

本文引用: 顾龙龙, 单 妍, 梁 璇, 李 荣, 谢 薇. 三七皂苷 R1 通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路促进脂多糖诱导的牙周炎细胞模型自噬[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(11): 2090–2097.

三七皂苷 R1 通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路促进脂多糖诱导的牙周炎细胞模型自噬

顾龙龙, 单 妍, 梁 璇, 李 荣, 谢 薇*

昆明医科大学海源学院生物化学分子生物学教研室, 云南 昆明 651700

〔摘要〕 目的 基于 5'-磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)/UNC-51 样激酶 1(ULK1)信号通路,探究三七皂苷 R1 对脂多糖(LPS)诱导的牙周炎细胞自噬的影响。**方法** 采用 100 ng/mL LPS 处理人牙周膜成纤维细胞(hPDLFs)24 h 以构建牙周炎细胞模型。将牙周炎细胞分为 control 组、LPS 组、LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+AMPK 抑制剂 Compound C 组。流式细胞术检测细胞的凋亡情况,Western blot 检测细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Beclin-1、p62、p-AMPK、p-mTOR、p-ULK1 蛋白表达水平及 LC3-II/I 蛋白表达比值,免疫荧光染色实验检测细胞中 LC3 蛋白的表达水平。**结果** 相对于 control 组,LPS 组细胞的凋亡率升高($P<0.05$),细胞中 Bcl-2、Beclin-1、p-AMPK、p-ULK1 蛋白表达水平及 LC3-II/I 比值降低($P<0.05$),细胞中 Bax、cleaved Caspase-3、p62、p-mTOR 蛋白表达水平升高($P<0.05$);相对于 LPS 组,LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞的凋亡率降低($P<0.05$),细胞中 Bcl-2、Beclin-1、p-AMPK、p-ULK1 蛋白表达水平及 LC3-II/I 比值升高($P<0.05$),细胞中 Bax、cleaved Caspase-3、p62、p-mTOR 降低($P<0.05$);相对于 LPS+三七皂苷 R1 组,LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞的凋亡率升高($P<0.05$),细胞中 Bcl-2、Beclin-1、p-AMPK、p-ULK1 蛋白表达水平及 LC3-II/I 比值降低($P<0.05$),细胞中 Bax、cleaved Caspase-3、p62、p-mTOR 升高($P<0.05$)。**结论** 三七皂苷 R1 能够促进 LPS 诱导的牙周炎细胞自噬并抑制其凋亡,其机制可能与激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路有关。

〔关键词〕 牙周炎;人牙周膜成纤维细胞;三七皂苷 R1;AMPK/mTOR/ULK1 信号通路;自噬;凋亡

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.11.009

Panax notoginseng saponin R1 activates the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway to promote autophagy in a lipopolysaccharide-induced periodontitis cell model

GU Longlong, SHAN Yan, LIANG Xuan, LI Rong, XIE Wei*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Haiyuan College, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 651700, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the effects of Panax notoginseng saponin R1 (NGR1) on autophagy in lipopolysaccharide (LPS)-induced periodontitis cells via the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian rapamycin target protein (mTOR)/Unc-51 like kinase 1 (ULK1) signaling pathway. **Methods** Human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs) were treated with 100 ng/mL LPS for 24 h to establish a periodontitis cell model. The periodontitis cells were divided into control group, LPS group, LPS+NGR1 group, and LPS+NGR1+AMPK inhibitor Compound C group. Flow cytometry was used to check apoptosis of the cells. The protein expression levels of Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, Beclin-1, p62, p-AMPK, p-mTOR, and p-ULK1, as well as the LC3-II/I ratio, were determined by Western blot. Immunofluorescence staining assay was used to examine the protein expression level of LC3. **Results** Compared with the control group, the LPS group exhibited a significant increase in the apoptosis

〔收稿日期〕2025-07-23

〔基金项目〕昆明医科大学海源学院 2024 年科学研究基金项目(2024HY013)。

〔通信作者〕* 谢 薇,女,副教授,E-mail:54273253@qq.com。

rate of cells ($P<0.05$). The protein expression levels of Bcl-2, Beclin-1, p-AMPK and p-ULK1 in cells, as well as the LC3-II/I ratio in cells decreased ($P<0.05$). Conversely, the protein expression levels of Bax, cleaved Caspase-3, p62, and p-mTOR in cells were elevated ($P<0.05$). Compared with the LPS group, the apoptosis rate of cells in LPS+Panax notoginseng saponin R1 group and LPS+Panax notoginseng saponin R1+Compound C group decreased ($P<0.05$). The protein expression levels of Bcl-2, Beclin-1, p-AMPK, and p-ULK1, as well as the LC3-II/I ratio, significantly increased ($P<0.05$). Conversely, the protein expression levels of Bax, cleaved Caspase-3, p62, and p-mTOR significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the LPS+notoginsenoside R1 group, the cells in the LPS+notoginsenoside R1+Compound C group exhibited an increased apoptosis rate ($P<0.05$), along with decreased levels of Bcl-2, Beclin-1, the ratio of LC3-II/I, p-AMPK, and p-ULK1 ($P<0.05$), while showing increased levels of Bax, cleaved Caspase-3, p62, and p-mTOR ($P<0.05$). **Conclusion** Panax notoginseng saponin R1 promotes autophagy and inhibits apoptosis of LPS-induced periodontitis cells, and its mechanism may be related to the activation of AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

[Keywords] periodontitis; human periodontal ligament fibroblasts; Panax notoginseng saponin R1; AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway; autophagy; apoptosis

牙周炎是慢性炎症性疾病,菌斑生物膜导致的牙周组织炎症反应会导致牙龈肿痛、牙齿松动移位,甚至牙齿脱落^[1]。目前,临床上治疗牙周炎的技术主要有洁治和根面平整等,但无法治愈严重的牙周炎患者^[2]。人牙周膜成纤维细胞(human periodontal ligament fibroblasts, hPDLFs)是牙周组织再生修复的细胞基础,在牙周病病理变化和转归中起着重要作用^[3]。自噬是细胞的溶酶体降解过程,能够将受损、衰老的细胞器及蛋白降解而维持细胞内环境稳态,与牙周炎等疾病密切相关。适度的细胞自噬有利于维持口腔健康,但自噬不足或过度会损伤口腔组织^[4]。动物实验发现,抑制细胞自噬水平能够有利于减轻大鼠的牙周炎症状^[5]。牙周组织凋亡也是牙周炎的重要病理特征之一^[6]。研究表明,抑制牙周组织细胞凋亡能够显著改善牙周炎小鼠的牙槽骨吸收情况^[7]。

5'-磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是调控机体能量代谢及细胞增殖、分化的重要信号分子,当AMPK感受到外界炎症因子等刺激被激活后,会通过调控其下游哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian rapamycin target protein, mTOR)/UNC-51样激酶1(Unc-51 like kinase 1, ULK1)信号分子而影响细胞的自噬、凋亡等过程^[8]。激活mTOR/ULK1信号通路能够通过抑制自噬来促进人牙周韧带干细胞的成骨分化^[9]。AMPK激活剂处理后也能显著减轻脂多糖诱导的牙周膜干细胞凋亡情况^[10]。三七皂苷R1是从中药三七中提取出的植物雌激素,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用,体外研究发现其能促进人牙周膜干细胞的增殖及成骨分化^[11],但其涉及的分子机制尚未完全阐明。因此,本研究通过培养hPDLFs并用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激以构建牙周炎细胞模型,并基于AMPK/mTOR/

ULK1信号通路及细胞自噬,初步探究三七皂苷R1改善牙周炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

三七皂苷R1(纯度:HPLC $\geq$ 98%,规格:200 mg,批号:B21099)购自上海源叶生物技术有限公司;LPS(批号:HY-D1056)、AMPK抑制剂Compound C(批号:HY-13418A)、Annexin V-FITC/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒(批号:HY-K1073)均购自美国MCE公司;MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号:C0009M)购自上海碧云天科技有限公司;Bcl-2一抗(批号:3498S)、Bax一抗(批号:2772S)、cleaved Caspase-3一抗(批号:9661S)、LC3一抗(批号:12741S)、p62一抗(批号:5114T)、p-AMPK一抗(批号:50081T)、p-mTOR一抗(批号:5536T)、p-ULK1一抗(批号:14202T)均购自美国Cell signaling Technology公司;Beclin-1一抗(批号:11306-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

人牙周膜成纤维细胞株hPDLFs(批号:CPH136)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,培养于含10%胎牛血清(fetal calf serum, FBS)的DMEM培养基中。培养环境:5% CO₂、37℃的细胞培养箱。

1.3 药物浓度筛选

1.3.1 三七皂苷R1对hPDLFs细胞毒性的评估 参照既往文献,将实验分成control组、三七皂苷R1(1、10、20、40、80、120、160 μ mol/L)组^[12-13]。取对数生长期的hPDLFs细胞接种于96孔板中,每组3个复孔,接种24 h后,三七皂苷R1组加入对应浓度的三七皂苷R1处理24 h,control组加入等量DMSO,

每孔加入 100 μL MTT 溶液孵育 4 h,弃去 MTT 溶液,避光加入 DMSO 溶液摇床上孵育 10 min,于酶标仪中测量每孔在 490 nm 处的吸光度值。

1.3.2 三七皂苷 R1 对牙周炎细胞模型的影响 取对数生长期的 hPDLFs 细胞接种于 96 孔板中。接种 24 h 后,用不同浓度(1、10、20、40、80、120、160 $\mu\text{mol/L}$)的三七皂苷 R1(溶剂为含 1%DMSO 的培养基)处理 24 h,随后加入 100 ng/mL 的 LPS 处理 24 h 以构建牙周炎细胞模型^[14];LPS 组细胞加入含 1%DMSO 的培基处理 24 h,随后加入 100 ng/mL 的 LPS 处理 24 h;control 组细胞加入含 1%DMSO 的培基处理 24 h,随后加入等量 PBS 溶液处理 24 h。药物处理完毕后弃去培基,每孔加入 100 μL MTT 溶液孵育 4 h,弃去 MTT 溶液,避光加入 DMSO 溶液摇床上孵育 10 min,于 490 nm 处测量每孔的吸光度值。

1.3.3 牙周炎细胞模型的验证 收集 1.3.2 中 control 组及 LPS 组细胞的细胞上清液,试剂盒检测细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平,以验证牙周炎细胞模型是否构建成功。

1.4 实验设计

将细胞分为 control 组、LPS 组、LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+AMPK 抑制剂 Compound C 组。取对数生长期的 hPDLFs 接种于目标孔板中培养 24 h 使细胞贴壁。control 组细胞加入含 1%DMSO 的培养基处理 24 h,随后加入含 1%DMSO 的培基处理 24 h,最后加入等量 PBS 溶液处理 24 h;LPS 组细胞加入含 1%DMSO 的培基处理 24 h,随后加入含 1%DMSO 的培基处理 24 h,最后用 100 ng/mL 的 LPS 处理 24 h;LPS+三七皂苷 R1 组细胞加入含 1%DMSO 的培基处理 24 h,随后加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 的三七皂苷 R1 处理 24 h,最后用 100 ng/mL 的 LPS 处理 24 h;LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Compound C(溶剂为含 1%DMSO 的培基)处理 24 h^[15],随后加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 的三七皂苷 R1 处理 24 h,最后用 100 ng/mL 的 LPS 处理 24 h。

1.5 流式细胞术

取“1.4”得到的细胞,将 10 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 加入 200 μL 含有 1×10^6 个细胞的 PBS 溶液中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的暗室中作用 30 min,上流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况,依据公式“细胞凋亡率=凋亡细胞/总细胞 $\times 100\%$ ”计算细胞凋亡率。

1.6 Western blot 实验

取“1.4”得到的细胞(6 孔板),每孔加入 100 μL

的 RIPA 蛋白裂解液,细胞刮刮下细胞,超声加速裂解 5 min,冰上放置,离心后取上清液,BCA 试剂盒检测上清中的蛋白样品浓度,加入裂解液适当稀释,100 $^{\circ}\text{C}$ 温度下煮沸 10 min 以变性蛋白。蛋白样品上样,电泳后转膜,快速封闭液封闭 30 min,Bcl-2 一抗(稀释 1:1 000)、Bax 一抗(稀释 1:1 000)、cleaved Caspase-3 一抗(稀释 1:1 000)、LC3 一抗(稀释 1:1 000)、Beclin-1 一抗(稀释 1:1 000)、p62 一抗(稀释 1:1 000)、p-AMPK 一抗(稀释 1:1 000)、p-mTOR 一抗(稀释 1:800)、p-ULK1 一抗(稀释 1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗室温下孵育 1 h,曝光,ImageJ 软件测定各条带灰度值以半定量目标蛋白的表达量。

1.7 免疫荧光染色实验

取“1.4”得到的细胞(24 孔板),4%多聚甲醛室温下固定 15 min,免疫染色强力通透液孵育 30 min,免疫染色封闭液孵育 30 min,每孔加入 200 μL LC3 一抗并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,每孔加入荧光二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 2 h,加入 DAPI 避光染核 5 min,最后加入荧光淬灭剂。倒置荧光显微镜检测细胞中 LC3 的荧光表达情况。 $\text{LC3 相对荧光强度} = \text{目标组别荧光强度} / \text{control 组荧光强度}$ 。

1.8 统计学分析

数据处理采用 SPSS 20.0 软件,以上符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 表示数据间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 牙周炎细胞模型的验证

与 control 组比较,LPS 组细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的水平升高($P < 0.05$),表明牙周炎细胞模型构建成功。详见表 1。

表 1 各组细胞细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$, pg/mL)

Table 1 Comparison of IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels in cell supernatant among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$, pg/mL)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
control 组	20.73 $\pm$ 1.59	26.54 $\pm$ 2.01	42.51 $\pm$ 2.91
LPS 组	49.31 $\pm$ 3.05	71.86 $\pm$ 5.40	97.29 $\pm$ 6.57
<i>t</i> 值	14.392	13.623	13.204
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 三七皂苷 R1 药物浓度的筛选

由实验结果可知,1、10、20、40、80、120、160 $\mu\text{mol/L}$ 的三七皂苷 R1 对 hPDLFs 细胞没有明显的细胞毒性。与 control 组比较,LPS 组细胞的细胞活力降低($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+20、40、80、120、160 $\mu\text{mol/L}$ 三七皂苷 R1 组的细胞活力升高($P<0.05$),其中尤以 80 $\mu\text{mol/L}$ 的三七皂苷 R1 效果最为显著,因此,选择 80 μM 三七皂苷 R1 用于后续实验。详见图 1。

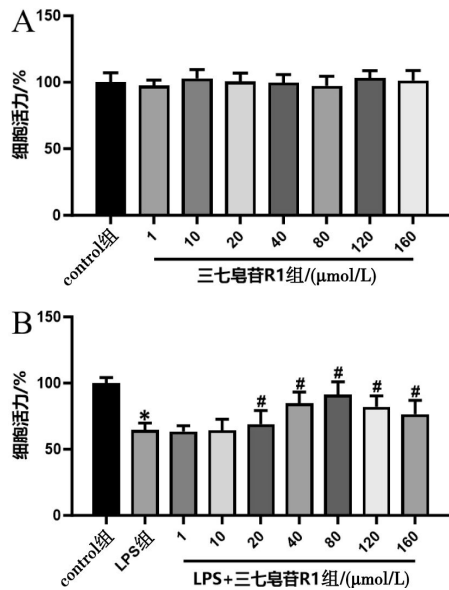


图1 MTT 筛选三七皂苷 R1 作用于 hPDLFs 细胞的浓度
Fig.1 MTT assay screening the optimal concentration of NGR1 on hPDLFs

注:A.三七皂苷 R1 对 hPDLFs 细胞细胞毒性的评估;B.三七皂苷 R1 对牙周炎细胞模型的影响。与 control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,* $P<0.05$ 。

2.3 三七皂苷 R1 对牙周炎细胞凋亡率的影响

与 control 组比较,LPS 组细胞的凋亡率升高($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞的凋亡率降低($P<0.05$);与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞的凋亡率升高($P<0.05$)。详见图 2 及表 2。

2.4 三七皂苷 R1 对牙周炎细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与 control 组比较,LPS 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平降低,而 Bax、cleaved Caspase-3 表达水平升高($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 Bcl-2 蛋

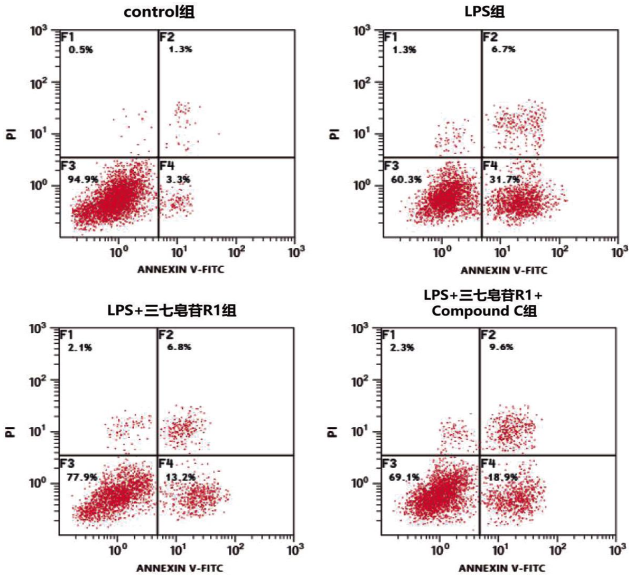


图2 流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况

Fig.2 Apoptosis of cells in each group checked by flow cytometry

表2 各组细胞凋亡率的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of apoptosis rates among various groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞凋亡率/%
control 组	5.17 $\pm$ 0.61
LPS 组	37.61 $\pm$ 4.73*
LPS+三七皂苷 R1 组	19.45 $\pm$ 1.69 [#]
LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组	28.06 $\pm$ 2.37 ^{#*}

注:与 control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,* $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,* $P<0.05$ 。

白表达水平升高,而 Bax、cleaved Caspase-3 表达水平降低($P<0.05$);与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平降低,而 Bax、cleaved Caspase-3 表达水平升高($P<0.05$)。详见图 3 及表 3。

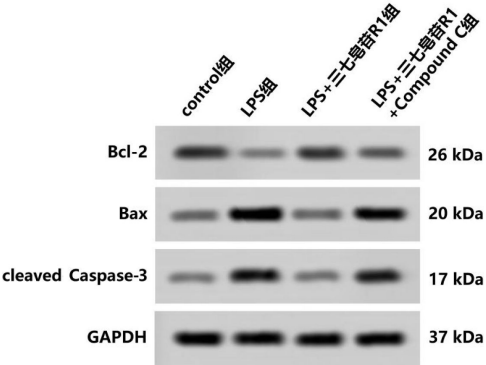


图3 Western blot 检测各组细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白条带图

Fig.3 Western blot testing the expression of Bcl-2, Bax, and cleaved-Caspase 3 proteins in each group of cells

表 3 各组细胞中 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of the protein expression of Bcl-2, Bax, and cleaved Caspase-3 in cells among various groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Bcl-2	Bax	cleaved Caspase-3
control 组	0.83±0.07	0.27±0.02	0.21±0.02
LPS 组	0.16±0.02*	0.96±0.08*	0.85±0.08*
LPS+三七皂苷 R1 组	0.62±0.05 [#]	0.32±0.03 [#]	0.22±0.02 [#]
LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组	0.31±0.03 ^{##}	0.74±0.06 ^{##}	0.60±0.05 ^{##}

注:与 control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[#] $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,^{##} $P<0.05$ 。

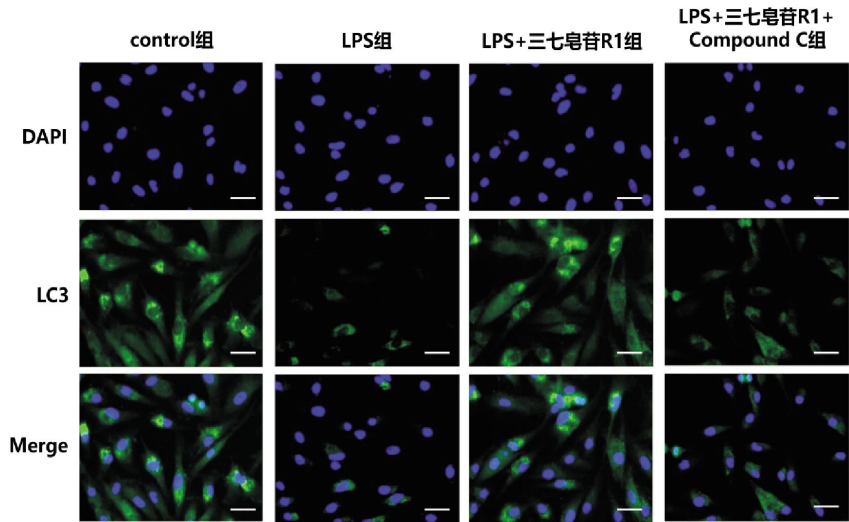


图 4 免疫荧光染色实验检测各组细胞中 LC3 蛋白的表达($\times 200$,标尺:20 μm)

Fig.4 Immunofluorescence staining assay determining the protein expression of LC3 in cells of each group

2.5 三七皂苷 R1 对牙周炎细胞中LC3 蛋白表达的影响

与 control 组比较,LPS 组细胞中 LC3 蛋白的表达水平降低($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 LC3 蛋白的表达水平升高($P<0.05$);与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 LC3 蛋白的表达水平降低($P<0.05$)。详见图 4 及表 4。

2.6 三七皂苷 R1 对牙周炎细胞自噬相关蛋白表达的影响

与 control 组比较,LPS 组细胞中 Beclin-1 蛋白表达水平及 LC3- II/ I 比值降低,而 p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 Beclin-1 蛋白表达水平及 LC3- II/ I 比值升高,而 p62 蛋白表达水平降低($P<0.05$);与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中

表 4 各组细胞中 LC3 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of LC3 protein expression in cells among various groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	LC3 相对荧光强度
control 组	1.00±0.09
LPS 组	0.17±0.02*
LPS+三七皂苷 R1 组	1.14±0.10 [#]
LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组	0.29±0.02 ^{##}

注:与 control 组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[#] $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,^{##} $P<0.05$ 。

Beclin-1 蛋白表达水平及 LC3- II/ I 比值降低,而 p62 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图 5 及表 5。

2.7 三七皂苷 R1 对牙周炎细胞中 AMPK/mTOR/ ULK1 信号通路相关蛋白表达的影响

与 control 组比较,LPS 组细胞中 p-AMPK、p-ULK1 蛋白的表达水平降低,而 p-mTOR 蛋白表达水平升高($P<0.05$);与 LPS 组比较,LPS+三七皂苷 R1 组、LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 p-AMPK、p-ULK1 蛋白表达升高,而 p-mTOR 蛋白表

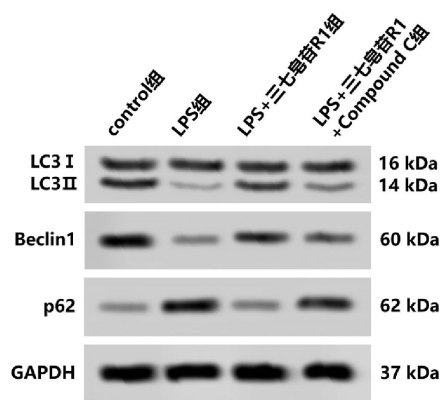


图 5 Western blot 检测各组细胞中 Beclin-1、p62、LC3- II / I 蛋白条带图

Fig.5 Western blot examining the protein expression of Beclin-1 and p62 and LC3- II / I ratio in cells of each group

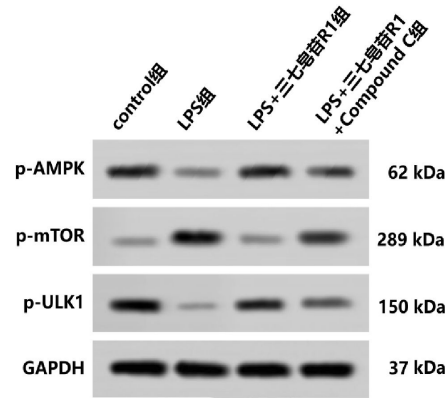


图 6 Western blot 检测各组细胞中 p-AMPK、p-mTOR、p-ULK1 蛋白条带图

Fig.6 Western blot examining the protein expression of p-AMPK, p-mTOR, and p-ULK1 in cells of each group

达水平降低($P<0.05$);与 LPS+三七皂苷 R1 组比较, LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组细胞中 p-AMPK、p-ULK1 蛋白的表达水平降低,而 p-mTOR 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图 6 及表 6。

3 讨论

牙周炎是严重影响人们生活质量的公共卫生问题,重度牙周炎会导致患者的牙齿脱落,从而影响其咀嚼功能^[1]。三七皂苷 R1 是提取于三七的混合型皂

苷,能够促进牙髓干细胞的骨分化^[16],提示三七皂苷 R1 可能对牙周炎具有较好的治疗效果。LPS 是牙周炎细胞模型的常用诱导试剂^[10]。本研究发现,三七皂苷 R1 能够有效提升牙周炎细胞的细胞活性,表明三七皂苷 R1 可能对牙周炎有较好的改善作用。

hPDLFs 凋亡是牙周炎的重要病理机制之一。Bcl-2 是抗凋亡蛋白,能通过抑制 Caspase-3 蛋白酶活化为 cleaved Caspase-3 而抑制细胞凋亡,而 Bax 却能通过破坏线粒体膜促进 Caspase-3 活化来促进

表 5 各组细胞中 Beclin-1、p62 蛋白的表达及 LC3- II / I 比值的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of the protein expression of Beclin-1 and p62 as well as LC3- II / I ratio in cells among various groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	LC3- II / I 比值	Beclin-1	p62
control 组	0.91±0.08	0.84±0.09	0.18±0.02
LPS 组	0.13±0.01*	0.16±0.02*	0.87±0.07*
LPS+三七皂苷 R1 组	0.72±0.07 [#]	0.53±0.05 [#]	0.25±0.02 [#]
LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组	0.21±0.02 ^{##}	0.29±0.03 ^{##}	0.65±0.06 ^{##}

注:与 LPS 组比较,* $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,[#] $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,^{##} $P<0.05$ 。

表 6 各组细胞中 p-AMPK、p-mTOR、p-ULK1 蛋白表达的比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of protein expression of p-AMPK, p-mTOR, and p-ULK1 in cells among various groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-AMPK	p-mTOR	p-ULK1
control 组	0.87±0.07	0.15±0.02	0.81±0.08
LPS 组	0.21±0.02*	0.93±0.08*	0.11±0.01*
LPS+三七皂苷 R1 组	0.77±0.07 [#]	0.17±0.02 [#]	0.63±0.05 [#]
LPS+三七皂苷 R1+Compound C 组	0.36±0.03 ^{##}	0.72±0.06 ^{##}	0.34±0.04 ^{##}

注:与 LPS 组比较,* $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,[#] $P<0.05$;与 LPS+三七皂苷 R1 组比较,^{##} $P<0.05$ 。

细胞凋亡^[17]。目前研究发现,药物单体能够通过抑制 LPS 诱导的 hPDLFs 凋亡而展现出潜在的抗牙周炎作用^[18]。三七皂苷 R1 也具有好的抗凋亡作用。郭伟伟等^[19]研究发现,三七皂苷 R1 能够通过激活 AMPK/Nrf-2/HO-1 信号通路抑制心肌细胞凋亡。任民等人研究发现,三七皂苷 R1 能够抑制缺氧诱导的神经细胞 PC12 凋亡^[13]。本研究发现,三七皂苷 R1 能够降低牙周炎细胞模型的凋亡率,抑制其 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白的表达,促进 Bcl-2 蛋白的表达水平,表明三七皂苷 R1 能够有效减轻牙周炎细胞凋亡。

自噬能够通过降解并回收衰老、受损的蛋白质或细胞器来维持细胞内稳态,从而抑制细胞凋亡^[20]。研究表明,通过促进细胞自噬能够抑制如结肠细胞^[21]、血管内皮细胞^[22]等正常细胞的凋亡。LC3 及 Beclin-1、p62 为自噬标志物^[23],在自噬过程中,位于细胞质的 LC3 I 会被细胞中的泛素样体系修饰和加工而形成 LC3 II,LC3 II 定位于自噬小体而促进细胞自噬,因此,LC3-II/I 蛋白表达水平比值能够一定程度上反映细胞的自噬水平。Beclin-1 能够通过促进自噬泡的形成、促进自噬蛋白定位到自噬泡等过程而促进细胞自噬。而 p62 在自噬体形成过程中被包裹进自噬体降解,因此,p62 与细胞的自噬水平呈负相关^[23]。研究发现,通过促进自噬能够减轻牙周炎大鼠牙龈组织的炎症反应^[24]。研究报道,三七皂苷 R1 对细胞自噬也有调控作用。例如,蔡婷等^[25]研究发现,三七皂苷 R1 能够通过促进血管平滑肌细胞自噬而改善动脉粥样硬化病变。HUANG 等^[26]研究发现,三七皂苷 R1 能够通过促进自噬来减轻葡萄糖导致的肾足细胞损伤。本研究发现,三七皂苷 R1 能够提升牙周炎细胞中 Beclin-1 的蛋白表达及 LC3-II/I 比值,并抑制 p62 蛋白表达,表明三七皂苷 R1 能够促进牙周炎细胞自噬。

AMPK/mTOR/ULK1 是与细胞自噬密切相关的信号通路。当细胞受到损伤后,AMPK 通过磷酸化激活来抑制 mTOR 的磷酸化,进而抑制其生物学功能。ULK1 属于 mTOR 的下游信号分子,mTOR 被抑制后能够促进 ULK1 的磷酸化激活,而 ULK1 被激活后能够通过促进自噬来减轻细胞损伤^[27]。近期研究发现,AMPK/ULK1 信号通路的激活能够通过促

进自噬而促进牙髓干细胞的成骨分化^[28],提示 AMPK/ULK1 可能是防治牙科疾病的重要信号通路。TIAN 等^[29]研究发现,三七皂苷 R1 能够通过激活 AMPK 信号通路而减轻心衰小鼠由于脂代谢紊乱导致的心脏损伤。LIU 等^[30]研究发现,三七皂苷 R1 能够通过激活 AMPK/mTOR/Nrf2 信号通路来减轻动脉粥样硬化小鼠的主动脉的炎症损伤及细胞凋亡。本研究发现,三七皂苷 R1 能够促进牙周炎细胞模型中 p-AMPK、p-ULK1 蛋白的表达水平,并抑制 p-mTOR 蛋白的表达,且 AMPK 抑制剂 Compound C 能在一定程度上抑制三七皂苷 R1 对牙周炎细胞模型的影响,表明三七皂苷 R1 能够通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路来促进牙周炎细胞自噬并抑制其凋亡。

综上,本研究发现三七皂苷 R1 能够促进 LPS 诱导的牙周炎细胞自噬并抑制其凋亡,其机制可能与激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路有关。本研究尚存在不足之处:(1)研究中未设置阳性药物组或 AMPK 激活剂组,以更加明显地突出三七皂苷 R1 的干预效果及 AMPK 信号通路介导牙周炎的分子机制;(2)未利用牙周炎动物模型进一步探究三七皂苷 R1 对牙周炎的干预效果。在后续的研究中,我们将在牙周炎动物模型中探究三七皂苷 R1 对牙周炎的干预效果及其机制,并注重阳性药物组及通路激活剂或抑制剂组的设置。

参考文献

- [1] 韩冰,王丹,郭皓,等. 伞花烃护理液在慢性牙周炎治疗预后管理中的应用[J]. 实用口腔医学杂志, 2025, 41(3): 417-419.
- [2] 王道荣,倪成励,丁鳌. 羽扇豆醇调节 RhoA/ROCK 信号通路对牙周炎大鼠牙周组织损伤的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2025, 41(3): 321-327.
- [3] 邱枫,杜宇,罗惠冰,等.SOCS6 通过 JAK2/STAT3 信号通路对人牙周膜成纤维细胞炎症及凋亡的影响[J]. 口腔医学研究, 2023, 39(9): 815-820.
- [4] ZHENG T, LU F, WU P, et al. Ferroptosis and cuproptosis in periodontitis: recent biological insights and therapeutic advances[J]. Frontiers in Immunology, 2025, 16: 1526961.
- [5] 贾鸿杰. 荜茇通过 NF- κ B 通路调控自噬治疗牙周炎的机制研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2024.
- [6] MO K, WANG Y, LU C, et al. Insight into the role of macrophages in periodontitis restoration and development[J]. Virulence, 2024, 15(1): 2427234.
- [7] 辛禧瑞. 褪黑素碳点通过 Nrf2/HO-1 轴改善牙周组织氧化应激

- 损伤的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2024.
- [8] 陈 丹, 单连良, 张婷婷, 等. 槲子苷调控 AMPK/mTOR/ULK1 通路对肺癌细胞增殖、凋亡和自噬的影响[J/OL]. 中国比较医学杂志, 1–10[2025-09-03]. <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20250808.1724.006>.
- [9] ZHU L, WANG J H, WU Z P, et al. AFF4 regulates osteogenic potential of human periodontal ligament stem cells via mTOR–ULK1–autophagy axis[J]. *Cell Proliferation*, 2024, 57(2): e13546.
- [10] 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.
- [11] 韩睿琪. 三七皂苷 R1 对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化影响的机制探究[D]. 济南: 山东大学, 2023.
- [12] 朱 婷, 冯 玉, 殷乐章, 等. 三七皂苷 R1 对异丙肾上腺素诱导的 H9c2 心肌细胞肥大的保护作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 1–7.
- [13] 任 民, 徐 革, 彭 伟, 等. 三七皂苷 R1 对缺氧诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(12): 1657–1660.
- [14] 陆西星, 施正梅, 祁 麟, 等. 美洲大蠊提取物对脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞炎症的抑制作用[J]. 中成药, 2023, 45(4): 1314–1319.
- [15] PEYTON K J, YU Y J, YATES B, et al. Compound C inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration in an AMP-activated protein kinase-independent fashion[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2011, 338(2): 476–484.
- [16] YANG J J, WENG X B, CHEN C H, et al. Notoginsenoside R1 promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells via MAPK pathway[J]. *Discovery Medicine*, 2025, 37(194): 486–495.
- [17] 李雯雯, 王瀚生, 宗师森, 等. 铁死亡抑制剂对大鼠视网膜光化学损伤感光细胞凋亡和 Notch 通路的影响[J]. 眼科新进展, 2025, 45(6): 429–434.
- [18] 杨 艳, 张 楠, 李 娜. 异欧前胡素对脂多糖诱导牙周膜成纤维细胞损伤的调节作用机制[J]. 遵义医科大学学报, 2025, 48(4): 332–338.
- [19] 郭伟伟, 张晓鹏, 李 霞, 等. 三七皂苷 R1 调控 AMPK/Nrf-2/HO-1 信号通路缓解冠心病大鼠心肌损伤的研究[J]. 中国现代应用药理学, 2021, 38(1): 36–41.
- [20] LI S, XU B, LUO Y, et al. Autophagy and Apoptosis in Rabies Virus Replication[J]. *Cells*, 2024, 13(2): 183.
- [21] 占海兵, 吴 婷, 梁宁娟, 等. 姜黄素通过调控 ERK1/2–mTOR 信号通路介导的自噬与凋亡抑制小鼠溃疡性结肠炎[J]. 天然产物研究与开发, 2025, 37(7): 1220–1227.
- [22] 武文印, 武禹佳, 李 艳, 等. 隐丹参酮调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对高糖诱导的血管内皮细胞自噬和凋亡的影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(10): 2454–2459.
- [23] LI B, WANG L L, HE H. Autophagy in orthodontic tooth movement: advances, challenges, and future perspectives[J]. *Molecular Medicine*, 2025, 31(1): 245.
- [24] 王亚男. 骨化三醇通过促进自噬抑制伴 2 型糖尿病牙周炎大鼠牙龈组织炎症反应[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- [25] 蔡 婷. 三七皂苷 R1 通过 SIRT1/AMPK 调控 VSMC 自噬改善动脉粥样硬化的机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2023.
- [26] HUANG G D, ZOU B Y, LV J Z, et al. Notoginsenoside R1 attenuates glucose-induced podocyte injury via the inhibition of apoptosis and the activation of autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 39(3): 559–568.
- [27] 王 茸, 李家正, 孔庆杰, 等. 基于 AMPK/mTOR/ULK1 通路探讨醒脑开窍针刺法治疗脑缺血再灌注损伤的机制[J]. 针刺研究, 2025, 50(7): 782–789.
- [28] LIU L, CHU Z Z, HAN X, et al. Creatine promotes osteogenic differentiation of dental pulp stem cells via the AMPK–ULK1–autophagy axis[J]. *Connective Tissue Research*, 2025, 66(2): 73–86.
- [29] TIAN X, CHEN X, JIANG Q Q, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates cardiac lipotoxicity through AMPK signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 864326.
- [30] LIU X Y, XU Y L, CHENG S B, et al. Geniposide combined with notoginsenoside R1 attenuates inflammation and apoptosis in atherosclerosis via the AMPK/mTOR/Nrf2 signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 687394.

(本文编辑 苏 维)