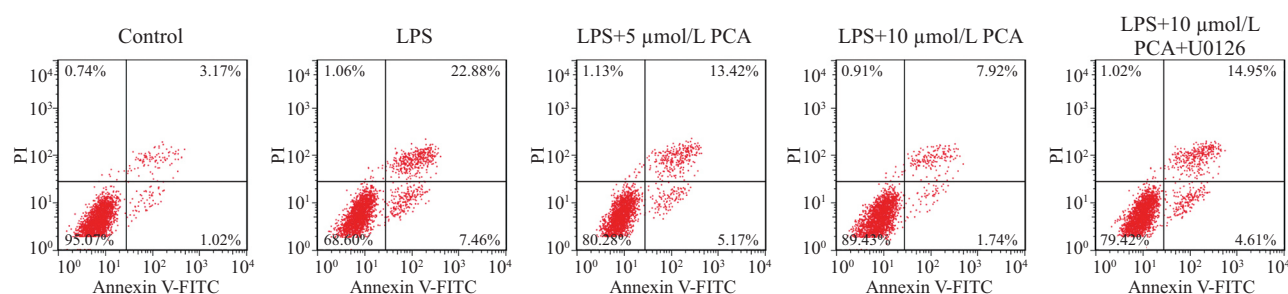
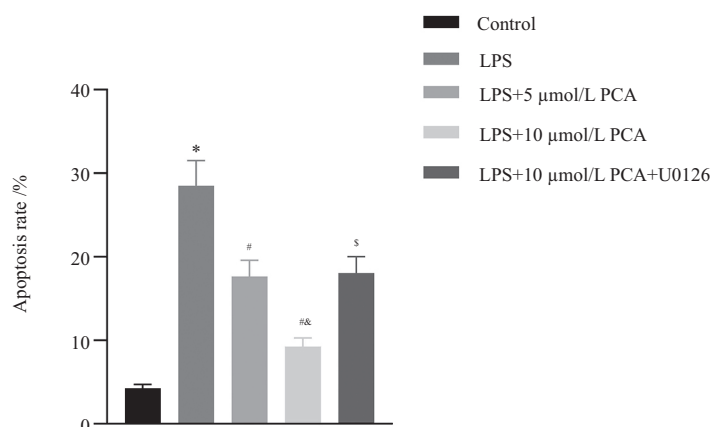


图2 各组PDLSCs的凋亡变化

Fig.2 The changes in apoptosis of PDLSCs in each group



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较; $^sP < 0.05$, 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; $^sP < 0.05$ compared with the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group.

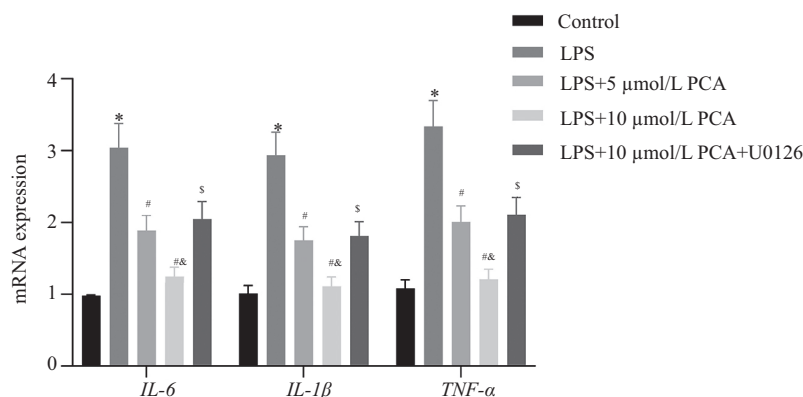
图3 PDLSCs中凋亡率变化

Fig.3 The changes in apoptosis rate in PDLSCs

与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 降低($P < 0.05$); 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 增加($P < 0.05$); 见图6。

2.6 PCA增加PDLSCs中矿化结节、染色强度及ALP水平

与对照组相比, LPS组矿化结节形成能力显著降低, ALP、染色强度/ D_{562} 降低($P < 0.05$); 与LPS组相比,

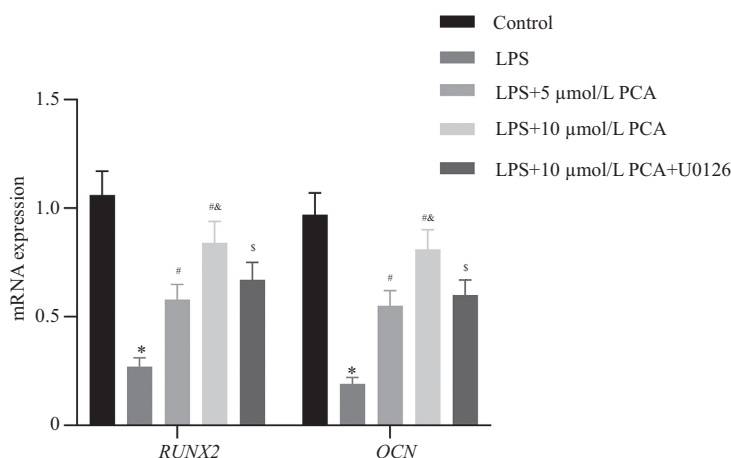


* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较; S $P < 0.05$, 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; S $P < 0.05$ compared with the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group.

图4 PDLSCs中 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA表达变化

Fig.4 The mRNA expression changes of $IL-1\beta$, $IL-6$, and $TNF-\alpha$ in PDLSCs



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较; S $P < 0.05$, 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; S $P < 0.05$ compared with the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group.

图5 PDLSCs中 $RUNX2$ 、 OCN mRNA表达变化

Fig.5 The mRNA expression changes of $RUNX2$ and OCN in PDLSCs

LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组、LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组矿化结节形成能力显著增加, ALP、染色强度/ D_{562} 增加($P < 0.05$); 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组矿化结节形成能力显著增加, ALP、染色强度/ D_{562} 增加($P < 0.05$); 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126组矿化结节形成能力显著降低, ALP、染色强度/ D_{562} 降低($P < 0.05$); 见图7和图8。

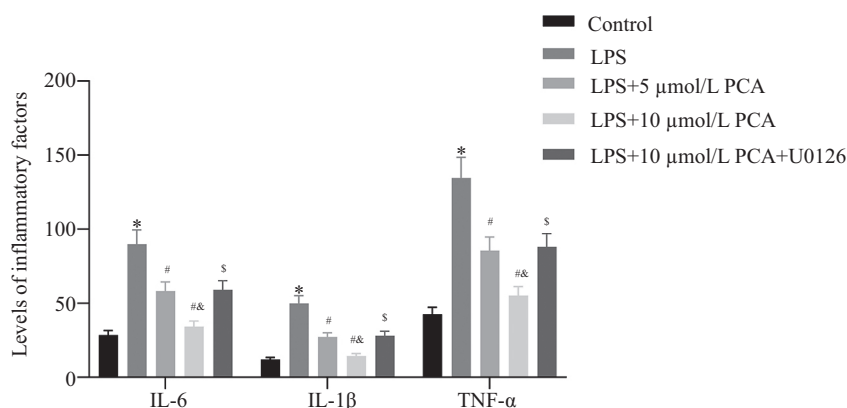
2.7 PCA上调PDLSCs中MEK、p-ERK/ERK、 $RUNX2$ 、 OCN 的蛋白表达

与对照组相比, LPS组MEK、p-ERK/ERK、 $RUNX2$ 、 OCN 表达水平降低($P < 0.05$); 与LPS组相比, LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组、LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组

MEK、p-ERK/ERK、 $RUNX2$ 、 OCN 表达水平增加($P < 0.05$); 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组MEK、p-ERK/ERK、 $RUNX2$ 、 OCN 表达水平增加($P < 0.05$); 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组相比, LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126组MEK、p-ERK/ERK、 $RUNX2$ 、 OCN 蛋白表达水平降低($P < 0.05$); 见图9和图10。

3 讨论

牙周炎属于常见的口腔炎症性疾病, 其可能在全身性疾病的发生或进展中发挥作用, 对人类的生活质量产生重大影响^[10]。目前牙周炎的治疗选择包



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 μmol/L PCA组比较; \$ $P < 0.05$, 与LPS+10 μmol/L PCA组比较。 $n = 6$ 。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 μmol/L PCA group; \$ $P < 0.05$ compared with the LPS+10 μmol/L PCA group. $n = 6$.

图6 PDLSCs中IL-1β、IL-6和TNF-α变化

Fig.6 The changes of IL-1β, IL-6 and TNF-α in PDLSCs

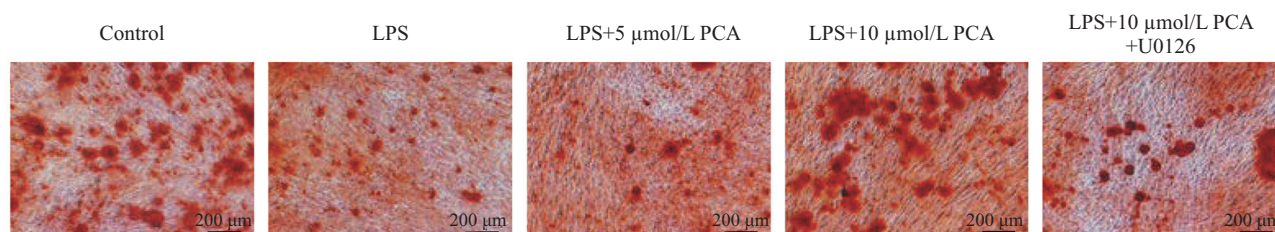
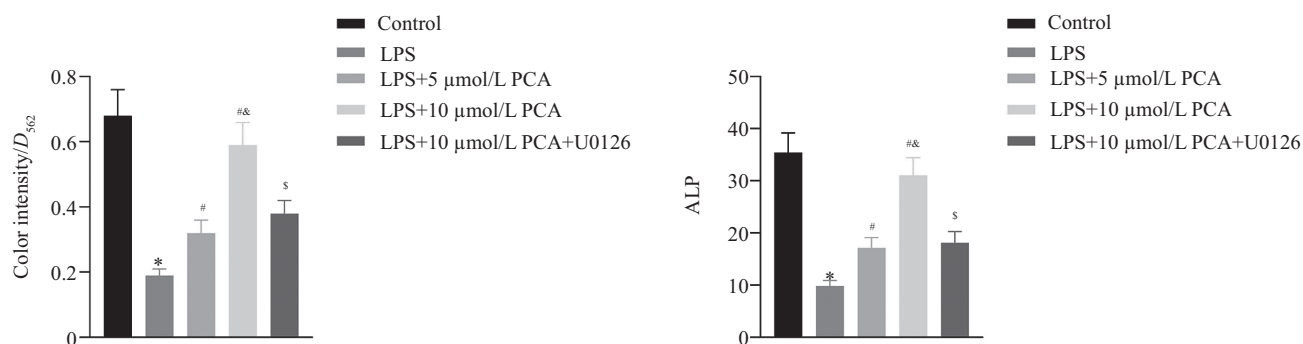


图7 茜素红染色观察PDLSCs中矿化结节变化

Fig.7 Observation of mineralized nodule changes in PDLSCs by alizarin red staining



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 μmol/L PCA组比较; \$ $P < 0.05$, 与LPS+10 μmol/L PCA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 μmol/L PCA group; \$ $P < 0.05$ compared with the LPS+10 μmol/L PCA group.

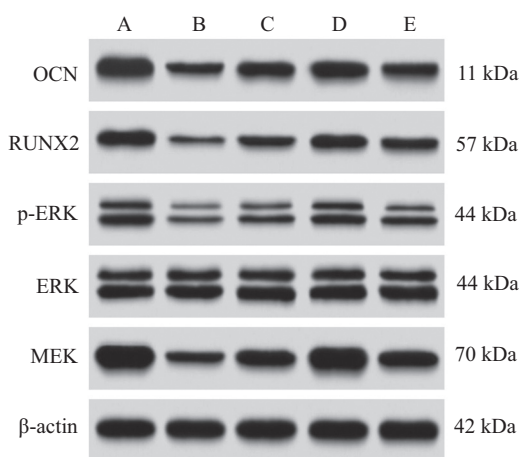
图8 PDLSCs中ALP、染色强度/ D_{562} 变化

Fig.8 ALP and staining intensity/ D_{562} changes in PDLSCs

括龈上洁治术、龈下刮治术等,但其治疗往往需要联合药物辅助治疗,目前辅助药物以抗菌药为主,存在易诱导细菌耐药性、对炎症微环境作用有限等不足,故探索发病机制、研发新型辅助治疗药物是临床关键任务^[11]。

中草药因其使用历史悠久、成本低且安全性高

受到人们的关注,PCA是一种广泛分布的天然酚酸,具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤等多种药理活性^[12],在牙周炎中,LPS被认为是导致牙周组织炎症和细胞损伤的常见因素,LPS是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,导致牙周组织中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞浸润,释放大量IL-1β、TNF-α、IL-6等炎

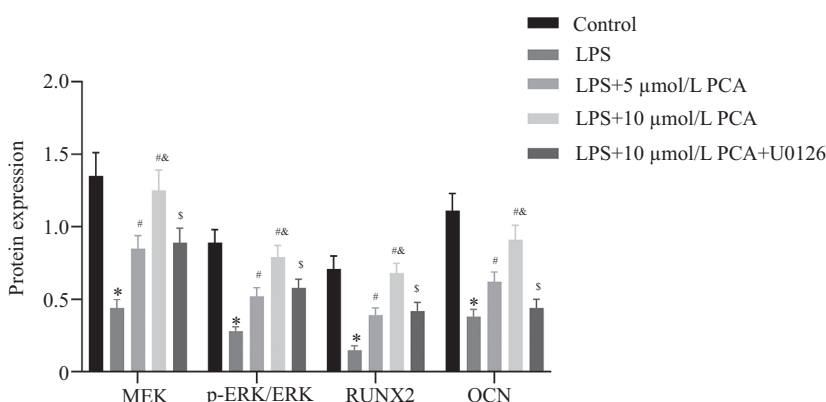


A: 对照组; B: LPS组; C: LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组; D: LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组; E: LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126组。

A: the control group; B: the LPS group; C: the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; D: the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; E: the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA+U0126 group.

图9 PDLSCs中MEK、p-ERK、ERK、RUNX2、OCN蛋白表达

Fig.9 Protein expression of MEK, p-ERK, ERK, RUNX2 and OCN in PDLSCs



* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与LPS组比较; & $P < 0.05$, 与LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较; $^sP < 0.05$, 与LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA组比较。

* $P < 0.05$ compared with the control group; # $P < 0.05$ compared with the LPS group; & $P < 0.05$ compared with the LPS+5 $\mu\text{mol/L}$ PCA group; $^sP < 0.05$ compared with the LPS+10 $\mu\text{mol/L}$ PCA group.

图10 PDLSCs中MEK、p-ERK/ERK、RUNX2、OCN蛋白表达变化

Fig.10 Protein expression changes of MEK, p-ERK/ERK, RUNX2, and OCN in PDLSCs

症因子,加重炎症反应,使得牙周组织聚集更多的免疫细胞,同时破坏牙槽骨中骨吸收和骨再生之间的平衡,导致牙槽骨吸收,因此炎症反应在牙周炎中至关重要^[13-14]。PDLSCs具备干细胞特性如分化、免疫调节、克隆和增殖及再生潜能,在牙周组织再生及免疫调节过程中发挥关键作用,在牙周炎发展过程中,炎症微环境可抑制PDLSCs的自我更新与成骨分化,影响牙槽骨再生与重塑,研究PDLSCs对治疗牙周炎至关重要^[15-16]。本研究通过LPS处理PDLSCs模拟牙周炎的炎症微环境,结果显示IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平增加,细胞活力降低,凋亡增加,提示体外成功构建了牙周炎细胞模型。而PCA处理显著降

低了LPS诱导的PDLSCs释放的IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,这与PCA其他炎症模型中的抗炎作用相符。例如,PCA可抑制LPS诱导的神经炎症和肾脏损伤中的炎症反应^[12,17],其机制可能与抑制炎症信号通路的激活有关。马涛等^[5]发现PCA可抑制LPS诱导的牙周膜成纤维细胞炎症反应,本研究进一步扩展了PCA在牙周组织中的抗炎作用范围,表明了其对炎症环境中的PDLSCs也具有保护作用。牙周炎导致PDLSCs成骨能力下降,抑制其成骨分化相关基因的表达,阻碍牙槽骨再生,如IL-1 β 和TNF- α 能抑制成骨转录因子RUNX2的表达,RUNX2是PDLSCs向成骨细胞分化的关键调控因子,其表达受抑制会阻

碍PDLSCs成骨分化发展^[18]。OCN是一种在骨组织中特异性表达的非胶原蛋白,其水平在成骨分化过程中可作为成骨分化成熟度的标志^[19]。ALP对骨形成过程中的矿化至关重要,是成骨分化的标志物^[20]。本研究结果显示,PCA处理后,ALP、RUNX2、OCN的表达得到了恢复,促进了PDLSCs的成骨分化,首次证实其在牙周炎模型中能促进PDLSCs成骨分化,进一步拓展了PCA的药理应用应用范围,同时也表明PCA凭借其调控PDLSCs成骨分化的独特作用可能成为治疗牙周炎的候选药物。

MEK/ERK级联反应是一条重要的多功能信号通路,参与炎症和免疫的调节,其中ERK通路属于MAPK家族,介导细胞生物学过程及氧化应激、炎症等各种生理和病理过程,ERK可激活下游转录因子NF- κ B,影响炎症细胞因子的分泌,导致炎症性疾病的发生^[21-22]。本研究结果显示LPS处理PDLSCs后,MEK、p-ERK/ERK表达及成骨分化被抑制,促进炎症反应,提示MEK/ERK通路参与牙周炎发展,与先前研究结果吻合^[7]。JIANG等^[23]研究表明激活ERK表达,从而缓解炎症,促进间充质干细胞增殖和成骨分化,为本研究中MEK/ERK通路在牙周炎中的作用提供了支持。已有研究显示PCA可通过调节MEK/ERK通路在肾损伤等多种疾病中发挥作用,如在LPS诱导的小鼠肾损伤模型中,PCA可通过下调TLR-4介导的IKKB/NF- κ B和MAPK/ERK信号通路,减轻肾脏损伤^[17]。在A β 1-42诱导的海马神经元损伤中^[24],神经元生存率下降,ERK蛋白表达下调,而添加PCA后,细胞存活率提高,且ERK蛋白表达上调,以上结果提示PCA可能通过调节MEK/ERK通路在疾病中发挥作用。本研究结果显示PCA处理上调MEK、p-ERK/ERK表达,增加炎症微环境下PDLSCs活力,促进其成骨分化,推测其可能激活MEK/ERK通路,减少炎症细胞因子的产生,进而在牙周炎中发挥抗炎作用;同时PCA激活的MEK/ERK通路,可能通过上调成骨相关转录因子,如ALP、RUNX2、OCN等的表达,促进PDLSCs向成骨细胞分化,增强其成骨能力,这有助于牙周组织的修复与再生。为验证该机制,实验引入MEK抑制剂,结果显示其加入在一定程度上逆转了LPS诱导的PDLSCs炎性损伤,且削弱了PCA对该炎性损伤的抑制效应,但并未完全消除这一效应,这表明MEK/ERK通路可能仅是PCA发挥作用的部分通路,PCA或许还通过

其他信号通路共同参与对LPS诱导的PDLSCs炎性损伤的保护过程,这一推测有待后续进一步研究证实。

综上所述,本研究首次明确了PCA对LPS诱导的PDLSCs炎性损伤的保护作用及对成骨分化的促进作用,且初步探究了其MEK/ERK通路的关联,为阐明PCA在牙周炎治疗中的作用机制提供了实验依据。然而本研究仍存在一些局限性,如未在动物模型中验证其疗效,对于是否存在其他协同作用的信号通路也未进行研究,未来将构建牙周炎动物模型,评估PCA的体内治疗效果;进一步通过基因敲除、过表达等手段明确MEK/ERK信号通路及下游因子在PCA调控PDLSCs成骨分化过程中的作用机制,并探寻可能参与其中的其他信号通路;开展PCA的药物剂量的优化研究,明确其有效治疗剂量范围,探究是否具有转化意义,为其临床应用提供更充分的证据。

参考文献 (References)

- [1] YADALAM P K, ANEGUNDI R V, THILAGAR S, et al. Deep learning based micro-rna analysis of lipopolysaccharide exposed periodontal ligament stem cells exosomes reveal apoptotic and inflammasome derived pathway activation [J]. Biomed Eng Comput Biol, 2024, doi: 10.1177/11795972241277639.
- [2] ZHANG Q H, ZHANG Y X, ZHANG L. Potential of mir-299-5p to modulate LPS-induced inflammation and osteogenic differentiation of periodontal stem cells by targeting PUM2 [J]. BMC Oral Health, 2025, 25(1): 271-81.
- [3] STANLEY M, PL R, BLAISIE RAJULA P, et al. Curcumin as a modulator of osteogenic potential in lipopolysaccharide-treated human periodontal ligament cells: an *in vitro* study [J]. Cureus, 2025, 17(1): e76732.
- [4] FENG Y, SHI M, ZHANG Y, et al. Protocatechuic acid relieves ferroptosis in hepatic lipotoxicity and steatosis via regulating NRF2 signaling pathway [J]. Cell Biol Toxicol, 2024, 40(1): 104-27.
- [5] 马涛, 时婧, 张蕾, 等. 原儿茶酸对脂多糖诱导的人牙周膜成纤维细胞炎症反应的保护作用及机制[J]. 广西医学(MA T, SHI J, ZHANG L, et al. Protective effect and mechanism of protocatechuic acid on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in human periodontal ligament fibroblasts [J]. Guangxi Medical Journal), 2022, 44(2): 172-8,97.
- [6] ZHAO C, ZOU T, TANG R, et al. Placenta-specific 8 (PLAC8) mediates inflammation and mobility of the hPDLs via MEK/ERK signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 103(1): 108459-68.
- [7] DUAN M, JIE J, LI C, et al. Echinatin alleviates sepsis severity through modulation of the NF- κ B and MEK/ERK signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 179(1): 117359-68.
- [8] CHEN J, DENG L. KLF2 promotes osteogenic differentiation

- of human periodontal ligament stem cells by regulating Nrf2 expression [J]. *Int Dent J*, 2025, 75(3): 1554-63.
- [9] 王巍, 高素芳, 高莉. miR-377对子痫前期胎盘滋养层细胞HTR-8/SVneo凋亡和氧化应激的影响及MAPK/ERK信号通路在其中的作用[J]. *中国妇幼保健*(WANG W, GAO S F, GAO L. The effects of miR-377 on apoptosis and oxidative stress of placental trophoblast cells HTR-8/SVneo in preeclampsia and the role of MAPK/ERK signaling pathway [J]. *China Maternal and Child Health Care*), 2023, 38(16): 3103-8.
- [10] WANG J, ZHU Y. FOXA1 knockdown alleviates inflammation and enhances osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via STAT3 pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 814-22.
- [11] 尹德荣, 王雨薇, 阳宇函, 等. 具有抗牙龈卟啉单胞菌功效的天然植物提取物在牙周炎防治中的研究进展[J]. *中国科学: 生命科学*(YIN D R, WANG Y W, YANG Y H, et al. Research progress of natural plant extracts with anti-gingiphilus porphyrinum effect in the prevention and treatment of periodontitis [J]. *Science China: Life Sciences*), 2023, 53(6): 825-40.
- [12] LI S, LI S, SEMDE R, et al. Protocatechuic acid improves Alzheimer's disease by regulating the cholinergic synaptic signaling pathway [J]. *Chem Biodivers*, 2025, 1(1): e202402771.
- [13] WU Y, WANG X, ZHANG Y, et al. Proanthocyanidins ameliorate LPS-inhibited osteogenesis of PDLSCs by restoring lysine lactylation [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2947-64.
- [14] 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*(CAO X, ZHU T Y. The effect of non-sertanone on the AMPK/NLRP3 signaling pathway in regulating inflammatory injury of periodontal ligament stem cells induced by LPS [J]. *Journal of Clinical Prosthodontics*), 2023, 39(2): 72-6.
- [15] 熊芳, 王威, 刘思佳. 红景天苷对脂多糖诱导的牙周膜干细胞自噬、凋亡和沉默信息调节因子/叉头转录因子O1信号通路的影响[J]. *河北中医*(XIONG F, WANG W, LIU S J. The effects of rhodioidine on autophagy, apoptosis and the silence information regulation factor/forkhead transcription factor O1 signaling pathway in periodontal ligament stem cells induced by lipopolysaccharide [J]. *Henan Traditional Chinese Medicine*), 2025, 47(1): 59-65.
- [16] YANG H, ZHANG Y, ZHANG L, et al. Wnt7B enhances the osteogenic differentiation of lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament stem cells and inhibits the M1 polarization of macrophages by binding FZD4 [J]. *Mol Med Rep*, 2024, 30(5): 203-14.
- [17] SALAMA A A A, ELGOHARY R, FAHMY M I. Protocatechuic acid ameliorates lipopolysaccharide-induced kidney damage in mice via downregulation of TLR-4-mediated IKBKB/NF- κ B and MAPK/Erk signaling pathways [J]. *J Appl Toxicol*, 2023, 43(8): 1119-29.
- [18] MOON S H, SHIN S J, SHIM G Y, et al. Inhibitory effects of *Colocasia antiquorum* var. *esculenta* varnish on inflammation and alveolar bone loss in a rat ligature-induced periodontitis model [J]. *Dent Mater J*, 2025, 44(1): 86-92.
- [19] 唐小雪, 周政, 李启期, 等. 西格列汀激活基质细胞衍生因子-1/CXC趋化因子受体4信号通路对脂多糖诱导的人牙周膜干细胞增殖、凋亡、炎症和成骨分化的影响[J]. *华西口腔医学杂志*(TANG X X, ZHOU Z, LI Q Q, et al. The effect of sitagliptin on the proliferation, apoptosis, inflammation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells induced by lipopolysaccharide through activating the stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 signaling pathway [J]. *West China Journal of Stomatology*), 2024(1): 37-45.
- [20] 王欣, 刘延山, 束传亮. 瑞香素调控 NLRP3/IL-1 β 通路对脂多糖诱导的牙周膜干细胞炎性损伤及成骨能力的影响[J]. *华西口腔医学杂志*(WANG X, LIU Y S, SHU C L. Rheosine regulates the NLRP3/IL-1 β pathway and its effects on lipopolysaccharide-induced inflammatory injury and osteogenic capacity of periodontal ligament stem cells [J]. *West China Journal of Stomatology*), 2025, 47(2): 127-34.
- [21] ZHANG M M, ZHAO J W, LI Z Q, et al. Acupuncture at Back-Shu point improves insomnia by reducing inflammation and inhibiting the ERK/NF- κ B signaling pathway [J]. *World J Psychiatry*, 2023, 13(6): 340-50.
- [22] YUE W, DENG X, WANG Z, et al. Inhibition of the MEK/ERK pathway suppresses immune overactivation and mitigates TDP-43 toxicity in a *Drosophila* model of ALS [J]. *Immun Ageing*, 2023, 20(1): 27-39.
- [23] JIANG H, NI J, HU L, et al. Resveratrol may reduce the degree of periodontitis by regulating ERK pathway in gingival-derived mSCs [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(14): 11294-307.
- [24] 李智勇, 罗汉, 张海英. 原儿茶酸对A β 1-42寡聚体诱导AD海马神经元的保护作用[J]. *海南医学*(LI Z Y, LUO H, ZHANG H Y. The protective effect of protocatechuic acid on A β 1-42 oligomers-induced Alzheimer's disease-associated hippocampal neurons [J]. *Hainan Medicine*), 2015, 26(14): 2029-31.