

丹参提取物对人牙周膜成纤维细胞的干预效果及其对 CTGF、ALP 水平的影响

王双双, 高毅*, 李敏, 穆春晖, 李立芳(河北省中医院口腔科, 石家庄 050000)

摘要: 目的 研究丹参提取物对人牙周膜成纤维细胞结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平的影响。方法 取河北省中医院口腔科因正畸治疗拔除的第一前磨牙 2 颗, 牙齿拔除后即放入含有青霉素和链霉素的无菌 α -MEM 培养基中, 分离培养人牙周膜成纤维细胞, 取第 5 代人牙周膜成纤维细胞用于后续试验, 分为空白组、丹参提取物低浓度组、丹参提取物高浓度组, 空白组加入 100 μ L 的基础培养基, 丹参提取物低浓度组加入 1 μ mol·L⁻¹ 丹参提取物溶液, 丹参提取物高浓度组加入 2 μ mol·L⁻¹ 丹参提取物溶液。测定细胞增殖、凋亡、成骨分化能力及磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun amino terminal kinase, p-JNK)、CTGF、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、成骨特异性转录因子(osteogenic specific transcription factor, Runx-2)、ALP 表达量。结果 丹参提取物高浓度组 24, 48, 72 h 细胞增殖率、ALP 活性均高于丹参提取物低浓度组($P < 0.05$)。丹参提取物高浓度组 24, 48, 72 h 细胞凋亡率均低于丹参提取物低浓度组($P < 0.05$)。丹参提取物高浓度组 p-JNK、CTGF、BMP-2、Runx-2、ALP 表达量均高于丹参提取物低浓度组($P < 0.05$)。结论 丹参提取物通过作用于 JNK 通路, 上调 CTGF 表达, 促进人牙周膜成纤维细胞增殖, 通过调控 BMP-2、Runx-2 表达, 增加 ALP 活性, 促进人牙周膜成纤维细胞成骨分化, 且具有一定浓度依赖性。

关键词: 丹参提取物; 人牙周膜成纤维细胞; 结缔组织生长因子; 碱性磷酸酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)08-0938-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.08.007

引用本文: 王双双, 高毅, 李敏, 等. 丹参提取物对人牙周膜成纤维细胞的干预效果及其对 CTGF、ALP 水平的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(8): 938-943.

Intervention Effects of *Salvia Miltiorrhiza* Extract on Human Periodontal Ligament Fibroblasts and Its Effect on CTGF and ALP Levels

WANG Shuangshuang, GAO Yi*, LI Min, MU Chunhui, LI Lifang(Department of Stomatology, Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of *Salvia miltiorrhiza* extract on the levels of connective tissue growth factor (CTGF) and alkaline phosphatase(ALP) in human periodontal ligament fibroblasts. **METHODS** Two first premolars extracted by orthodontic treatment in Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine were put into aseptic α -MEM medium containing penicillin and streptomycin immediately after tooth extraction. Human periodontal ligament fibroblasts were isolated and cultured. The fifth generation of human periodontal ligament fibroblasts were used for follow-up test, which were divided into blank group, low and high concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract. The blank group was added with 100 μ L basic medium, low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract was added to 1 μ mol·L⁻¹ *Salvia miltiorrhiza* extract solution, and 2 μ mol·L⁻¹ *Salvia miltiorrhiza* extract solution was added to high concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract. Cell proliferation, apoptosis, osteogenic differentiation and expression of phosphorylated c-Jun amino terminal kinase(p-JNK), CTGF, bone morphogenetic protein-2(BMP-2), osteogenic specific transcription factor(Runx-2) and ALP were measured. **RESULTS** The proliferation rate and ALP activity of high concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract in 24, 48, 72 h were higher than that of low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract($P < 0.05$). The apoptosis rate of high concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract in 24, 48, 72 h was lower than that of low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract($P < 0.05$). The expression levels of p-JNK, CTGF, BMP-2, Runx-2 and ALP in the high concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract were all higher than those in the low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract($P < 0.05$). **CONCLUSION** *Salvia miltiorrhiza* extract by acting on JNK pathway, raise the CTGF expression, promote the periodontal ligament fibroblasts proliferation, through the regulation of BMP-2, Runx-2 expression, increase ALP activity, promote the periodontal ligament fibroblasts

基金项目: 河北省科技计划项目(13277730D)

作者简介: 王双双, 女, 硕士, 主治医师 Tel: 15127100220 E-mail: wepx24@163.com *通信作者: 高毅, 女, 博士, 主任医师 Tel: 13081033677 E-mail: wepx24@163.com

osteogenesis differentiation, and has a certain concentration dependence.

KEYWORDS: *Salvia miltiorrhiza* extract; human periodontal fibroblasts; connective tissue growth factor; alkaline phosphatase

虽然目前中国口腔保健工作、口腔治疗技术不断普及和发展,但牙周疾病的发病率仍较高,严重影响着患者的日常生活^[1]。与牙周膜相关的细胞包括成骨细胞、破骨细胞、成纤维细胞、成牙骨质细胞等,其中成纤维细胞属于一种较为重要的细胞,在牙周组织再生、病变、修复过程中具有重要的意义^[2]。研究发现^[3],当人牙周膜成纤维细胞显著减少时,可导致成牙松动、移位,严重者可导致成牙脱落,因此促进人牙周膜成纤维细胞增殖和诱导其成骨分化对牙周组织的修复具有重要的意义。丹参是一种唇形科植物,又被称为紫丹参、赤参,目前已经证实,丹参具有促进成骨样细胞增殖、分化的作用^[4]。本研究使用丹参提取物对人牙周膜成纤维细胞进行干预,分析其干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞:取河北省中医院口腔科因正畸治疗拔除的第一前磨牙 2 颗,牙齿拔除后即刻放入含有青霉素和链霉素的无菌 α -MEM 培养基中,置于 4 °C 保存,当天使用,在超净台中刮取离体牙根中 1/3 部分牙周膜组织,避免刮除根尖及釉牙骨质界处组织,使用酶消化加组织块法进行原代培养。待细胞生长至培养皿底壁 80% 时,按 1:3 进行细胞传代,每 2~3 d 更换培养液。取第 5 代人牙周膜成纤维细胞用于以下实验。本研究获得河北省中医院伦理委员会批准(批准号:PKUSSIRB-20197105)。

试剂:丹参提取物(南阳理工学院方药研究所提供,系经水提、大孔吸附树脂纯化所得,纯化后总酚酸的含量为 63.7%,制备 2 种浓度,即为 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;二甲基亚砜溶液(上海钰博生物科技有限公司,货号:YB0145); α -MEM 培养基(上海沪震实业有限公司,货号: HSH30265.01B); CCK-8(艾美捷科技有限公司,货号:KTC011001);磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun amino terminal kinase, p-JNK)抗体(厦门慧嘉生物科技有限公司,货号: F48652-0.4ML);结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)抗体(货号: FNab02053)、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)抗体(货号: FNab00917)、成骨特异性转录因子(osteogenic specific transcription factor, Runx-2)抗体(货号:

FNab07536)均购自武汉菲恩生物科技有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)抗体(厦门研科生物技术有限公司,货号: YKA-AF1121a)。

仪器:Varioskan LUX 多功能酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];Cyto FLEX 型流式细胞仪(贝克曼库尔特有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将所分离的第 5 代人牙周膜成纤维细胞行复温处理,在 5% CO_2 、30 °C 的细胞培养箱中培养 24 h 后,当细胞生长至 90% 进行传代,使用 0.25% 胰蛋白酶消化,在显微镜下观察人牙周膜成纤维细胞形态变化,消化完全标志:细胞出现缩小、变圆,且细胞与细胞之间存在明显的间隙,之后使用 α -MEM 培养基进行培养和消化(内含 10% 胎牛血清),使用枪头行细胞吹打、消化后将其转移至 10 mL 离心管中,以 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心处理 5 min,去除上清液加入至 5 mL 培养基中进行重悬处理,之后将细胞接种于 3 个 T75 培养瓶中,在恒温 CO_2 培养箱中进行培养,次日换液,待细胞融合率达到 80%~90% 之时进行传代。

1.2.2 分组及丹参提取物干预 试验分为空白组、丹参提取物低浓度组、丹参提取物高浓度组,空白组加入 100 μL 的基础培养基,丹参提取物低浓度组加入 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹参提取物溶液,丹参提取物高浓度组加入 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丹参提取物溶液。

1.2.3 人牙周膜成纤维细胞增殖情况检测 采用 CCK-8 法检测人牙周膜成纤维细胞增殖情况,将 10 μL CCK-8 加入至各组中,37 °C 进行孵育,孵育处理 2 h 后使用酶标仪对吸光度 OD 值进行测定,以 490 nm 作为参考波长。细胞增殖率=(测定管 OD 值/标准管 OD 值) \times 100%。

1.2.4 人牙周膜成纤维细胞凋亡情况检测 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,在各组细胞培养 45 h 后行胰蛋白酶消化处理,之后收集细胞以转速 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心处理 5 min,使用磷酸缓冲盐溶液洗涤后制备为 1 mL 的细胞混悬液,加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)、Annexin-VEGFP,在温度为 4 °C 的环境下进行避光孵育,孵育 0.5 h 后使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 人牙周膜成纤维细胞成骨分化能力检测 以 ALP 活性评价细胞成骨分化能力,在各组细胞

培养 7 d 后,轻柔刮脱细胞,以 $800 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心处理 5 min,使用超声波对细胞进行裂解处理,裂解处理后去细胞裂解液 $30 \mu\text{L}$,使用酶标仪对吸光度 OD 值进行测定,以 520 nm 作为参考波长。各组 ALP 值=[测定管 OD 值/标准管 OD 值]×标准管分含量/测定样品总蛋白含量,其中 ALP 相对活性为各组 ALP 值/空白组 ALP 值。

1.2.6 Western blotting 法 采用 Western blotting 法检测细胞中 p-JNK、CTGF、BMP-2、Runx-2、ALP 表达量。在所有细胞培养 7 d 后,提取细胞总蛋白,行蛋白定量分析后,做电泳分离后将细胞转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉在室温下孵育 2 h 后将一抗工作液后在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境中过夜保存。之后行洗涤处理后加入二抗工作液,在温床中孵育 1 h 后再次洗涤,加入发光液 ECL,曝光 2~3 次,取重叠值。使用软件分析蛋白条带灰度值。内参蛋白设置为 GAPDH。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 21.0 软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用方差齐性检验,2 组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参提取物对细胞不同时间点增殖的影响

丹参提取物低、高浓度组 24, 48, 72 h 细胞增殖率均高于空白组($P < 0.05$);丹参提取物高浓度组 24, 48, 72 h 细胞增殖率均高于丹参提取物低浓度组($P < 0.05$),结果见图 1 和表 1。

2.2 丹参提取物对细胞不同时间点凋亡的影响

丹参提取物低、高浓度组 24, 48, 72 h 细胞凋亡率均低于空白组($P < 0.05$);丹参提取物高浓度组 24, 48, 72 h 细胞凋亡率均低于丹参提取物低浓度组($P < 0.05$),结果见表 2,图 2~4。

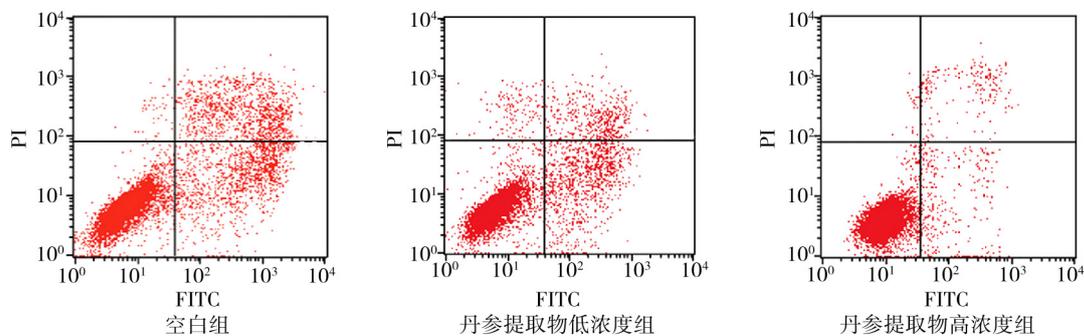


图 2 3 组 24 h 细胞凋亡图
Fig. 2 24 h apoptotic map of three groups

表 1 丹参提取物对细胞不同时间点增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Tab. 1 Effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on cell proliferation at different time points($\bar{x} \pm s, n=5$) %

组别	细胞增殖率		
	24 h	48 h	72 h
空白组	10.23±1.00	10.36±1.02	11.25±1.26
丹参提取物低浓度组	23.25±2.19 ¹⁾	50.89±3.46 ¹⁾	60.13±3.45 ¹⁾
丹参提取物高浓度组	45.26±5.34 ¹⁾²⁾	66.35±7.65 ¹⁾²⁾	78.65±6.89 ¹⁾²⁾

注:与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与丹参提取物低浓度组相比,²⁾ $P < 0.05$ 。
Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract, ²⁾ $P < 0.05$ 。

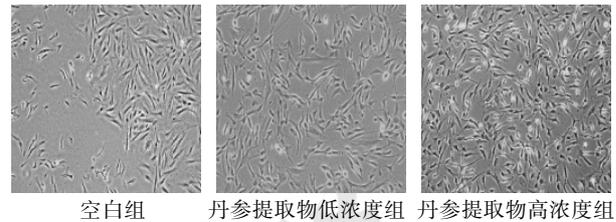


图 1 3 组细胞 72 h 增殖图(200×)
Fig. 1 72 h proliferation of three groups of cells(200×)

表 2 丹参提取物对细胞不同时间点凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)
Tab. 2 Effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on cell apoptosis at different time points($\bar{x} \pm s, n=5$) %

组别	细胞凋亡率		
	24 h	48 h	72 h
空白组	10.25±1.03	11.27±1.29	12.38±1.62
丹参提取物低浓度组	9.65±0.10 ¹⁾	7.63±0.09 ¹⁾	6.14±0.10 ¹⁾
丹参提取物高浓度组	8.62±0.35 ¹⁾²⁾	6.02±0.10 ¹⁾²⁾	5.62±0.24 ¹⁾²⁾

注:与空白组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与丹参提取物低浓度组相比,²⁾ $P < 0.05$ 。
Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract, ²⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 丹参提取物对细胞不同时间点成骨分化能力的影响

丹参提取物低、高浓度组 24, 48, 72 h ALP 活性均高于空白组($P < 0.05$);丹参提取物高浓度组 24, 48, 72 h ALP 活性均高于丹参提取物低浓度组($P < 0.05$),结果见表 3。

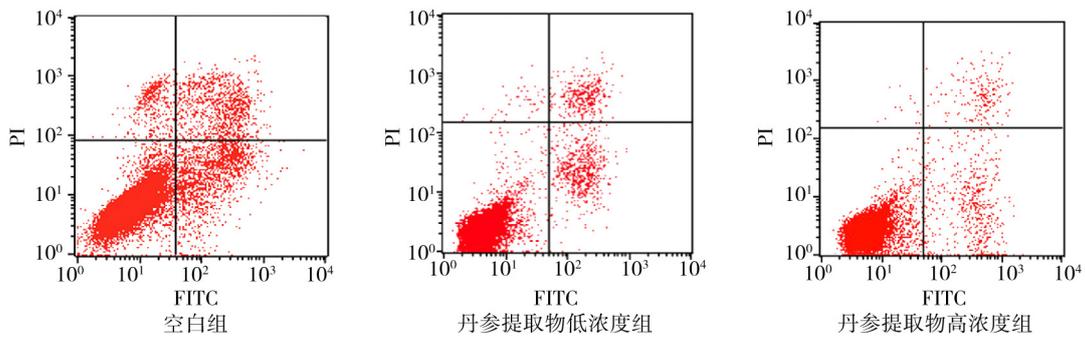


图3 3组 48h 细胞凋亡图
Fig. 3 48 h apoptotic map of three groups

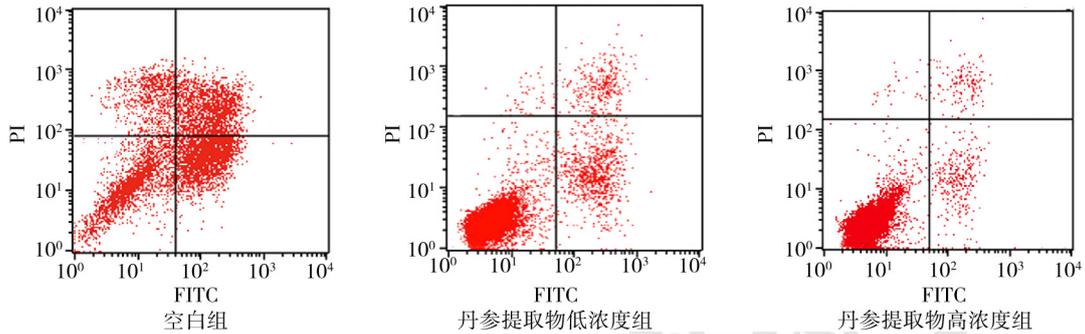


图4 3组 72 h 细胞凋亡图
Fig. 4 72 h apoptotic map of three groups

表3 丹参提取物对细胞不同时间点成骨分化能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 3 Effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on osteogenic differentiation ability of cells at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	成骨分化能力(ALP 活性)		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0.03±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01
丹参提取物低浓度组	0.08±0.02 ¹⁾	0.22±0.02 ¹⁾	0.29±0.03 ¹⁾
丹参提取物高浓度组	0.13±0.01 ¹⁾²⁾	0.19±0.01 ¹⁾²⁾	0.39±0.02 ¹⁾²⁾

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与丹参提取物低浓度组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract, ²⁾ $P<0.05$.

2.4 丹参提取物影响细胞增殖、成骨分化的机制

丹参提取物低、高浓度组 p-JNK、CTGF、BMP-2、Runx-2、ALP 表达量均高于空白组 ($P<0.05$); 丹参提取物高浓度组 p-JNK、CTGF、

BMP-2、Runx-2、ALP 表达量均高于丹参提取物低浓度组 ($P<0.05$), 结果见表 4 和图 5。

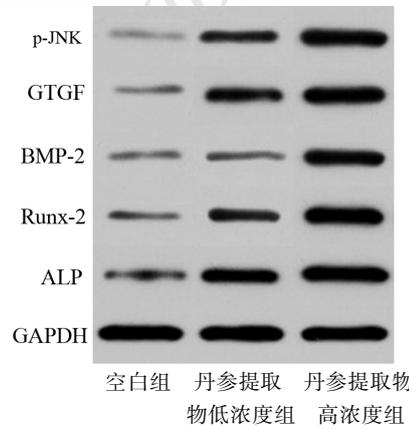


图5 p-JNK、CTGF、BMP-2、Runx-2、ALP 蛋白 Western blotting 图

Fig. 5 Western blotting diagram of p-JNK, CTGF, BMP-2, Runx-2, ALP protein

表4 丹参提取物影响细胞增殖、成骨分化的机制 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 4 Mechanism of *Salvia miltiorrhiza* extract on cell proliferation and osteogenic differentiation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	p-JNK	CTGF	BMP-2	Runx-2	ALP
空白组	0.53±0.03	0.43±0.05	0.23±0.03	0.25±0.05	0.67±0.09
丹参提取物低浓度组	0.76±0.05 ¹⁾	0.85±0.09 ¹⁾	0.62±0.06 ¹⁾	0.73±0.02 ¹⁾	1.00±0.10 ¹⁾
丹参提取物高浓度组	0.98±0.03 ¹⁾²⁾	1.02±0.10 ¹⁾²⁾	0.89±0.10 ¹⁾²⁾	1.12±0.09 ¹⁾²⁾	1.38±0.21 ¹⁾²⁾

注: 与空白组相比, ¹⁾ $P<0.05$; 与丹参提取物低浓度组相比, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with blank group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with low concentration group of *Salvia miltiorrhiza* extract, ²⁾ $P<0.05$.

3 讨论

牙周膜属于一种较为重要的牙周支持组织组成成分,其主体细胞为人牙周膜成纤维细胞,主要对牙周支持组织的病理变化、损伤修复以及组织再生等过程进行调控,牙周膜成纤维细胞增殖、分化为牙周组织再生的关键^[5]。丹参是一种唇形科植物,丹参微寒、味苦、入心,具有活血通经、祛瘀止痛、滋补、清心除烦等作用^[6]。研究发现^[7-8],丹参的主要活性成分包括脂溶性的二萜类化合物、水溶性的酚酸类化合物,包括丹参素、丹参酮、丹酚酸、原儿茶醛等。目前临床上已有研究证实,丹参用于心血管疾病治疗有效。临床研究试验发现^[9-10],在体内丹参可促进成纤维细胞、成骨细胞分裂增殖,促使骨基质、钙盐分泌,经丹参干预后,成骨细胞形态表现为不规则变化,表现为旺盛的合成能力,在修复软骨损伤、促进骨折愈合中具有重要的意义。体外研究发现^[11],丹参可增强碱性磷酸酶活性,促进基质分泌,增加成纤维细胞的成骨能力,促进人骨成纤维细胞增殖、分化。

临床研究发现 CTGF 与细胞创伤修复相关,可由多种细胞分泌并表达,其具有较为广泛的生物学作用,包括促进血管形成、合成胶原、促进细胞增殖、诱导细胞凋亡、刺激细胞迁移、介导细胞黏附以及促进骨骼发育、软骨增生等^[12]。促分裂原活化蛋白激酶 (mitogenactivatedprotein-kinase, MAPK) 是一类广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 在哺乳动物细胞中存在 14 条信号通路,经典的信号通路有 JNK1/2/3, p38, ERK1/2 以及 ERK5, 其中以 JNK 通路研究较为深入^[13]。JNK 信号通路可以将细胞外信号转送到细胞内,参与机体内许多生理及病理反应, JNK 可介导细胞自噬,自噬相关疾病如肿瘤、糖尿病等与 JNK 信号通路调控失衡关系密切^[14]。JNK 是一种从活化的放线菌酮中分离出来的 p54 微管相关蛋白激酶,位于 c-Jun 氨基末端活化区域。JNK 为可磷酸化 c-Jun 的一种激酶,激活的 JNK 可从细胞质转位到细胞核,使 c-Jun 氨基末端的丝氨酸第 63 及 73 位点双磷酸化,进而提高活化蛋白 1 的转录活性,调控与 JNK 相关的基因表达,进而调控 CTGF 的表达^[15]。本研究分析丹参提取物对人牙周膜成纤维细胞增殖、凋亡的影响,结果显示,经丹参提取物干预的细胞增殖能力显著增强,凋亡显著

得到抑制,且呈剂量依赖,进一步分析丹参提取物调控细胞增殖、凋亡的机制,提取细胞总蛋白,结果发现,增殖、凋亡能力越强的细胞 p-JNK、CTGF 表达量越高,此结果提示着丹参提取物可能通过作用于 JNK 信号通路,促进 CTGF 表达,来诱导人牙周膜成纤维细胞增殖,抑制凋亡。

ALP 属于一种细胞成骨的标志性蛋白,在成骨过程中由细胞所分泌的非胶原成分,在人体各器官组织中广泛分布,包括肝、肾、骨骼、肠等^[16]。有研究认为^[17],ALP 可参与骨组织的形成、再生以及代谢等过程,可对上述过程进行调节,可反映出成骨能力、细胞分化活跃性,ALP 活性越高说明组织向细胞成骨方向分化能力越强,反之,ALP 活性越低说明组织向细胞成骨方向分化能力越弱。临床研究发现^[18],ALP 为人牙周膜成纤维细胞矿化和分化的标志性酶,在人牙周膜成纤维细胞分化和成骨样细胞转化过程中具有关键的调节作用。研究认为^[19-20],细胞成骨分化能力与 BMP-2、Runx-2 相关,BMP-2 通过作用于 Smads 信号转导通路对成骨相关蛋白进行干预,调节其翻译能力发挥成骨作用,属于一种促进骨形成和诱导分化的细胞外信号。Runx-2 属于 BMP-2 下游靶基因,通过上调 Runx-2 表达可促进干细胞向成骨细胞分化。本研究分析丹参提取物对人牙周膜成纤维细胞成骨分化能力的影响,结果显示,经丹参提取物干预的细胞成骨分化能力显著增强,且呈剂量依赖,进一步分析丹参提取物调控细胞成骨分化能力的机制,提取细胞总蛋白,结果发现,细胞成骨能力越强 BMP-2、Runx-2 表达量越高,此结果提示着丹参提取物可能经作用于 JNK 信号通路,促进 CTGF 表达,进而促进 BMP-2、Runx-2 表达,增加 ALP 活性,来诱导人牙周膜成纤维细胞成骨分化。

本研究显示,丹参提取物通过作用于 JNK 通路,促进人牙周膜成纤维细胞成骨分化,其在牙周疾病的治疗中具有一定的潜在价值,希望本研究能对临床牙周病治疗的临床研究提供新的实验资料,为牙周病的防治开辟新思路。

综上所述,丹参提取物通过作用于 JNK 通路,上调 CTGF 表达,促进人牙周膜成纤维细胞增殖,通过调控 BMP-2、Runx-2 表达,增加 ALP 活性,促进人牙周膜成纤维细胞成骨分化,且具有一定浓度依赖性。

REFERENCES

- [1] PAPADOPOULOU A, ILIADI A, ELIADES T, et al. Early responses of human periodontal ligament fibroblasts to cyclic and static mechanical stretching[J]. *Eur J Orthod*, 2017, 39(3): 258-263.
- [2] LIU Y Q, WANG Y Y, SHI L. Observation of the morphology of living human periodontal ligament cells with atomic force microscope[J]. *Chin J Conserv Dent(牙体牙髓牙周病学杂志)*, 2018, 28(9): 511-514, 524.
- [3] SHEN H J, LI L J, KANG N. Culture and identification of human periodontal ligament fibroblasts[J]. *J Guangxi Med Univ(广西医科大学学报)*, 2015, 32(6): 872-875.
- [4] ZHANG M, YI Z H, YANG H M, et al. Informatics-based prediction of molecular networks targeting active ingredients in Danshen(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)[J]. *J Zhengzhou Univ: Med Sci(郑州大学学报: 医学版)*, 2019, 54(6): 798-801.
- [5] WU X, ZHANG G, FENG X Q, et al. Transcriptome analysis of human periodontal ligament fibroblasts exposed to *Porphyromonas gingivalis* LPS[J]. *Arch Oral Biol*, 2020(110): 104632.
- [6] WU Y Q, YE J M, FAN T Y, et al. Effect of *Salvia miltiorrhiza* extract on neuroimmunization of hypertensive heart disease rats[J]. *Chin J Immunol(中国免疫学杂志)*, 2018, 34(12): 1826-1831.
- [7] WANG W J, GONG Z D, HAN B L. Pharmacokinetics of salvianolic acid B in the extract of *Salvia miltiorrhiza* and Yixinshu tablets in rats[J]. *J Int Pharm Res(国际药理学研究杂志)*, 2019, 46(5): 382-386.
- [8] YU C M, ZHAO B, YAN H W. *Salvia miltiorrhiza* extract protects H9C2 cardiomyocytes by up-regulation of heme oxygenase-1[J]. *Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究)*, 2018, 22(24): 3888-3892.
- [9] WANG C L, CHEN A, QIN Y, et al. Research progress on anti-atherosclerosis effect and action mechanism of *Salvia miltiorrhiza* extracts[J]. *Pract J Cardiac Cereb Pneumal Vasc Dis(实用心脑血管肺血管病杂志)*, 2019, 27(6): 8-10.
- [10] CUI C, LIU X P, YANG Y Z. The research progress in the promoting effects of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and its extracts on cell proliferation[J]. *Med Becapitul(医学综述)*, 2015, 21(24): 4528-4531.
- [11] LI Y, ZHANG Y H, WANG Y F, et al. *Salvia miltiorrhiza* extract promote bone marrow mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation[J]. *Chin J Osteoporos(中国骨质疏松杂志)*, 2017, 23(8): 1030-1033.
- [12] YUDA A, MAEDA H, FUJII S, et al. Effect of CTGF/CCN2 on osteo/cementoblastic and fibroblastic differentiation of a human periodontal ligament stem/progenitor cell line[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(1): 150-159.
- [13] 李凯, 曹让娟, 朱志华. JNK 信号通路的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2015(19): 1596-1598.
- [14] QIN F, ZHANG Z B. Progress in studies on JNK signaling pathway and autophagy[J]. *J Central South Univ: Med Sci(中南大学学报: 医学版)*, 2015, 40(9): 1035-1038.
- [15] ZHANG Y, JIANG C Q, YU X J. Cyclic tensile stress effects on the expression of connective tissue growth factor in human periodontal ligament fibroblasts[J]. *Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究)*, 2015, 19(33): 5284-5288.
- [16] SYMMANK J, ZIMMERMANN S, GOLDSCHMITT J, et al. Mechanically-induced GDF15 secretion by periodontal ligament fibroblasts regulates osteogenic transcription[J]. *Sci Rep*. 2019, 9(1): 11516.
- [17] LIN Y D, ZHAO B, YIN K. Effect of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells cultured *in vitro*[J]. *Chin J Tissue Eng Res(中国组织工程研究)*, 2014, 18(20): 3184-3189.
- [18] KOOK S H, LEE D, CHO E S, et al. Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling inhibits H₂O₂-induced decreases in proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblasts[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 411(1/2): 83-94.
- [19] LI S, HU M L. Mechanism of regulation of BMP-2-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells by MiR-133a[J]. *J Nanchang Univ: Med Sci(南昌大学学报: 医学版)*, 2018, 58(5): 21-25, 39.
- [20] WANG J L, ZHANG Z H, HUANG H X, et al. The effects of XCT790 on the proliferation and expression of LRP5, Runx2, BMP2 and OPN of Sost silencing osteoblasts[J]. *Guangdong Med J(广东医学)*, 2018, 39(11): 1607-1611.

收稿日期: 2020-02-14
(本文责编: 李艳芳)