

DOI:10.13350/j.cjpb.250410

• 论著 •

miR-17-5p 调控 TXNIP/NLRP3 信号通路对牙龈卟啉单胞菌 LPS 诱导的人牙龈成纤维细胞炎症反应的影响

王欣¹, 束传亮^{2*}

(1. 烟台业达医院口腔科, 山东烟台 264006; 2. 青岛大学附属青岛市海慈医院(青岛市中医医院)口腔科)

【摘要】 目的 探讨微小 RNA-17-5p(miR-17-5p)调控硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)/NLRP3 信号通路对牙龈卟啉单胞菌脂多糖(Pg-LPS)诱导的人牙龈成纤维细胞(PDLF)炎症反应的影响。方法 以 PDLF 细胞为研究对象,随机分为 Control 组(正常培养)、Pg-LPS 组(用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Pg-LPS 培养细胞 24 h)、NC-mimics 组(在 Pg-LPS 诱导的基础上转染 NC-mimics)、miR-17-5p-mimics 组(在 Pg-LPS 诱导的基础上转染 miR-17-5p-mimics)、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组(在 Pg-LPS 诱导的基础上转染 miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC)、miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组(在 Pg-LPS 诱导的基础上转染 miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP)。qRT-PCR 法检测各组 PDLF 细胞中 miR-17-5p、TXNIP、NLRP3 mRNA 的表达;MTT 法检测 PDLF 细胞增殖;流式细胞仪检测 PDLF 细胞的凋亡;ELISA 试剂盒检测 PDLF 细胞中 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 的表达;WB 检测 PDLF 细胞中 TXNIP、NLRP3 蛋白的表达;双荧光素酶报告基因实验检验 miR-17-5p 与 TXNIP 之间的交互。结果 Pg-LPS 组 A_{490} 值、miR-17-5p 低于 Control 组,凋亡率、TXNIP mRNA 和蛋白、NLRP3 mRNA 和蛋白、MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达高于 Control 组($P < 0.05$);miR-17-5p-mimics 组 A_{490} 值、miR-17-5p 高于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组,凋亡率、TXNIP mRNA 和蛋白、NLRP3 mRNA 和蛋白、MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达低于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组($P < 0.05$);与 miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组相比,miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组 A_{490} 值降低,凋亡率、TXNIP mRNA 和蛋白、NLRP3 mRNA 和蛋白、MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达升高($P < 0.05$);miR-17-5p 可以靶向负调控。结论 miR-17-5p 可以抑制 TXNIP/NLRP3 信号通路,抑制 Pg-LPS 诱导的 PDLF 细胞的炎症反应。

【关键词】 微小 RNA-17-5p;单磷酸腺苷活化蛋白激酶;硫氧还蛋白相互作用蛋白;NLRP3;牙龈卟啉单胞菌;脂多糖;人牙龈成纤维细胞;炎症反应

【文献标识码】 A**【文章编号】** 1673-5234(2025)04-0460-06

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Apr.;20(04):460-465.]

The effect of miR-17-5p on *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced inflammatory response of human gingival fibroblasts by regulating the TXNIP/NLRP3 signaling pathwayWANG Xin¹, SHU Chuanliang² (1. Department of Stomatology, Yantai Yeda Hospital, Yantai 264006, Shandong, China; 2. Department of Stomatology, Qingdao Haici Hospital Affiliated to Qingdao University)*

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of microRNA-17-5p (miR-17-5p) on the inflammatory response of human periodontal ligament fibroblasts (PDLF) induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (Pg-LPS) by regulating the thioredoxin interacting protein (TXNIP)/NLRP3 signaling pathway. **Methods** Taking PDLF cells as the study object, They were randomly divided into Control group (normal culture), Pg-LPS group (cultured with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pg-LPS for 24 hours), NC-mimics group (transfected with NC-mimics on the basis of Pg-LPS induction), miR-17-5p-mimics group (transfected with miR-17-5p-mimics on the basis of Pg-LPS induction), miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC group (transfected with miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC on the basis of Pg-LPS induction), and miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP group (transfected with miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP on the basis of Pg-LPS induction). qRT-PCR was used to detect the expression of miR-17-5p, TXNIP, and NLRP3 mRNA of PDLF cells in each group. MTT assay was used to detect PDLF cell proliferation. Flow cytometry was used to detect apoptosis of PDLF cells. ELISA kit was used to detect the expression of MMP-1, MMP-9, IL-6, and IL-8 in PDLF cells. WB was used to detect the expression of TXNIP and NLRP3 proteins in PDLF cells. The dual luciferase reporter gene assay was used to examine the interaction between miR-17-5p and TXNIP. **Results** The A_{490} value and miR-17-5p in the Pg-LPS group were lower than those in

* **【通信作者】** 束传亮, E-mail: qddentistscl@126.com**【作者简介】** 王欣(1983-),男,山东烟台人,本科,主治医师,从事儿童常见病、多发病的诊治,尤其是儿童错颌畸形的预防、早期干预、治疗方向研究。E-mail: wx527790@126.com

the Control group, while the apoptosis rate, TXNIP mRNA and protein, NLRP3 mRNA and protein, MMP-1, MMP-9, IL-6, and IL-8 expression were higher than those in the Control group ($P < 0.05$). The A_{490} value and miR-17-5p in the miR-17-5p-mimics group were higher than those in the Pg-LPS group and NC-mimics group, while the apoptosis rate, TXNIP mRNA and protein, NLRP3 mRNA and protein, MMP-1, MMP-9, IL-6, and IL-8 expression were lower than those in the Pg-LPS group and NC-mimics group ($P < 0.05$). Compared with the miR-17-5p-mimics group and the miR-17-5p-mimics+pcDNA-NC group, the A_{490} value in miR-17-5p-mimics+pcDNA-TXNIP group was lower, the apoptosis rate, TXNIP mRNA and protein, NLRP3 mRNA and protein, MMP-1, MMP-9, IL-6, and IL-8 expression were higher ($P < 0.05$). MiR-17-5p could target negative regulation of TXNIP ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-17-5p can inhibit the TXNIP/NLRP3 signaling pathway and suppress the inflammatory response of PDLF cells induced by Pg-LPS.

【Keywords】 MicroRNA-17-5p; AMP-activated protein kinase; thioredoxin interacting protein; NLRP3; *Porphyromonas gingivalis*; lipopolysaccharide; human periodontal ligament fibroblasts; inflammatory response

牙周炎是一种常见的慢性炎症性疾病,可导致牙周组织的破坏,据统计,三分之二的成年人患有牙周炎,成人中严重牙周炎的发生率约为10%,是成人牙齿脱落的首要原因^[1]。牙周炎的发生和发展是牙周病原与宿主免疫炎症反应复杂相互作用的结果,牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)在内的牙周病原体释放的脂多糖(LPS)等多种内毒素可引起牙周壁龛的炎症反应和基质降解,导致牙周组织破坏^[2]。牙周治疗的最终目的是控制炎症,实现牙周组织的完全再生,目前,牙周炎常见的治疗策略包括全身使用抗生素和局部合成抗菌物质,然而会导致不良副作用和细菌耐药性增加,且不能阻止疾病的缓解和进一步进展^[3]。因此,人牙周韧带成纤维(PDLF)细胞是一类具有多向分化能力的牙周细胞,PDLF的成骨分化是牙周组织再生研究的重点,在牙周治疗中具有重要意义^[4]。因此,鉴定促进Pg-LPS诱导的人PDLF炎症反应的分子靶点,可以为治疗牙周炎提供新思路。微小RNA(miRNA)通过与靶蛋白编码mRNA的3'-UTR相互作用,对基因活性具有抑制作用,miRNA调节不同基因的表达,从而影响复杂的基因网络,在牙周炎的进展中发挥重要作用^[5]。相关研究显示,miR-17-5p在牙周炎中低表达^[6]。硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)是氧化应激和炎症的重要分子传感器,在调节能量代谢中起重要作用,TXNIP中的富亮氨酸重复序列(LRR)在多种疾病中可与NLRP3炎症小体结合,并诱导炎症反应^[7]。相关研究显示,缺氧诱导的ROS可激活氧化应激下的TXNIP/NLRP3信号通路,导致人牙周韧带细胞中炎症因子表达增加^[8]。此外,有研究表明来自脂肪源性间充质干细胞的外泌体miR-17-5p通过抑制TXNIP-NLRP3炎症小体抑制腹主动脉瘤的进展^[9]。

本研究前期通过生物信息学研究发现,miR-17-5p与TXNIP存在结合位点。据此推测miR-17-5p可能调控TXNIP调控牙周炎的进程,以提高牙周炎的治疗潜能。

材料与amp;方法

1 试剂与amp;仪器

PDLF细胞(货号:YS-01X7695,上海研生实业有限公司);miR-17-5p mimic(货号:CMR0054,广州威佳科技有限公司);Pg-LPS(货号:tlrl-pglps,上海研卉生物科技有限公司);SYBR qPCR Master mix(货号:22203,上海圻明生物科技有限公司);带DNase的一步逆转录试剂盒(货号:RT3,上海海方生物技术有限公司);MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(货号:K017,武汉菲恩生物科技有限公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:GV360018,上海一基实业有限公司);MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 ELISA试剂盒检测(货号:KM091153、KM090201、KM090076、KM090050,温州科森生物科技有限公司);GAPDH、TXNIP、NLRP3、HRP(货号:ab128915、ab215366、ab263899、ab205718,英国Abcam公司);流式细胞仪(型号:CyFlow Cube 6,青岛康笃科贸有限公司);引物由北京安必奇生物科技有限公司合成;qRT-PCR(型号:Gentier X3,西安天隆科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞转染 以PDLF细胞为研究对象,随机分为Control组(正常培养)、Pg-LPS组(用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Pg-LPS培养细胞24 h^[8])、NC-mimics组(在Pg-LPS诱导的基础上转染NC-mimics)、miR-17-5p-mimics组(在Pg-LPS诱导的基础上转染miR-17-5p-mimics)、miR-17-5p-mimics+pcDNA-NC组(在Pg-LPS诱导的基础上转染miR-17-5p-mimics+pcDNA-NC)、miR-17-5p-mimics+pcDNA-TXNIP组(在Pg-LPS诱导的基础上转染miR-17-5p-mimics+pcDNA-TXNIP)。每组实验重复3次,每次2个平行。

2.2 qRT-PCR法 检测PDLF细胞中miR-17-5p、TXNIP、NLRP3 mRNA的表达使用TRIzol试剂从PDLF细胞中提取总RNA,使用试剂盒将提取的

RNA 逆转录成 cDNA,采用 SYBR qPCR Master Mix 进行 RT-qPCR 扩增,使用 U6 转录本对 miR-17-5p 的表达进行归一化;GAPDH 对 TXNIP、NLRP3 基因的相对 mRNA 表达量进行归一化处理,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequence

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
miR-17-5p	GGCAAAGTGCTTACAGTGC	GTGCAGGGTCCGAGG
TXNIP	TCAATACCCTGACCTAATGGC	TTCTGTCAATTCGAGCAGAGAC
NLRP3	ATTACCCGCCCCGAGAAAGG	TCGCAGCAAAGATCCACACAG
U6	GCTGGACTCTAGGGTGAAG	GAGCATACCAGGTGGTAGTAG
GAPDH	GAAGTGAAGGTCGGAGTCA	AATGAAGGGTCATTGATGG

2.3 MTT 法检测 PDLF 细胞增殖 将转染的 PDLF 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板,加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液孵育 4 h,使用酶标仪在 490 nm 吸光度下进行测量。

2.4 流式细胞仪检测 PDLF 细胞的凋亡 用 PBS 短暂洗涤细胞,用结合缓冲液重悬,300 g 离心 10 min,用结合缓冲液重悬,调整浓度为 1×10^6 个细胞/mL,并在 20~25 °C 下进行 Annexin V-FITC 染色 10 min,用 PI 在 20~25 °C 下染色 5 min,流式细胞术分析细胞凋亡情况。

2.5 ELISA 试剂盒检测 PDLF 细胞中 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 的表达 收集 PDLF 细胞上清液,分别采用 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 试剂盒,按照说明书操作,检测上清液中 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 的表达。

2.6 蛋白印迹法(WB)检测 PDLF 细胞中 TXNIP、NLRP3 蛋白的表达 用含有 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液裂解 PDLF 细胞,用 5% BSA 密封后,用以下抗体孵育:TXNIP(1 : 1000)、NLRP3(1 : 1000)、GAPDH(1 : 10000)在 37 °C 下过夜,然后用 TBST 冲洗 3 次膜,并与二抗(1 : 2000)在室温下孵育 2 h,使用 ECL 试剂增强蛋白质信号,并使用 Biorad Gel Doc EQ 系统进行可视化,使用 Image J 软件对灰度值进行量化。

2.7 双荧光素酶报告基因实验 将携带结合位点野生型 TXNIP(TXNIP-WT)或 TXNIP 突变(TXNIP-MUT)的荧光素酶报告细胞和 mimic-NC、miR-17-5p mimic 共转染至 PDLF 细胞,6 h 后,将培养基更换为完全培养基,转染后 48 h,用双荧光素酶试剂盒测荧光素酶活性。

3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析,计量资料(miR-17-5p、TXNIP mRNA 和蛋白表达等)以($\bar{x} \pm s$)表示,mimic-NC 组和 miR-17-5p mimic 组双荧光

素酶比较采用独立样本 *t* 检验,不同组别 PDLF 细胞比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 miR-17-5p 过表达对 PDLF 细胞中 miR-17-5p、TXNIP、NLRP3 mRNA 的表达影响

Pg-LPS 组 miR-17-5p 表达低于 Control 组, TXNIP、NLRP3 表达高于 Control 组($P < 0.05$); miR-17-5p-mimics 组 miR-17-5p 表达高于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组, TXNIP、NLRP3 表达低于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组($P < 0.05$);与 miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组相比,miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组 TXNIP、NLRP3 表达升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组 PDLF 细胞中 miR-17-5p、TXNIP、NLRP3 mRNA 表达比较

Table 2 Comparison of mRNA expression of miR-17-5p, TXNIP and NLRP3 in PDLF cells of each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	miR-17-5p	TXNIP	NLRP3
Control 组	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.31
Pg-LPS 组	0.35 ± 0.09 ^a	2.37 ± 0.44 ^a	1.89 ± 0.43 ^a
NC-mimics 组	0.37 ± 0.10	2.32 ± 0.41	1.93 ± 0.42
miR-17-5p-mimics 组	0.74 ± 0.13 ^{bc}	1.46 ± 0.37 ^{bc}	1.28 ± 0.35 ^{bc}
miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组	0.76 ± 0.15	1.43 ± 0.37	1.26 ± 0.33
miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组	0.75 ± 0.11	2.18 ± 0.39 ^{de}	1.84 ± 0.39 ^{de}

注:^a与 Control 组比较,^b与 Pg-LPS 组比较,^cNC-mimics 组比较,^d与 miR-17-5p-mimics 组比较,^e与 miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

2 miR-17-5p 过表达对 PDLF 细胞增殖的影响

Control 组、Pg-LPS 组、NC-mimics 组、miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组 A_{490} 值分别为 1.27 ± 0.19 、 0.35 ± 0.10 、 0.33 ± 0.09 、 0.88 ± 0.15 、 0.92 ± 0.17 、 0.43 ± 0.11 。

Pg-LPS 组 A_{490} 值低于 Control 组($P < 0.05$); miR-17-5p-mimics 组 A_{490} 值高于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组($P < 0.05$);与 miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组相比,miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组 A_{490} 值降低($P < 0.05$)。

3 miR-17-5p 过表达对 PDLF 细胞凋亡的影响

Control 组、Pg-LPS 组、NC-mimics 组、miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组凋亡率分别为 $(1.15 \pm 1.19)\%$ 、 $(43.59 \pm 4.96)\%$ 、 $(44.72 \pm 5.08)\%$ 、 $(13.29 \pm 2.34)\%$ 、 $(13.86 \pm 2.26)\%$ 、 $(37.25 \pm 3.87)\%$ 。

Pg-LPS 组凋亡率高于 Control 组($P < 0.05$); miR-17-5p-mimics 组凋亡率低于 Pg-LPS 组、NC-

mimics 组 ($P < 0.05$); 与 miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组相比, miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组凋亡率升高 ($P < 0.05$)。见图 1。

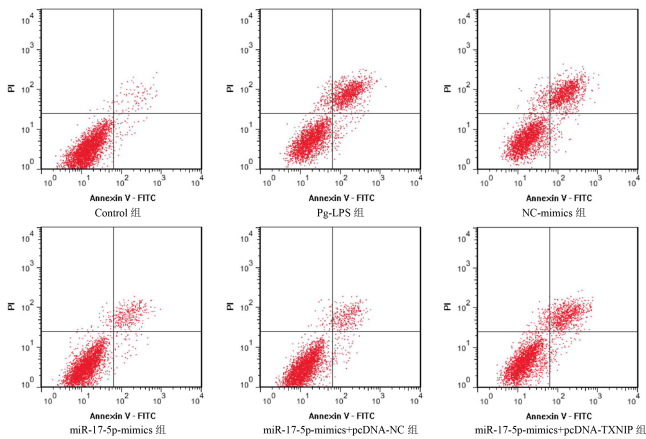


图 1 流式细胞仪检测 PDLF 细胞凋亡

Fig. 1 The apoptosis of PDLF cells was detected by flow cytometry

4 miR-17-5p 过表达对 PDLF 细胞中 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达的影响

Pg-LPS 组 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达高于 Control 组 ($P < 0.05$); miR-17-5p-mimics 组 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达低于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组 ($P < 0.05$); 与 miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组相比, miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 miR-17-5p 过表达对 PDLF 细胞中 MMP-1、MMP-9、IL-6、IL-8 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of miR-17-5p overexpression on the expression of MMP-1, MMP-9, IL-6 and IL-8 in PDLF cells

分组	MMP-1 (pg/mL)	MMP-9 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
Control 组	17.85 ± 6.42	48.96 ± 9.05	5.28 ± 1.05	23.96 ± 3.05
Pg-LPS 组	98.72 ± 10.29 ^a	158.23 ± 15.97 ^a	72.31 ± 8.37 ^a	105.28 ± 11.59 ^a
NC-mimics 组	99.16 ± 10.34	159.07 ± 16.08	72.97 ± 8.29	103.17 ± 10.87
miR-17-5p-mimics 组	38.53 ± 7.42 ^{bc}	62.15 ± 11.35 ^{bc}	19.58 ± 1.96 ^{bc}	31.48 ± 8.31 ^{bc}
miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组	37.21 ± 7.03	61.36 ± 11.26	20.36 ± 2.34	32.57 ± 8.27
miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组	80.34 ± 9.31 ^{de}	109.83 ± 14.27 ^{de}	67.45 ± 7.32 ^{de}	98.24 ± 10.25 ^{de}

注: ^a 与 Control 组比较, ^b 与 Pg-LPS 组比较, ^c NC-mimics 组比较, ^d 与 miR-17-5p-mimics 组比较, ^e 与 miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组比较, $P < 0.05$ 。

5 miR-17-5p 过表达对 PDLF 细胞中 TXNIP、NLRP3 蛋白表达的影响

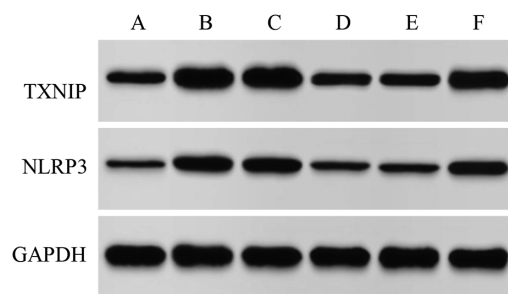
Pg-LPS 组 TXNIP、NLRP3 蛋白表达高于 Control 组 ($P < 0.05$); miR-17-5p-mimics 组 TXNIP、NLRP3 蛋白表达低于 Pg-LPS 组、NC-mimics 组 ($P < 0.05$); 与 miR-17-5p-mimics 组、miR-17-5p-mimics

+ pcDNA-NC 组相比, miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组 TXNIP、NLRP3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。见图 2、表 4。

表 4 各组 PDLF 细胞中 TXNIP、NLRP3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Comparison of TXNIP and NLRP3 protein expression in PDLF cells of each group

分组	TXNIP	NLRP3
Control 组	0.42 ± 0.13	0.18 ± 0.05
Pg-LPS 组	1.25 ± 0.23 ^a	0.79 ± 0.11 ^a
NC-mimics 组	1.21 ± 0.27	0.73 ± 0.10
miR-17-5p-mimics 组	0.53 ± 0.15 ^{bc}	0.23 ± 0.07 ^{bc}
miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组	0.55 ± 0.15	0.26 ± 0.06
miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组	0.98 ± 0.19 ^{de}	0.68 ± 0.09 ^{de}

注: ^a 与 Control 组比较, ^b 与 Pg-LPS 组比较, ^c NC-mimics 组比较, ^d 与 miR-17-5p-mimics 组比较, ^e 与 miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组比较, $P < 0.05$ 。



A Control 组 B Pg-LPS 组 C NC-mimics 组 D miR-17-5p-mimics 组 E miR-17-5p-mimics + pcDNA-NC 组 F miR-17-5p-mimics + pcDNA-TXNIP 组

图 2 WB 检测 PDLF 细胞中 TXNIP、NLRP3 蛋白的表达

Fig. 2 The expression of TXNIP and NLRP3 proteins in PDLF cells was detected by WB

6 双荧光素酶报告实验检测 miR-17-5p 和 TXNIP 的靶向关系

Starbase 网站显示 miR-17-5p 和 TXNIP 有多个结合位点 (图 3)。在转染 TXNIP-MUT 的细胞中, mimic-NC 组和 miR-17-5p mimic 组的荧光素酶活性分别为 1.00 ± 0.18 、 0.93 ± 0.15 。在转染 TXNIP-WT 的细胞中, mimic-NC 组和 miR-17-5p mimic 组的荧光素酶活性分别为 1.00 ± 0.11 、 0.27 ± 0.08 , miR-17-5p mimic 组的荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$)。



图 3 miR-17-5p 与 TXNIP 的结合位点

Fig. 3 The binding site of miR-17-5p and TXNIP

讨论

牙周炎是最常见的口腔疾病之一, 影响全球 20% ~ 50% 的人口, 特征是牙齿周围组织的进行性破坏, 这

会导致结缔组织、牙龈胶原蛋白、牙周韧带和牙槽骨的损失^[11]。由于,牙根暴露在外,隐藏着细菌生物膜,这些细菌生物膜固化为牙结石,如果不及时治疗,这种疾病的缓慢、慢性本质最终会导致牙齿移动、咀嚼困难、审美问题,并最终导致牙齿脱落。牙周炎的影响不仅限于口腔健康,还会引发对其他器官有害的低度全身炎症,牙槽骨是连接糖尿病、肝脏问题、心血管疾病和骨质疏松症等全身疾病的桥梁,是造成其他并发症的重要原因^[12]。牙龈卟啉单胞菌是一种厌氧革兰氏阴性杆状细菌,被认为是牙周炎症进展的主要原因之一,这种口腔细菌通过多种生物活性物质攻击宿主的免疫系统,包括细胞质膜、肽聚糖、LPS和菌毛。Pg-LPS被认为是牙周炎发病和发展过程中的关键致病成分,其中细菌LPS对炎症细胞因子的产生和骨吸收起着关键的促进作用^[13]。PDLF通过产生骨细胞相关的细胞外基质蛋白(MMP-1、MMP-9),在牙周组织的维持和再生中发挥着不可或缺的作用,细菌感染及其成分,包括Pg-LPS,介导PDLFs过度分泌促炎细胞因子(IL-6、IL-8)导致疾病的进展^[10]。因此,探讨Pg-LPS诱导的PDLF参与炎症反应的分子机制,并寻找合适的治疗靶点,对改善牙周炎的治疗潜能,至关重要。本研究采用Pg-LPS处理PDLF细胞,结果发现细胞的增殖能力下降,凋亡率升高,炎症因子(IL-6、IL-8)和细胞外基质蛋白(MMP-1、MMP-9)表达升高,提示Pg-LPS处理PDLF细胞可以通过促进炎症反应和骨吸收,导致细胞的损伤和死亡,是牙周炎疾病发生的重要原因。

miRNA是各种调节网络的一个组成部分,通过启动mRNA降解或抑制mRNA的翻译来抑制mRNA转化为蛋白质,从而导致许多细胞过程的下调或加剧,在牙周炎的疾病进展中发挥重要作用^[14]。Sun等^[15]发现,在LPS诱导的脓毒性急性肾损伤小鼠中miR-17-5p持续降低,并在24h时达到最低,注射miR-17-5p激活剂可调节TGF β 2/TGF- β /Smad3信号通路明显改善急性肾损伤后小鼠的肾损伤和存活率,并抑制炎症细胞因子的产生和肾细胞凋亡,可作为脓毒症治疗的潜在靶点。Xu等^[16]发现,建立了非酒精性脂肪性肝病继发于牙周炎的共病模型,miRNA分析指出miR-17-5p与树突状细胞的受损迁移相关,可能是非酒精性脂肪性肝病继发于牙周炎的潜在治疗靶点。本研究发现,miR-17-5p在Pg-LPS处理的PDLF细胞中表达下调,过表达miR-17-5p可以促进Pg-LPS处理PDLF细胞的增殖、抑制细胞凋亡,进而抑制炎症反应和骨吸收,提示过表达miR-17-5p可通过抑制Pg-LPS处理的PDLF细胞炎症和骨吸收,促进细胞增殖,抑制牙周炎疾病的进展。

TXNIP是硫氧还蛋白的抑制剂,控制细胞内的氧化稳态,并在调节NLRP3炎性体的激活,相关研究显示TXNIP表达水平升高可直接激活NLRP3炎性小体,并最终诱导炎症反应^[17]。Chen等^[18]发现,miR-200a-3p通过抑制TXNIP/NLRP3介导的心肌细胞焦亡减轻大鼠冠状动脉微栓塞诱导的心肌损伤。Lian等^[19]发现,在Pg-LPS诱导的PDLF中ROS、TXNIP蛋白和TXNIP与NLRP3的结合显著增加,可导致PDLF的迁移功能障碍,ROS生成抑制剂显著降低Pg-LPS诱导PDLF中TXNIP蛋白的表达,NLRP3炎性小体形成和IL-1 β 的产生,减轻PDLF的损伤,抑制牙周炎的进展。本研究发现,在Pg-LPS处理的PDLF细胞中,TXNIP、NLRP3均呈高表达,提示TXNIP/NLRP3信号通路的激活是牙周炎疾病进展的重要原因。

相关研究显示,miR-17-5p可以靶向调控TXNIP调节NLRP3的表达。Liu等^[20]发现,miR-17-5p通过抑制糖尿病小鼠TXNIP/NLRP3炎性小体通路,减少胰腺 β 细胞焦亡,改善糖尿病小鼠的葡萄糖耐量和胰腺 β 细胞功能。Gamdzyk等^[21]发现,PPAR- β / δ 受体激动剂GW0742激活miR-17-5p,抑制大鼠和PC12细胞缺血缺氧损伤后TXNIP/NLRP3介导的炎症。本研究通过生物信息学研究发现,miR-17-5p与TXNIP之间存在结合位点,miR-17-5p可以靶向负调控TXNIP,过表达TXNIP可以逆转过表达miR-17-5p对Pg-LPS处理的PDLF细胞增殖、凋亡、炎症因子及TXNIP/NLRP3信号通路蛋白的影响,提示miR-17-5p可以抑制Pg-LPS诱导的PDLF细胞炎症反应,其机制可能是通过抑制TXNIP/NLRP3信号通路实现的。

综上所述,miR-17-5p可以抑制TXNIP/NLRP3信号通路,抑制Pg-LPS诱导的PDLF细胞的炎症反应。然而,本研究只在细胞水平上进行实验,后续会补充动物实验,深入研究。

【参考文献】

- [1] Seong J, Lee J, Lim YK, et al. Osmunda japonica extract suppresses pro-inflammatory cytokines by downregulating NF- κ B activation in periodontal ligament fibroblasts infected with oral pathogenic bacteria[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 245-256.
- [2] Yao S, Jiang C, Zhang H, et al. Visfatin regulates Pg LPS-induced proinflammatory/prodegradative effects in healthy and inflammatory periodontal cells partially via NF- κ B pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2021, 1868(8): 119042-119054.
- [3] Jekabsone A, Sile I, Cochis A, et al. Investigation of antibacterial and anti-inflammatory activities of proanthocyanidins from

- Pelargonium sidoides* DC root extract[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11):2829-2846.
- [4] Zhang Y, Guo Y, Wei W, et al. Metabolomics profiling reveals berberine-inhibited inflammatory response in human gingival fibroblasts by regulating the LPS-induced apoptosis signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13(1):940224-940235.
- [5] Baru O, Raduly L, Bica C, et al. Identification of a miRNA panel with a potential determinant role in patients suffering from periodontitis[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45(3):2248-2265.
- [6] Zheng L, Chopra A, Weiner J, et al. miRNAs from Inflamed gingiva link gene signaling to increased MET expression[J]. *J Dent Res*, 2023, 102(13):1488-1497.
- [7] Liu P, Li X, Liu J, et al. TXNIP participated in NLRP3-mediated inflammation in a rat model of cervical spondylotic myelopathy [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15(1):4547-4559.
- [8] Zhu R, Mi X, Li Y. Effects of Hypoxic Environment on periodontal tissue through the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 1(1):7690960-7690975.
- [9] Hu J, Jiang Y, Wu X, et al. Exosomal miR-17-5p from adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits abdominal aortic aneurysm by suppressing TXNIP-NLRP3 inflammasome [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):349-367.
- [10] Zhang H, Huang J, Fan X, et al. HSP90AA1 promotes the inflammation in human gingival fibroblasts induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via regulating of autophagy[J]. *BMC Oral Health*, 2022, 22(1):366-375.
- [11] Liu J, Wang Y, Shi Q, et al. Mitochondrial DNA efflux maintained in gingival fibroblasts of patients with periodontitis through ROS/mPTP pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 1(1):1000213-1000227.
- [12] Deepika BA, Ramamurthy J, Kannan B, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-2 mRNA-binding protein 1 is associated with periodontal disease[J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2024, 14(5):494-499.
- [13] Park CM, Yoon HS. Chlorogenic acid as a positive regulator in LPS-PG-induced inflammation via TLR4/MyD88-Mediated NF- κ B and PI3K/MAPK signaling cascades in human gingival fibroblasts [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 1(1):2127642-2127649.
- [14] Buragaite-Staponkiene B, Rovas A, Puriene A, et al. Gingival tissue MiRNA expression profiling and an analysis of periodontitis-specific circulating MiRNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15):11983-119.
- [15] Sun J, Niu L, Wang Y, et al. MicroRNA 17 5p alleviates sepsis related acute kidney injury in mice by modulating inflammation and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2024, 30(2):139-149.
- [16] Xu W, Zhang Z, Yao L, et al. Exploration of shared gene signatures and molecular mechanisms between periodontitis and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Front Genet*, 2022, 13(1):939751-939761.
- [17] Ismael S, Nasoohi S, Yoo A, et al. Tissue plasminogen activator promotes TXNIP-NLRP3 inflammasome activation after hyperglycemic stroke in mice [J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(6):2495-2508.
- [18] Chen Z Q, Zhou Y, Chen F, et al. miR-200a-3p attenuates coronary microembolization-induced myocardial injury in rats by inhibiting TXNIP/NLRP3-mediated cardiomyocyte pyroptosis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8(2):693257-693270.
- [19] Lian D, Dai L, Xie Z, et al. Periodontal ligament fibroblasts migration injury via ROS/TXNIP/Nlrp3 inflammasome pathway with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Mol Immunol* [J]. 2018, 103(2):209-219.
- [20] Liu S, Tang G, Duan F, et al. MiR-17-5p Inhibits TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway and suppresses pancreatic β -Cell pyroptosis in diabetic mice [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8(1):768029-768038.
- [21] Gamczyk M, Doycheva DM, Kang R, et al. GW0742 activates miR-17-5p and inhibits TXNIP/NLRP3-mediated inflammation after hypoxic-ischaemic injury in rats and in PC12 cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21):12318-12330.

【收稿日期】 2024-11-24 【修回日期】 2025-02-10