

安徽医科大学学报  
*Acta Universitatis Medicinalis Anhui*  
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: Prohibitin 2 经 NF- $\kappa$ B 信号通路加重脂多糖诱导的牙周骨组织炎症  
作者: 赵静心, 胡佳敏, 高纪科, 程铭, 朱友明, 孙晓瑜  
网络首发日期: 2025-09-03  
引用格式: 赵静心, 胡佳敏, 高纪科, 程铭, 朱友明, 孙晓瑜. Prohibitin 2 经 NF- $\kappa$ B 信号通路加重脂多糖诱导的牙周骨组织炎症[J/OL]. 安徽医科大学学报.  
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250903.1101.004>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## Prohibitin 2 经 NF- $\kappa$ B 信号通路加重脂多糖诱导的牙周骨组织炎症

赵静心, 胡佳敏, 高纪科, 程 铭, 朱友明, 孙晓瑜

(安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究重点实验室,  
合肥 230032)

**摘要** 目的 阐明抗增殖蛋白 2 (PHB2) 通过调控核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路介导牙周炎骨组织炎症反应的具体分子机制, 揭示其在牙槽骨不可逆吸收这一关键病理过程中的作用。方法 本研究通过体内实验, 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和免疫组织化学技术 (IHC) 技术检测牙周炎模型小鼠的牙槽骨组织中炎症因子及 PHB2 的表达差异。体外实验中, 用脂多糖 (LPS) 诱导小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 炎症模型, 通过 Western blot 和 qRT-PCR 明确 PHB2 与炎症因子的调控关系, 并观察 PHB2 亚细胞定位变化。通过分子克隆构建 PHB2 过表达质粒, 用 RNA 干扰敲低 PHB2 表达, 评估其对炎症反应的调控作用。基于 RNA-seq 数据, 采用基于负二项分布的差异表达分析 2 (DESeq2) 进行差异表达分析, 结合京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析和基因本体 (GO) 功能注释, 分析并筛选关键信号通路及差异表达基因。结果 在实验性小鼠牙周炎模型中, PHB2 在牙周炎组小鼠的牙槽骨组织中的表达量明显上调。在体外细胞炎症模型中, PHB2 与白细胞介素 (IL)-6、IL-1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 炎症因子表达量呈正相关, 且随着炎症的发生, PHB2 在炎症细胞中的亚定位发生了变化; 最后, 通过高通量测序、检测各组细胞磷酸化 p65 蛋白 (p-p65) 表达量变化及上下游基因表达, 结果显示, PHB2 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路加重了细胞的炎性反应, 并且与上游 C-X-C 基序趋化因子配体 10 (CXCL10) 基因的表达水平有关联。结论 PHB2 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路加重 LPS 诱导的牙周炎炎症, 为进一步研究牙周炎发生发展过程的分子机制提供了新的研究方向。

**关键词** PHB2; 牙周炎; 炎症因子; NF- $\kappa$ B; LPS; CXCL10

**中图分类号** R 78

**文献标志码** A

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 31970677); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2308085Y23); 安徽医科大

学口腔医学院 (附属口腔医院) 学科建设“峰原”项目 (编号: 2023xkfyts09、2022xkfyhz06)

作者简介: 赵静心, 女, 硕士研究生;

孙晓瑜, 女, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 2011520001@ahmu.edu.cn

# **Prohibitin 2 exacerbates lipopolysaccharide-induced periodontal bone inflammation via the NF- $\kappa$ B signaling pathway**

Zhao Jingxin, Hu Jiamin, Gao Jike, Cheng Ming, Zhu Youming, Sun Xiaoyu

(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases  
Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To elucidate the molecular mechanism by which prohibitin 2 (PHB2) mediates periodontitis-induced bone tissue inflammation through regulating the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway and its role in irreversible alveolar bone resorption. **Methods** Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry (IHC) were used to detect the expression differences of inflammatory factors and PHB2 in healthy and inflamed alveolar bone tissues of mice *in vivo*. *In vitro*, an inflammatory model was established using lipopolysaccharide (LPS)-induced a mouse calvaria-derived preosteoblastic cell line, subclone E1 (MC3T3-E1) cells. Western blot and qRT-PCR were used to clarify the regulatory relationship between PHB2 and inflammatory factors, and immunofluorescence staining was performed to observe changes in PHB2 subcellular localization. PHB2 overexpression plasmids were constructed using molecular cloning, and RNA interference was employed to knock down PHB2 expression to assess its regulatory role in inflammation. Based on RNA-seq data, differential expression analysis based on the negative binomial distribution, version 2 (DESeq2) was used for differential expression analysis, and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment along with gene ontology (GO) functional annotation were performed to identify key signaling pathways and differentially expressed genes. **Results** In the mouse periodontitis model, PHB2 expression was significantly upregulated in alveolar bone tissues. In the *in vitro* inflammatory cell model, PHB2 levels positively correlated with interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) levels, and its subcellular localization shifted during inflammation. RNA-seq data and the detection of the level of phosphorylation of p65 protein (p-p65) demonstrated that PHB2 exacerbated inflammatory responses through the NF- $\kappa$ B signaling pathway and was mechanistically linked to upregulation of the upstream chemokine C-X-C motif chemokine ligand

10 (CXCL10). **Conclusion** PHB2 aggravates LPS-induced periodontitis inflammation *via* the NF- $\kappa$ B signaling pathway, providing new insights into the molecular mechanisms underlying the development of periodontitis.

**Key words** PHB2; periodontitis; inflammatory factors; NF- $\kappa$ B ; LPS; CXCL10

**Found programs** National Natural Science Foundation of China (No. 31970677); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085Y23); Discipline Construction “Fengyuan” Collaborative Projects of College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University (Nos. 2023xkfyts09, 2022xkfyhz06)

**Corresponding author** Sun Xiaoyu, E-mail: 2011520001@ahmu.edu.cn

牙周炎是由菌斑微生物引发的慢性炎症性疾病，其病理进程与免疫炎症反应密切相关<sup>[1]</sup>。菌斑微生物膜的主要毒力因子脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）可激活固有免疫系统，促进白细胞介素（interleukin, IL）-6、IL-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ）等促炎细胞因子的释放，进而通过调控核因子- $\kappa$ B受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL）/骨保护素（osteoprotegerin, OPG）系统，诱导破骨细胞分化与活化，最终导致不可逆性牙槽骨吸收能<sup>[2]</sup>，此为牙周炎进展的核心特征及治疗难点。

抗增殖蛋白2（prohibitin 2, PHB2）是高度保守的多功能蛋白，参与炎症反应与信号转导<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>表明，PHB2在炎症性疾病的调控中发挥重要作用。例如，在口腔白斑（oral leukoplakia, OLK）中，PHB2通过与过氧化物还原蛋白1（peroxiredoxin-1, Prx1）结合来减轻氧化应激并延缓疾病进展。此外，多项研究<sup>[5-7]</sup>表明PHB2能够调控免疫炎症反应，但其在牙周炎中的具体作用机制尚不明确。基于此，本研究拟通过建立小鼠牙周炎模型和LPS诱导的小鼠胚胎成骨细胞前体细胞（a mouse calvaria-derived preosteoblastic cell line, subclone E1, MC3T3-E1）炎症模型，结合体内外实验，系统探究PHB2对牙周炎骨组织炎症的影响及分子机制，为靶向治疗提供新依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞** 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 购自美国模式培养物集存库（American Type Culture Collection, ATCC），通过北京中源公司（授权代理商）获取；

**1.1.2 实验动物** 8只6~8周龄,体质量(25±5)g的雄性C57BL/6J小鼠,饲养于安徽医科大学实验动物中心。

**1.1.3 主要试剂和仪器**  $\alpha$ -最小必需培养基(alpha minimum essential medium,  $\alpha$ -MEM)、青-链霉素溶液(北京兰杰柯科技有限公司);焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)、含Tween-20的Tris缓冲盐溶液(tris-buffered saline with tween-20, TBST)(北京索莱宝公司);TB Green™ Premix Ex Taq™ II、逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司);放射免疫沉淀法裂解缓冲液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、胰蛋白酶、蛋白磷酸酶抑制剂混合液( $\times 50$ )、蛋白上样缓冲液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)(上海碧云天公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Corning公司);ECL化学发光底物试剂、聚偏二氟乙烯膜(美国Millipore公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥公司);细胞核因子NF- $\kappa$ B p65抗体、磷酸化NF- $\kappa$ B p65 Ser536抗体(美国Immunoway公司);PHB2蛋白抗体(英国abcam公司);pcDNA3.1为载体的PHB2质粒、pcDNA3.1、siRNA-PHB2(上海生工生物工程公司)。高速常温离心机、移液枪、高速低温离心机(德国Eppendorf公司);离心管、培养皿、细胞冻存管(美国Corning Costar公司);实时荧光定量PCR仪(美国安捷伦公司);显微镜(德国Leica公司);电泳仪、蛋白转膜仪(北京六一公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立小鼠牙周炎** 采用6~8周龄,体质量(25±5)g的雄性C57BL/6J小鼠,饲养于安徽医科大学实验动物中心。所有程序均符合实验动物护理标准,并经安徽医科大学医学伦理委员会批准(动物伦理号:20241444)。将小鼠随机分为2组,每组各5只:①健康对照组;②实验性牙周炎组。首先,适应性喂养小鼠2周,采用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉小鼠,将5-0丝线固定结扎于小鼠双侧的上颌第二磨牙的牙颈部,14 d后检查小鼠牙周组织,若出现牙龈红肿、探诊出血和深牙周袋,提示牙周炎模型建立成功,从而建立小鼠实验性牙周炎模型。2周后,所有老鼠都被安乐死。取上颌第二磨牙牙槽骨标本,一部分置于4%多聚甲醛固定液中固定,另一部分放于-80℃保存,以备后续实验检测。

**1.2.2 小鼠牙槽骨组织HE染色** 已提取的小鼠牙槽骨组织清洗后放入10%甲醛中固定,24 h后放入乙二胺四乙酸中脱钙,以30%蔗糖脱水48 h,然后以冰冻切片包埋剂OCT包埋,切片(厚4  $\mu$ m),遵循HE染色试剂盒说明书中方法进行染色,清洗、封片、显微镜下观

察并拍摄。

**1.2.3 MC3T3-E1 细胞培养** 用含 10%胎牛血清的  $\alpha$ -MEM 培养基培养于 37 °C含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱内。

**1.2.4 qRT-PCR 实验** 收集各组细胞，RNA 快提试剂盒提取细胞总 RNA，逆转录合成 cDNA，实时荧光定量 PCR 仪进行扩增，加入相对应的引物见表 1，检测各目的基因，采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算其表达量。反应程序：95 °C 30 s，1 个循环；95 °C 5 s，55 °C 10 s，扩增 40 个循环。

表 1 引物序列列表

Tab.1 List of primer sequences

Gene name	Sequences (5' -3')
$\beta$ -actin	F:GGCTGTATTCCCCTCCATCG
	R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
IL-1 $\beta$	F:CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC
	R:TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGATC
IL-6	F:CTTCTGGGACTGATGCTGGTGAC
	R:TCTGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTG
TNF- $\alpha$	F:CGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGG
	R:GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG
PHB2	F:GAAGATTGTGCAGGCTGAGG
	R:CCAGGATTCTTGCTCAGTGC
CXCL10	F:CCAAGTGCTGCCGTCATTTTC
	R:GGCTCGCAGGGATGATTTCAA

**1.2.5 免疫荧光定位实验** 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于放有爬片 6 孔板中，0.5  $\mu$ g/mL LPS 刺激细胞 12 h 后，加入 4%多聚甲醛，清洗后加入 0.2%的 Triton X-100，清洗后加入 5%的 BSA 液封闭，加入按 1 : 200 比例稀释的一抗孵育过夜。清洗后加入荧光二抗，避光孵育后加入 DAPI 和 Mitochondrion 液染色，防荧光淬灭液封片，置于荧光显微镜下观察拍照，每组设 3 个复孔。

**1.2.6 核质分离实验** 以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板中，经处理后，提取细胞悬液，细胞质和细胞核抽提盒分别提取实验组和对照组细胞质和细胞核蛋白，进行 Western blot 实验。

**1.2.7 Western blot 实验** 经处理后的细胞提取总蛋白，采用 BCA 法测定总蛋白浓度，然后将 4×蛋白上样缓冲液与蛋白样品混匀后，100 °C 水浴 10 min。在垂直电泳仪上用相同体积 (15 μg) 的蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭后，用 PHB2、p65 和 p-p5 稀释后的一抗液体，4 °C 孵育过夜后用 TBST 洗涤 3 次，室温孵育二抗 2 h，再次用 TBST 充分洗涤后进行 ECL 化学发光显影。

**1.3 统计学处理** 所有数据采用 GraphPad Prism7 软件进行统计分析。数值表示为  $\bar{x} \pm s$ ，组间差异采用单因素方差分析， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 PHB2 对小鼠牙周炎模型骨组织炎症进程的影响** 为了研究 PHB2 在小鼠牙周骨组织炎症模型中的表达量变化，将收集的小鼠牙槽骨组织免疫组化染色 (图 1A)，q-PCR 检测 IL-6 和 PHB2 表达量以及 Western blot 检测 PHB2 表达量 (图 1B)，结果显示与对照组相比，小鼠实验性牙周炎模型的牙槽骨中 IL-6 和 PHB2 的表达量明显上调 (IL-6:  $t=29$ ,  $P < 0.0001$ ; PHB2:  $t=38$ ,  $P < 0.0001$ )，该研究结果揭示了在小鼠牙周炎骨组织炎症模型中 PHB2 呈现出高水平的表达。

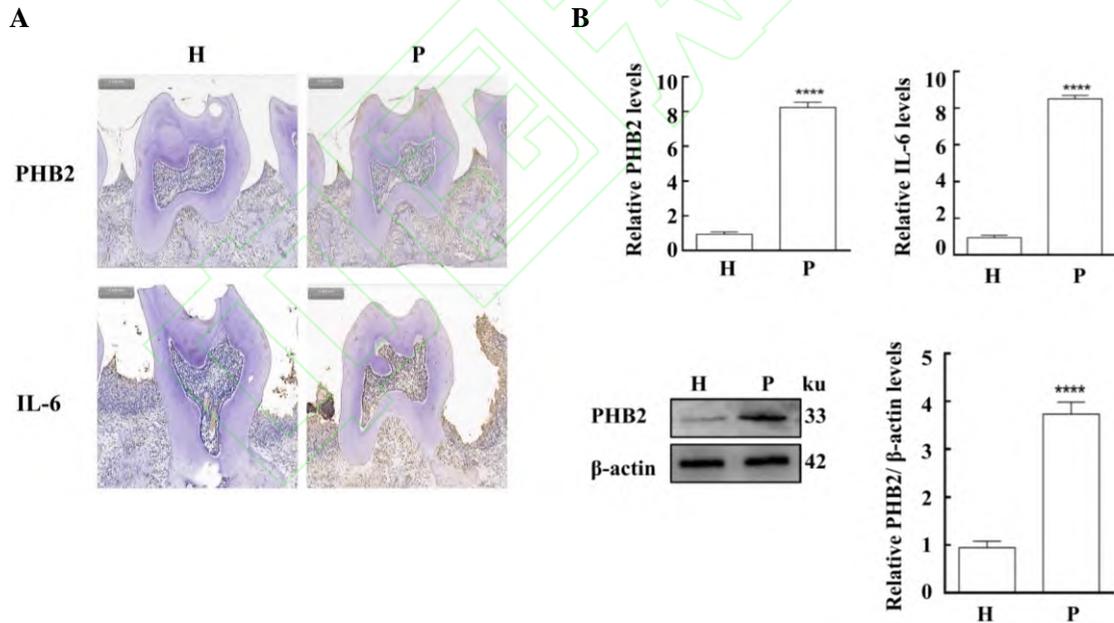


图 1 IL-6 和 PHB2 在小鼠牙槽骨中的表达

Fig.1 The expression of IL-6 and PHB2 in alveolar bone of a mouse

A: Immunohistochemical (IHC) staining showed PHB2 and IL-6 protein expression in mouse alveolar bone, Scale bar = 200 μm; B: The expressions of IL-6 and PHB2 in the alveolar bone of the mice were detected by qRT-PCR, and the relative protein expression of PHB2 in the alveolar bone of the mice was detected by Western

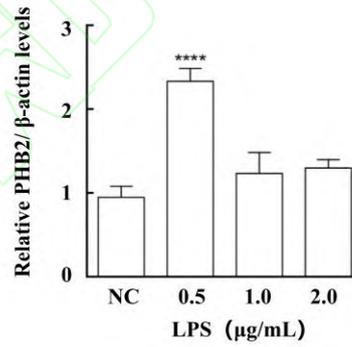
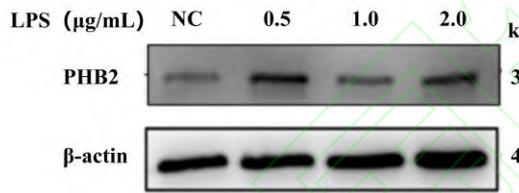
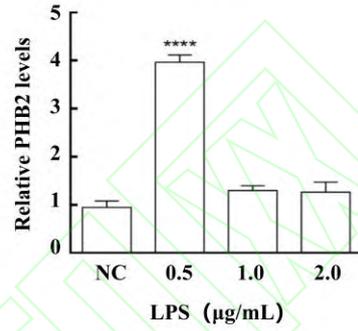
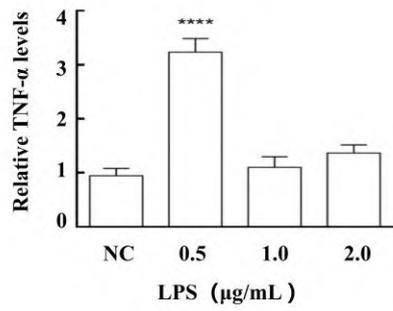
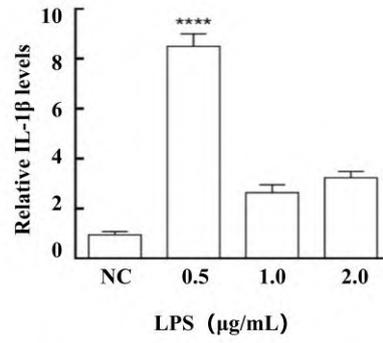
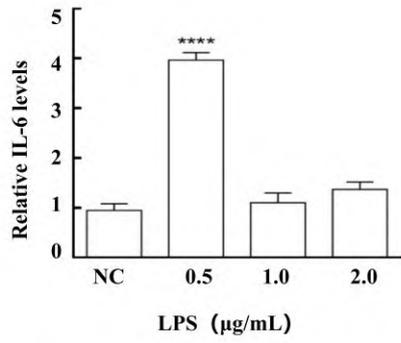
blot; H:Health group; P: Periodontitis group; \*\*\*\* $P<0.0001$  vs Health group.

**2.2 建立 LPS 诱导的体外牙周骨组织炎症的模型** 为建立体外实验模型并确定最佳实验条件,该实验首先评估了不同浓度 LPS 对 MC3T3-E1 细胞中 PHB2 及炎症因子表达的影响(图 2A)。qRT-PCR 分析显示,当 LPS 浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , PHB2 mRNA 表达量显著上调 [ (4.00 $\pm$ 0.10) 倍,  $F=903$ ,  $P<0.0001$  ], 同时伴随炎症因子 IL-6 [ (8.58 $\pm$ 0.50) 倍 ]、IL-1 $\beta$  [ (3.87 $\pm$ 0.13) 倍 ] 和 TNF- $\alpha$  [ (3.57 $\pm$ 0.41) 倍 ] 的显著升高 (均  $P<0.0001$ )。Western blot 结果进一步证实,0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 刺激可使 PHB2 蛋白表达量增加 (2.10 $\pm$ 0.10) 倍 ( $F=43$ ,  $P<0.0001$ )。

基于上述结果,该实验选择 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 进行时间梯度实验(图 2B)。qPCR 分析表明,12 h 刺激可诱导 PHB2 mRNA 表达达到峰值 [ (3.96 $\pm$ 0.10) 倍,  $F=637$ ,  $P<0.0001$  ], 同时炎症因子表达亦显著升高 [IL-6: (8.58 $\pm$ 0.50) 倍; IL-1 $\beta$ : (3.87 $\pm$ 0.07) 倍; TNF- $\alpha$ : (3.57 $\pm$ 0.41) 倍; 均  $P<0.0001$ ]。蛋白水平检测显示,PHB2 表达量在 12 h 时增加 (2.63 $\pm$ 0.32) 倍 ( $F=37$ ,  $P<0.0001$ )。

以上结果表明,在体外牙周炎模型中,PHB2 的表达受 LPS 刺激呈时间-浓度依赖性上调,且其表达变化与炎症因子水平呈正相关。基于此,后续实验采用 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 刺激 12 h 作为该实验的标准条件。

A



B

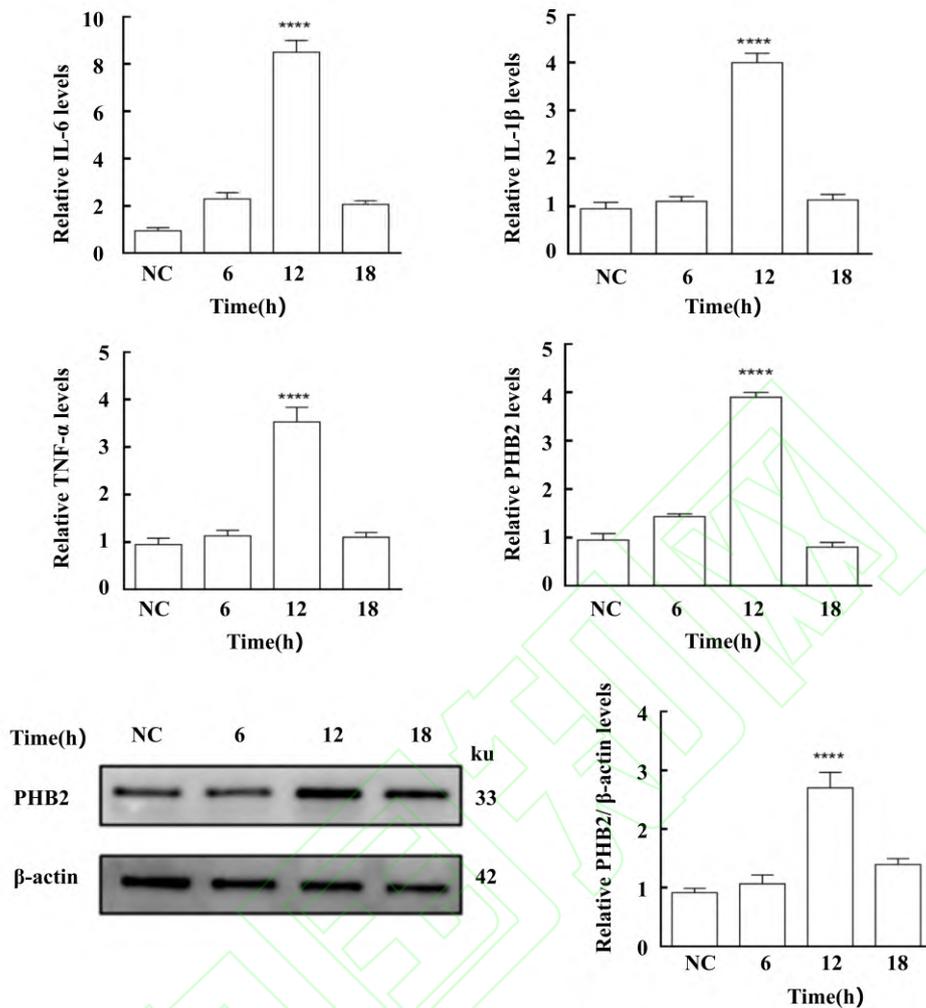


图2 细胞炎症模型的建立

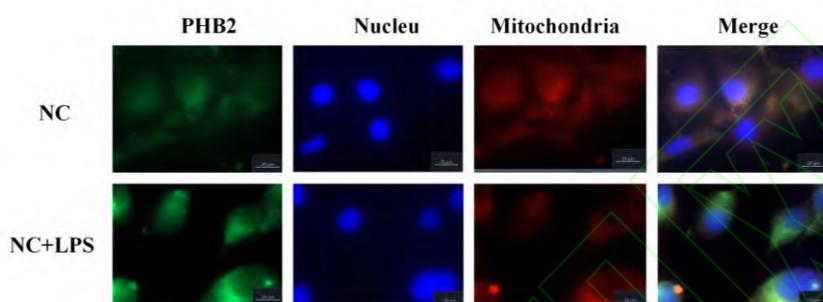
Fig.2 Establishment of a cellular inflammation model

A: The expression levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  in MC3T3-E1 cells stimulated with different concentrations of LPS for 12 h were detected by qRT-PCR, and the expression level of PHB2 was detected by Western blot; B: The expression levels of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  in MC3T3-E1 cells stimulated with 0.5  $\mu$ g/mL LPS at different time points were detected by qRT-PCR, and the expression level of PHB2 was detected by Western blot; \*\*\*\* $P$ <0.0001 vs NC group.

2.3 在牙周炎的发生过程中，PHB2 的亚细胞定位发生了变化 为探究炎症状态下 PHB2 的亚细胞定位变化，该实验首先通过免疫荧光染色观察了 MC3T3-E1 细胞中 PHB2 的分布情况。结果显示（图 3A），在未受刺激的对照组细胞中，PHB2 信号主要集中于细胞核内，

表现出典型的核定位模式。然而，经 LPS 处理诱导炎症状态后，PHB2 的荧光信号分布发生显著改变：绝大多数 PHB2 从细胞核转移至细胞质及线粒体中，核内信号明显减弱。为进一步验证这一现象，该研究进行了核质分离实验并通过 Western blot 检测各组分中 PHB2 的表达（图 3B）。Western blot 结果显示，与对照组相比，LPS 刺激组的核组分中 PHB2 条带强度明显减弱，而胞质组分中 PHB2 条带强度相应增强。这一趋势与免疫荧光观察结果一致，共同表明 LPS 刺激可促进 PHB2 从细胞核向细胞质的转位。

A



B

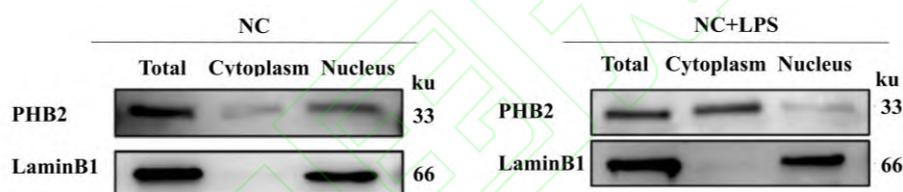


图 3 PHB2 在 MC3T3-E1 细胞系中的定位

Fig.3 Localization of PHB2 in the MC3T3-E1 cell line

A: Localization of PHB2 was detected by immunofluorescence staining  $\times 40$ ; B: Protein expression of LaminB1 and PHB2 was determined by Western blot analysis performed after nuclear isolation.

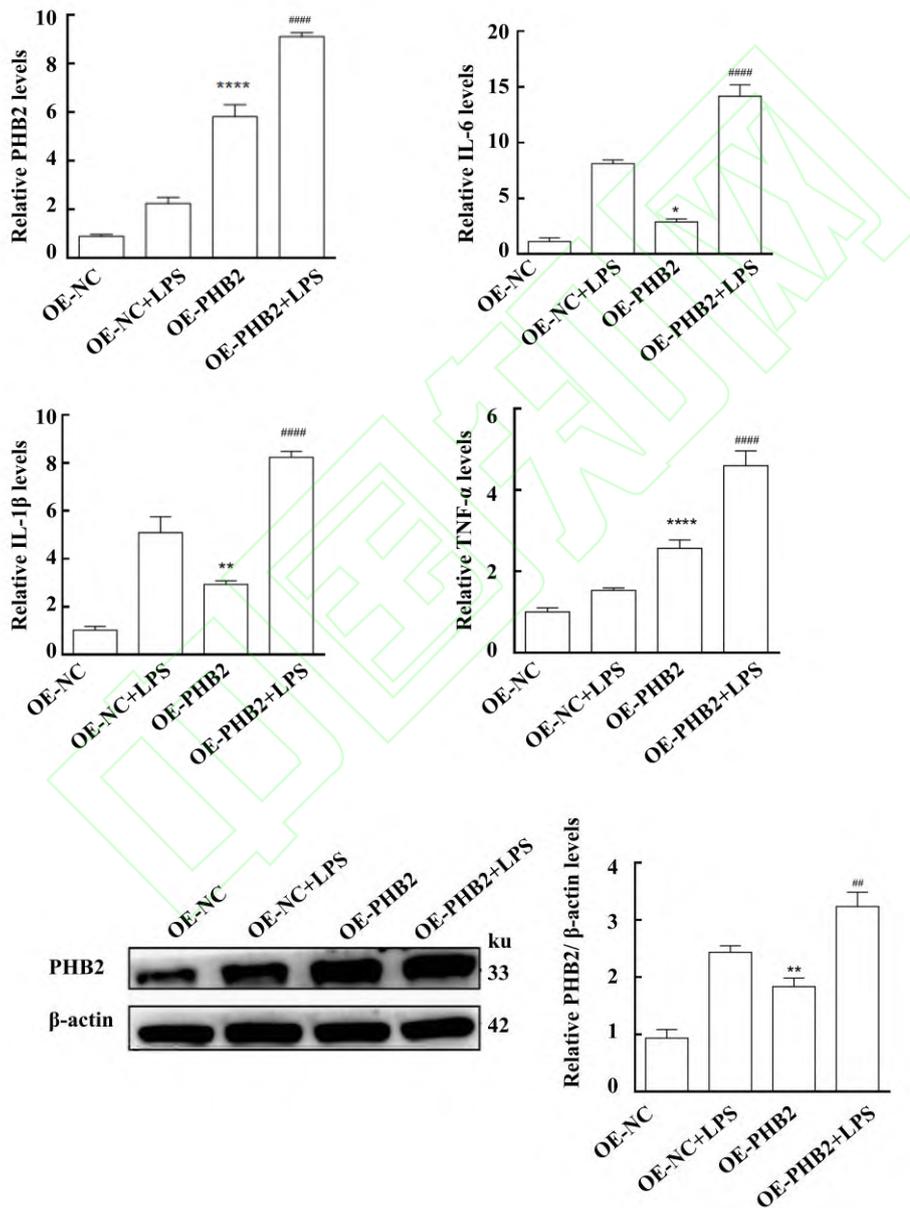
**2.4 PHB2 调控 LPS 诱导的炎症反应** 为阐明 PHB2 在炎症反应中的调控作用，该研究通过基因操作技术构建 PHB2 过表达质粒 (OE-PHB2) 及对照质粒，设计 PHB2 特异性 siRNA (si-PHB2) 及阴性对照 (si-NC)，将其作用于 MC3T3-E1 细胞。

**2.4.1 过表达 PHB2 加重细胞炎症反应** 将 PHB2 过表达质粒 (OE-PHB2) 及对照质粒作用于 MC3T3-E1 细胞，结果显示 (图 4A)，与对照组相比，OE-PHB2 组基础状态下，PHB2 表达量增加。LPS 刺激后，OE-PHB2+LPS 组与对照 OE-NC+LPS 组相比炎症因子 (IL-6、

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) 表达显著上调。

**2.4.2 敲低 PHB2 减轻细胞炎症反应** 将 PHB2 特异性 siRNA(si-PHB2)及阴性对照(si-NC) 作用于 MC3T3-E1 细胞,结果显示(图 4B),与对照组相比, si-PHB2 组基础状态下, PHB2 表达量减少。LPS 刺激后, si-PHB2+LPS 组与对照 si-NC+LPS 组相比炎症因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达显著减少。

A



B

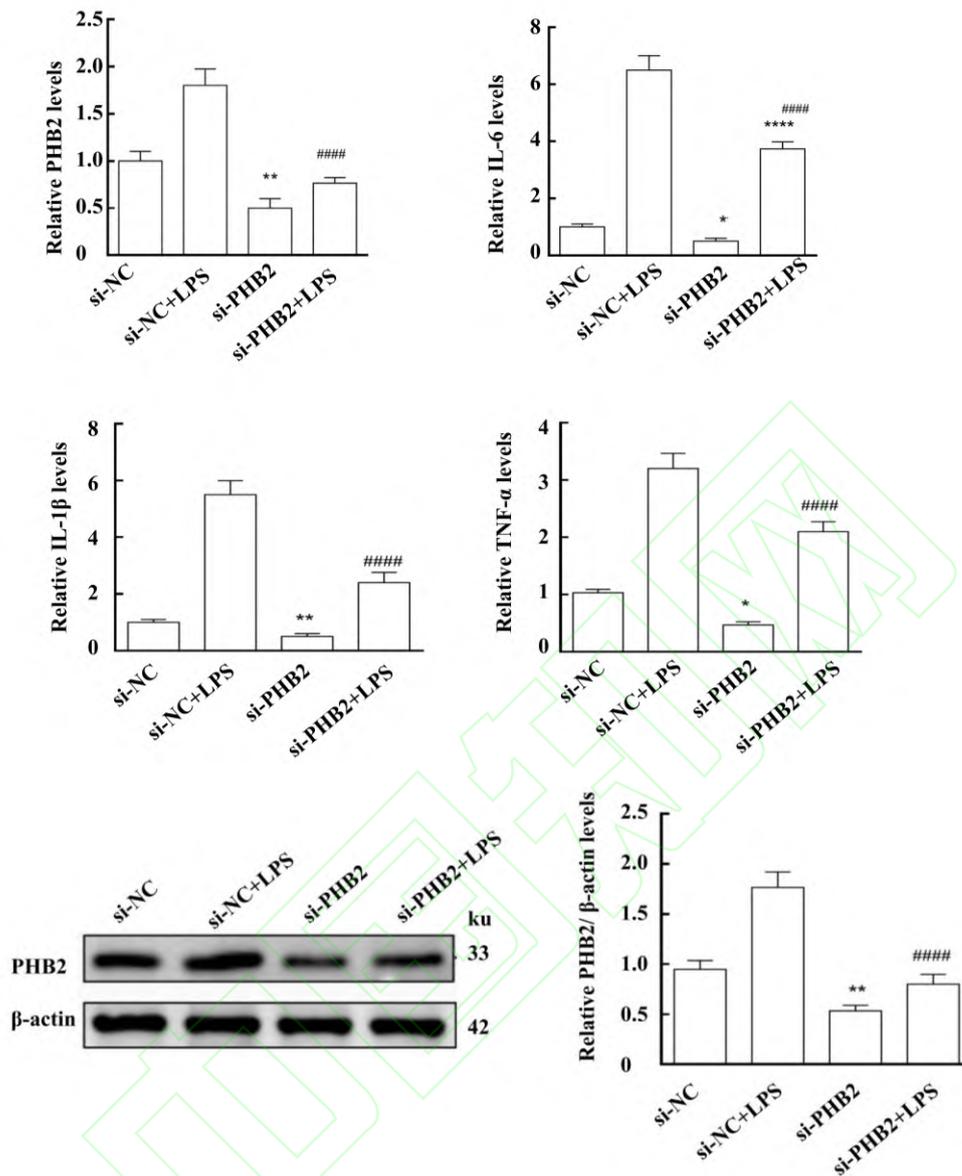


图4 过表达/敲低 PHB2 后炎症因子和 PHB2 的表达情况

Fig.4 The expression of inflammatory factors and PHB2 after the overexpression/knockdown of PHB2

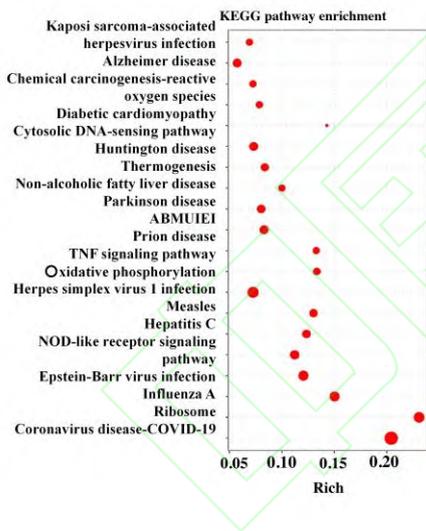
A: The expression of IL-6, IL-1β, TNF-α, and PHB2 mRNA following the overexpression of PHB2 and protein levels of β-actin and PHB2; B: The expression of IL-6, IL-1β, TNF-α, and PHB2 mRNA after the knockdown of PHB2 and protein levels of β-actin and PHB2; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs NC group; # $P < 0.01$ , #### $P < 0.0001$  vs NC+LPS group.

**2.5 PHB2 在体外牙周炎症模型中激活 NF-κB 信号通路中 p65 磷酸化** 为了进一步研究 PHB2 加重 LPS 诱导细胞炎症反应的机制, 该研究对 OE-NC+LPS 和 OE-PHB2+LPS 组细胞

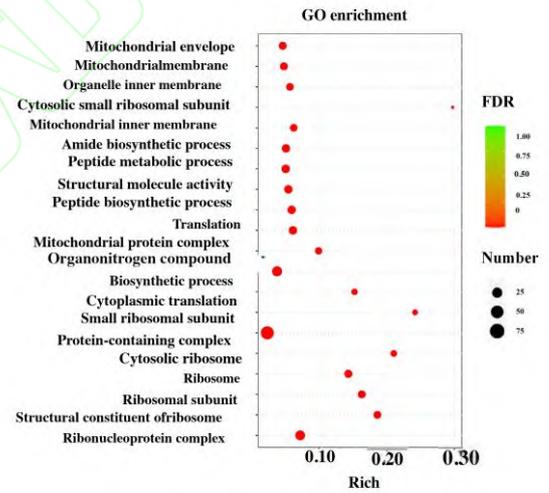
转录组测序后的基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析显示 (图 5A、5B), NF- $\kappa$ B 通路富集明显, 结合对 GEO 数据库中的 GSE16134 数据进行 GSEA 分析 (图 5C) 结合 Western blot 检测各组细胞中 p65 和磷酸化 p65 蛋白 (phosphorylation of p65 protein, p-p65) 的蛋白含量变化, 结果显示 (图 5D), 过表达 PHB2 后, p-p65/p65 值增大, 加重了 p65 的磷酸化反应, 激活 NF- $\kappa$ B 通路。

为探究 PHB2 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路加重 LPS 诱导的细胞炎症反应过程中其他基因的调控作用, 该研究对测序中上调和下调的基因进行筛选 (图 5E), 并构建相关过表达及敲低质粒, 作用于细胞待其稳定表达后, LPS 刺激细胞后进行验证, 结果显示 (图 6), 细胞中 PHB2 的表达量与 CXCL10 和炎症因子 (IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) 的表达量呈正相关。综合上述结果表明 PHB2 通过 NF- $\kappa$ B 通路加重 LPS 诱导牙周骨组织炎症, 并且 CXCL10 作为该通路下游基因参与其过程。

A



B



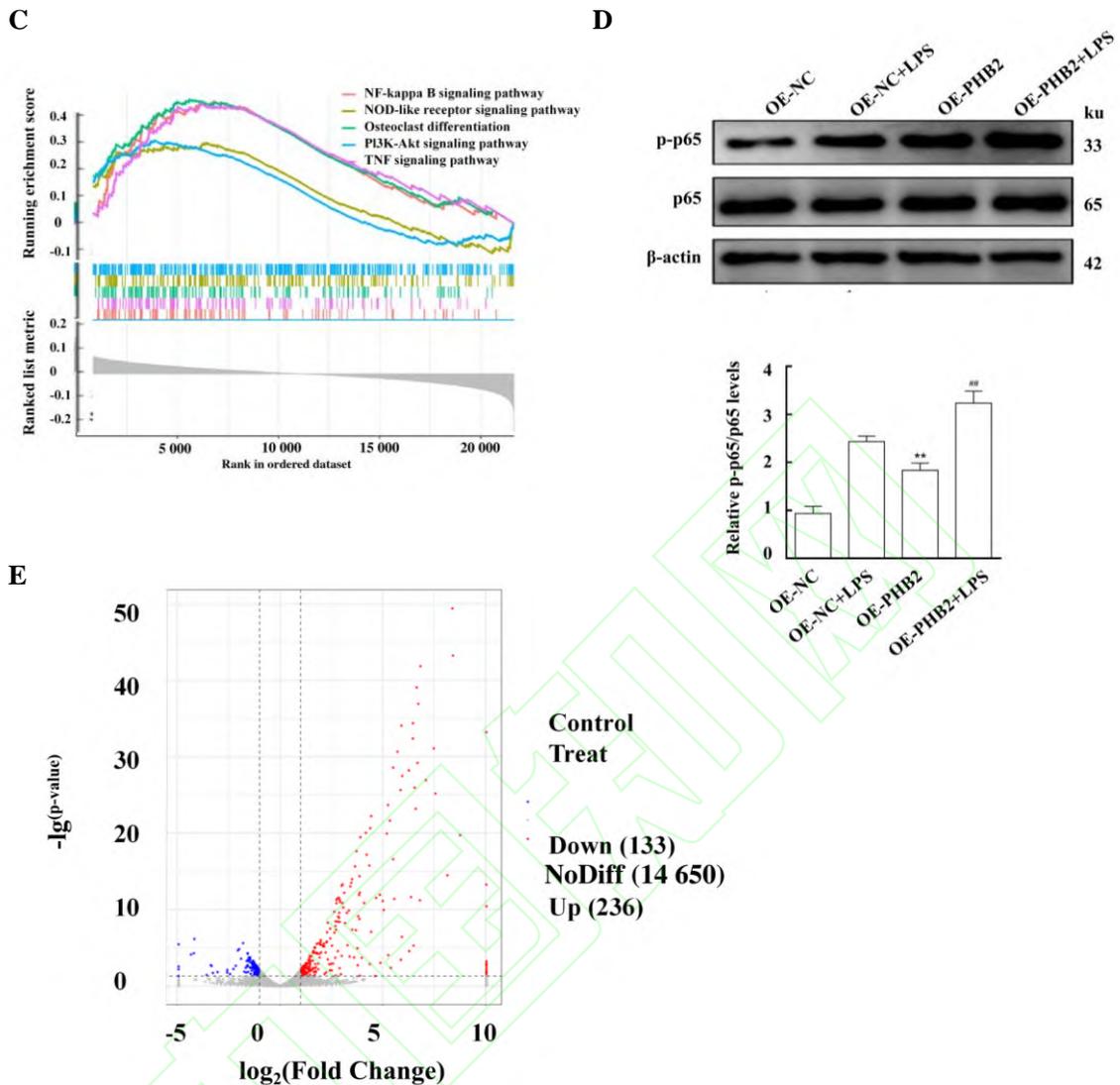
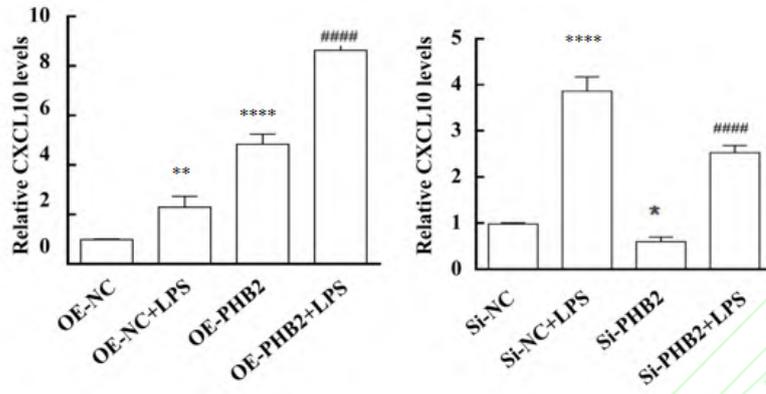


图 5 OE-NC+LPS 组 OE-PHB2+LPS 组细胞的高通量测序结果及 NF- $\kappa$ B 通路蛋白

Fig.5 High-throughput sequencing results and NF- $\kappa$ B pathway proteins of cells in OE-NC+LPS group and OE-PHB2+LPS group

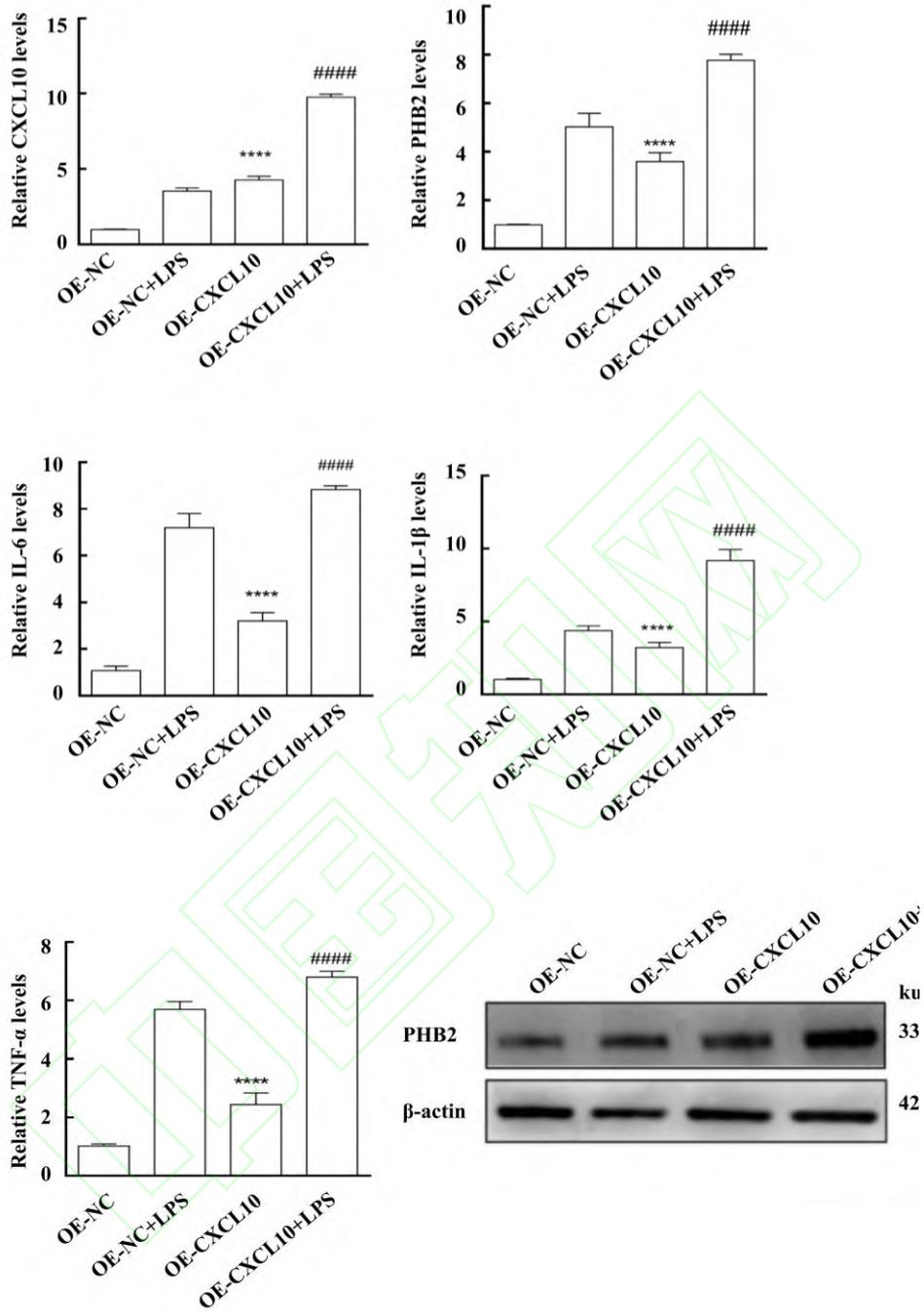
A: KEGG pathway map; B: GO enrichment map; C: GSEA database analysis diagram; D: Western blot was used to detect the expression of NF- $\kappa$ B pathway-related factors after the overexpression of PHB2; E: Up-and down-regulated genes in volcanic plot cells; \*\* $P < 0.01$  vs OE-NC group; ## $P < 0.01$  vs NC+LPS group.

A



中国知网

**B**



C

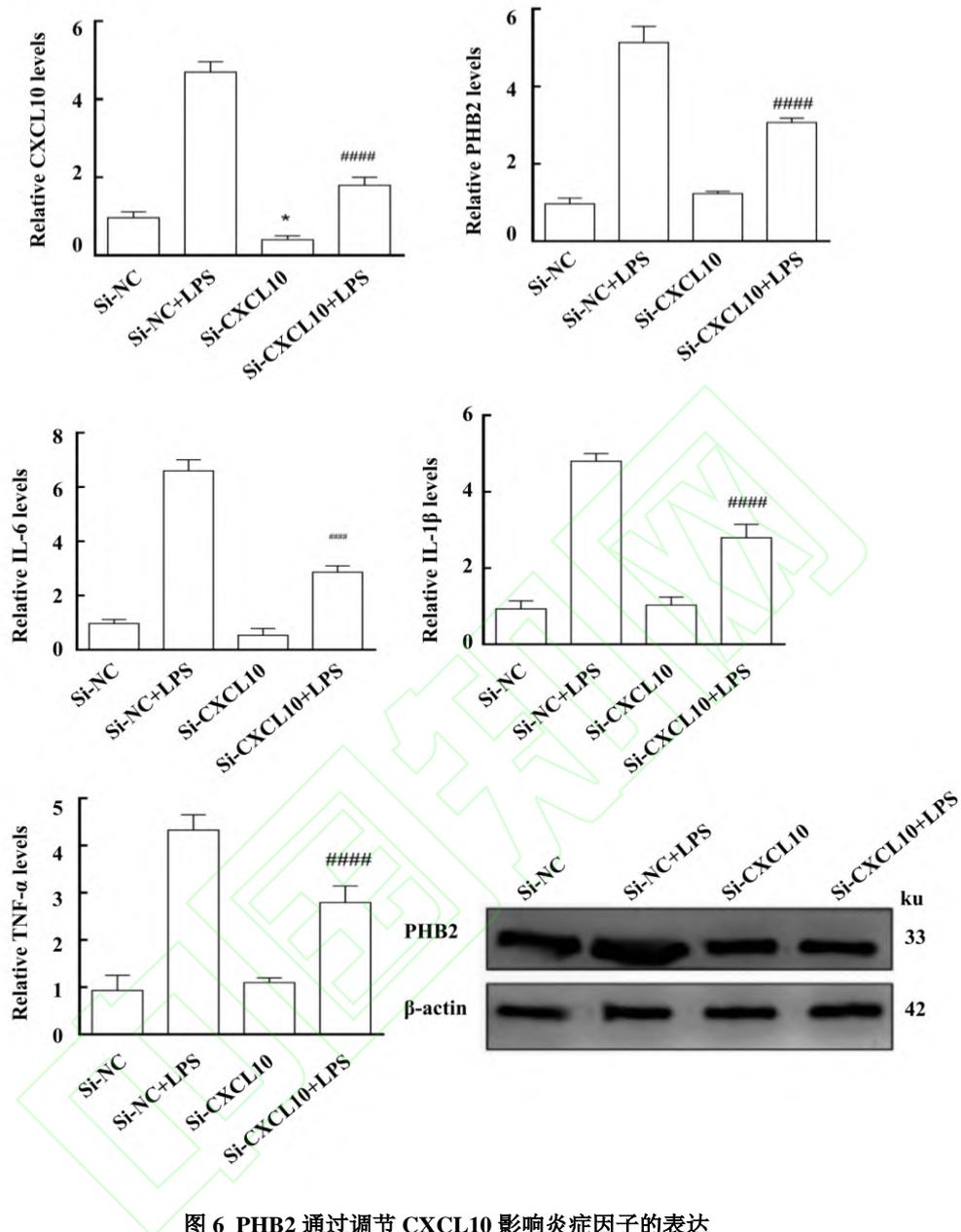


图 6 PHB2 通过调节 CXCL10 影响炎症因子的表达

Fig.6 PHB2 affects the expression of inflammatory factors by regulating CXCL10

A: CXCL10 expression after the overexpression or knockdown of PHB2; B: The expression of IL-6, IL-1β, TNF-α, CXCL10, and PHB2 mRNA and protein after the overexpression of CXCL10; C: The expression of IL-6, IL-1β, TNF-α, CXCL10, and PHB2 mRNA and protein after the knockdown of CXCL10; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs NC group; #### $P < 0.0001$  vs NC+LPS group.

### 3 讨论

牙周炎与多种人类全身系统性疾病密切相关<sup>[8-9]</sup>，如心脑血管疾病、类风湿关节炎、糖尿病等。其病因复杂，牙菌斑生物膜引发的宿主免疫炎症反应是导致牙周软硬组织破坏的核心机制。值得注意的是，在牙周炎进展过程中，牙槽骨的吸收往往呈不可逆性，而牙龈软组织的炎症在有效干预后可部分修复。因此，深入探究成骨细胞在炎症微环境中的生物学行为，对于阐明牙周炎骨破坏的分子机制具有重要的临床意义。本研究选用 MC3T3-E1 细胞作为研究对象，该细胞系作为经典的成骨前体细胞，在骨代谢及炎症相关研究中具有广泛的应用。

PHB2 是一种高度保守的蛋白质，在调控多种细胞功能中发挥作用，其中之一是参与细胞免疫炎症反应，在对缺血再灌注诱导的急性肝损伤及心肌模型中<sup>[10-11]</sup>，PHB2 的表达下降可抑制小鼠组织中的炎症浸润和细胞死亡，这与该研究结果一致，过表达 PHB2 后加重牙周炎症反应。PHB2 最初在细胞线粒体中被发现，参与维持线粒体功能，随后的研究揭示了其序列羧基端存在一个雌激素依赖的核定位信号序列，因此，它能够自由地在线粒体和细胞核之间穿梭，不同亚细胞位置的 PHB2 具有不同生物学功能，其中 PHB2 定位在细胞核中主要作为辅助转录因子调节转录因子活性进而影响功能<sup>[10]</sup>，在本研究中，PHB2 表达水平与 LPS 诱导的炎症反应呈正相关且 PHB2 在牙周骨组织炎症发病机制中发挥促炎作用，在这个过程中 PHB2 从细胞核中定向迁移至细胞质中加重牙周炎症反应可能是其通过影响线粒体功能以及线粒体自噬来影响细胞功能。

为了深入研究 PHB2 在牙周骨组织炎症中的调控机制，该研究通过对过表达表型高通量测序，结果显示，PHB2 参与了 NF- $\kappa$ B 信号通路的调控，并通过促进 p65 的磷酸化来激活 NF- $\kappa$ B 通路信号传递，从而促进相关炎性因子的表达。NF- $\kappa$ B 是一种可诱导的转录因子家族，参与多种炎症反应和免疫反应，该信号通路激活过程发生在细胞质中<sup>[12-13]</sup>，当细胞膜上的模式识别受体，如 toll 样受体被 LPS 激活后，通过信号转导，IKKs 会使 I $\kappa$ B 发生磷酸化作用，并且 I $\kappa$ B 会被泛素连接酶泛素化并降解于 26S 蛋白酶体中。这进而剥离了 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 结合的能力，使得 NF- $\kappa$ B 从 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 复合物中分离出来并迁移到细胞核内，在 DNA 上靶向基因启动子区域结合，并启动靶基因的转录过程，促进细胞分泌多种炎症因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ )，同时引发免疫反应<sup>[14-15]</sup>。根据一项关于骨和脂肪组织相互作用的研究<sup>[16]</sup>结果，显示 PHB2 通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路促进细胞免疫炎症因子释放，这与该研究结果一致。该研究在高通量测序的上调基因中筛选出趋化因子 CXCL10 参与 PHB2 经 NF- $\kappa$ B 信号通路加重 LPS 诱导的牙周骨组织炎症生物学过程，但其具体机制还有待深入研究。

综上所述，本研究通过体内外实验探讨了 PHB2 在牙周炎中的作用机制，结果显示，

PHB2 通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路加剧了 LPS 诱导的牙周炎症反应, 且 CXCL10 基因可能参与该调控过程。初步阐释了 PHB2 与牙周骨组织炎症之间的关系, 进一步加深了研究者对 PHB2 蛋白生物学作用的理解, 也为深入理解牙周炎的发病机制提供了新的实验依据, 同时也为未来靶向干预牙周炎相关骨破坏提供了潜在的研究方向。然而, 牙周炎的病理过程涉及多种细胞及分子网络的复杂调控, 未来研究将在体外实验研究的基础上对 NF- $\kappa$ B 信号通路的上下游调控因子进行分析, 同时进一步结合牙周膜成纤维细胞或牙龈成纤维细胞, 以更全面地解析牙周组织破坏与修复的分子机制, 为临床防治提供更精准的理论基础。

### 参考文献

- [1] Sanz M, Marco Del Castillo A, Jepsen S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: consensus report[J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(3): 268-88. doi:10.1111/jcpe.13189.
- [2] Graves D T, Ding Z, Yang Y. The impact of diabetes on periodontal diseases[J]. Periodontol 2000, 2020, 82(1): 214-24. doi:10.1111/prd.12318.
- [3] Yan C, Gong L, Chen L, et al. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis[J]. Autophagy, 2020, 16(3): 419-34. doi:10.1080/15548627.2019.1628520.
- [4] Lu Y, Li L, Li J, et al. Prx1/PHB2 axis mediates mitophagy in oral leukoplakia cellular senescence[J]. Pathol Res Pract, 2024, 260: 155411. doi:10.1016/j.prp.2024.155411.
- [5] Jin S H, Sun J J, Liu G, et al. Nrf2/PHB2 alleviates mitochondrial damage and protects against *Staphylococcus aureus*-induced acute lung injury[J]. MedComm, 2023, 4(6): e448. doi:10.1002/mco2.448.
- [6] Sánchez-Vera I, Saura-Esteller J, Núñez-Vázquez S, et al. The prohibitin-binding compound fluorizoline induces the pro-inflammatory cytokines interleukin-8 and interleukin-6 through the activation of JNK and p38 MAP kinases[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 218: 115860. doi:10.1016/j.bcp.2023.115860.
- [7] Xu Y, Shen J, Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases[J]. Autophagy, 2020, 16(1): 3-17. doi:10.1080/15548627.2019.1603547.
- [8] Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future[J]. Periodontol 2000, 2017, 75(1): 7-23. doi:10.1111/prd.12221.

- [9] Teles F, Collman R G, Mominkhan D, et al. Viruses, periodontitis, and comorbidities[J]. *Periodontol 2000*, 2022, 89(1): 190-206. doi:10.1111/prd.12435.
- [10] Zhang T, Wu P, Budbazar E, et al. Mitophagy reduces oxidative stress *via* Keap1 (kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1)/Nrf2 (nuclear factor-E2-related factor 2)/PHB2 (prohibitin 2) pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Stroke*, 2019, 50(4): 978-88. doi:10.1161/STROKEAHA.118.021590.
- [11] Ma Z, Zhang D, Sun J, et al. Formononetin inhibits hepatic I/R-induced injury through regulating PHB2/PINK1/parkin pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6481192. doi:10.1155/2022/6481192.
- [12] Kwon O Y, Lee S H. *Ishige okamurae* attenuates neuroinflammation and cognitive deficits in mice intracerebroventricularly injected with LPS *via* regulating TLR-4/MyD88-dependent pathways[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(1): 78. doi:10.3390/antiox12010078.
- [13] Mulero M C, Huxford T, Ghosh G. NF- $\kappa$  B, I $\kappa$  B, and IKK: integral components of immune system signaling[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1172: 207-26. doi:10.1007/978-981-13-9367-9\_10.
- [14] Matthews C E P, Fussner L A, Yaeger M, et al. The prohibitin complex regulates macrophage fatty acid composition, plasma membrane packing, and lipid raft-mediated inflammatory signaling[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2023, 190: 102540. doi:10.1016/j.plefa.2023.102540.
- [15] Sun S C. Non-canonical NF- $\kappa$  B signaling pathway[J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 71-85. doi:10.1038/cr.2010.177.
- [16] Su T, He Y, Huang Y, et al. Myeloid-derived grancalcin instigates obesity-induced insulin resistance and metabolic inflammation in male mice[J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 97. doi:10.1038/s41467-023-43787-x.