

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.04.006

补肾益气活血方及其单味药对人牙周膜干细胞增殖分化的影响*

马祯忆¹ 董春燕² 李露露³ 崔晓娜³ 孙 振⁴ 彭凤梅^{5Δ}

(1 潍坊医学院口腔医学院 山东 潍坊 261053; 2 滨州医学院口腔医学院 山东 滨州 256603;

3 潍坊医学院附属医院口腔科 山东 潍坊 261031; 4 山东医学高等专科学校口腔系 山东 临沂 276000;

5 山东第一医科大学第一附属医院口腔科 山东 济南 250014))

摘要 目的:探讨自拟补肾益气活血方及其单味药当归、补骨脂对体外培养的人牙周膜干细胞(hPDLSCs)增殖和相关成骨基因表达的影响。**方法:**分离培养得到 hPDLSCs,选取第 3 代 hPDLSCs,细胞增殖试剂盒(CCK-8)检测不同浓度(0 g/mL、 1×10^{-7} g/mL、 1×10^{-5} g/mL、 1×10^{-3} g/mL)补肾益气活血方和当归、补骨脂对 hPDLSCs 增殖的影响,并确定最佳作用浓度和最佳作用时间;通过定量聚合酶链式反应(qPCR)检测 Runt 相关转录因子 2(Runx2)、碱性磷酸酶(ALP)、骨桥蛋白(OPN)、骨钙蛋白(OCN)相关成骨基因的表达水平,通过茜素红染色观察细胞成骨分化情况。**结果:**与 0 g/mL 相比,补肾益气活血方各浓度在第一天和第三天时均能显著促进细胞增殖($P < 0.05$),且浓度为 1×10^{-5} g/mL 在第三天、第五天时效果均最为显著($P < 0.05$);当归同样在浓度为 1×10^{-5} g/mL、第三天及第五天时效果均最为显著($P < 0.05$);补骨脂则仅在第一天时能显著促进细胞增殖($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 1×10^{-5} g/mL 的补肾益气活血方、当归、补骨脂均能显著提升成骨相关 Runx2、OCN、OPN、ALP 的表达($P < 0.05$),且补肾益气活血方的上调效果最为显著。茜素红染色检测显示,补肾益气活血方可增加矿化结节,促进作用最为显著。**结论:**补肾益气活血方可促进 hPDLSCs 的增殖和骨向分化,在治疗慢性牙周炎中有望发挥更大作用。

关键词:补肾益气活血方;人牙周膜干细胞;细胞增殖;成骨分化

中图分类号:R781.4; R242 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)04-626-06

Effects of Bushen Yiqi Huoxue Recipe and Its Single Drug on Proliferation and Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells*

MA Zhen-yi¹, DONG Chun-yan², LI Lu-lu³, CUI Xiao-na³, SUN Zhen⁴, PENG Feng-mei^{5Δ}

(1 School of Stomatology, Weifang Medical College, Weifang, Shandong, 261053, China;

2 School of Stomatology, Binzhou Medical College, Binzhou, Shandong, 256603, China;

3 Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang, Shandong, 261031, China;

4 Department of Stomatology, Shandong Medical College, Linyi, Shandong, 276000, China;

5 Department of Dental, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan, Shandong, 250014, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of self-designed Bushen Yiqi Huoxue Recipe and its single drug *Angelica sinensis* and *Psoralea corylifolia* on the proliferation and osteogenic gene expression of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) in vitro. **Methods:** hPDLSCs were isolated and cultured. The third generation hPDLSCs were selected. Cell proliferation Kit (CCK-8) was used to detect the effects of different concentrations (0 g/mL, 1×10^{-7} g/mL, 1×10^{-5} g/mL, 1×10^{-3} g/mL) of Bushen Yiqi Huoxue Recipe, *Angelica sinensis* and *Psoralea corylifolia* on the proliferation of hPDLSCs, and the determine the best action concentration and the best action time were determined. The expression levels of Runt related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN) and Osteocalcin (OCN) related osteogenic genes were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), and the osteogenic differentiation was observed by alizarin red staining. **Results:** Compared with 0 g/mL, Bushen Yiqi Huoxue Recipe could significantly promote cell proliferation on the first day and the third day ($P < 0.05$), and the concentration of 1×10^{-5} g/mL had the most significant effect on the third day and the fifth day ($P < 0.05$). *Angelica sinensis* on the concentration of 1×10^{-5} g/mL also had the most significant effect on the third day and the fifth day ($P < 0.05$). *Psoralea corylifolia* could significantly promote cell proliferation only on the first day ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, 1×10^{-5} g/mL of Bushen Yiqi Huoxue Recipe, *Angelica sinensis* and *Psoralea corylifolia* could significantly increase the expression of Runx2, OCN, OPN and ALP ($P < 0.05$), and the up regulation effect of Bushen Yiqi Huoxue Recipe was the most significant. Alizarin red staining showed that Bushen Yiqi Huoxue Recipe could increase mineralized nodules, and the most significant effect was promoting. **Conclusion:** Bushen Yiqi Huoxue Recipe can promote the proliferation and

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81570989);山东省中医药科技发展计划项目(2013-200)

作者简介:马祯忆(1994-),女,硕士研究生,从事牙周病方向的研究,E-mail: zhaojun20210326@163.com

Δ 通讯作者:彭凤梅(1965-),女,硕士,主任医师,从事牙周病,牙体牙髓等方向的研究,E-mail: 632977765@163.com

(收稿日期:2021-04-28 接受日期:2021-05-23)

osteogenic differentiation of hPDLSCs, which is expected to play a greater role in the treatment of chronic periodontitis.

Key words: Bushen Yiqi Huoxue Recipe; Human periodontal ligament stem cells; Cell proliferation; Osteogenic differentiation

Chinese Library Classification(CLC): R781.4; R242 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)04-626-06

前言

牙周炎是导致牙齿缺失的主要病因^[1],其病程呈慢性发展趋势,随年龄增长或全身性疾病的发展而加重,研究发现牙周炎与糖尿病^[2]、冠心病^[3]、类风湿关节炎^[4]、阿尔茨海默病^[5]等全身性炎症反应有关联。目前临床上多采用局部牙周基础治疗辅之以口服抗生素等药物治疗牙周炎,针对性强,消除急性炎症快捷有效,但并不能促进牙周支持组织的修复与再生,且局部炎症易于复发,使得牙周炎的远期治疗效果差强人意。研究表明^[6],人牙周膜干细胞(human Periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)能在一定条件下分化成为较成熟的成牙骨质细胞和成纤维细胞,一定程度上可促进牙周组织的自我更新和修复。因此,扩充足够数量的hPDLSCs并促进其骨向分化则成为牙周组织再生的关键^[7]。中国传统医学依据辨证分型对牙周炎进行治疗并积累了丰富的牙周炎治疗经验^[8],中医认为牙齿的健康与肾中“精气”具有密切联系^[9]。本研究通过体外实验,探讨根据中医补肾益气治则拟定的补肾益气活血方及其中两种单味药对hPDLSCs的影响,探讨中医药治疗牙周炎的内在原理,验证中草药在恢复牙周组织方面的有效性,为中西医结合治疗牙周炎提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 补肾益气活血方

补肾益气活血方由本课题组根据传统医学的辨证理论首次提出,该方由黄芪、当归、川芎、白术、茯苓、熟地、枸杞、补骨脂、肉桂、丹皮、菊花、黄芩、川牛膝等药物组成,单味药选定为当归和补骨脂。所有药材均购自济南宏济堂,由山东省第一医科大学第一附属医院中医科鉴定为正品。

1.2 试剂与仪器

MEM α 培养基(武汉,普诺赛),胎牛血清(北京,索莱宝),PBS(上海,双螺旋),胰酶(上海, Gibico), β -甘油磷酸酯(北京,索莱宝),地塞米松(北京,索莱宝),抗坏血酸(北京,索莱宝),细胞增殖及细胞毒性检测试剂(沈阳,万类生物),茜素红染色液(北京,索莱宝),TRIpure(北京, BioTeke), 2 $\times$ Power Taq PCR Master Mix(北京, BioTeke), SYBR Green(北京, BioTeke), 酶标仪(美国, BIOTEK), 荧光定量PCR仪(韩国, BIONEER)。

1.3 药剂制备

称取药材,以料液比 1:5 加入纯净水,室温浸泡 60 min 后煎煮 45 min,趁热抽滤,得滤液,滤渣再以料液比 1:5 加入纯净水,煎煮 30 min,趁热抽滤,合并 2 次滤液。称量滤液体积后加入 4 倍量 90%乙醇(缓慢加入,搅拌均匀),静置过夜,离心,去除沉淀得上清液。将上清液至于旋转蒸发仪中浓缩,浓缩液离心 5 min(3000 r/min),取上清液用纯净水定容至 1 g/mL。用含有 10% FBS 的 α -MEM 培养基将其稀释成 1×10^{-7} g/mL、 1×10^{-5} g/mL、 1×10^{-3} g/mL 浓度的条件培养基。

1.4 hPDLSCs 的分离培养^[10,11]

经患者知情同意后,取 12-24 岁之间因正畸或阻生而拔除的无病变牙齿,用含双抗 PBS 反复冲洗,刮取根中三分之一的牙周膜,修剪为 1 mm³ 大小,以探针将组织块移至培养瓶中平铺,加适量含 10%FBS、1%的青霉素和链霉素的完全培养基,放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养,约 4 h 后谨慎轻缓将培养瓶翻面,放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱,每 3 d 换液,细胞长至孔底 80%左右时,分离纯化。以免疫磁珠法筛选纯化 hPDLSCs,取出细胞,向培养瓶中加入 STRO-1 单抗,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱 1 h。PBS 清洗三次,90 $\times$ g 离心 3 min,去上清,重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 下与加入清洗后的免疫磁珠共育 30 min。准备磁力架,将 EP 管放置其上,保持约 3 min。用移液器谨慎吸出上清以及没有同磁珠贴合的细胞。PBS 清洗两次,上清弃除,加入 5 mL 完全培养基加入沉淀中使细胞重新悬浮,再次调整细胞浓度为 1×10^4 /mL,放入培养箱中继续培养。利用免疫荧光法鉴定细胞中 STRO-1 蛋白表达确定 hPDLSCs 成功培养。

1.5 细胞增殖试剂盒(CCK-8)法检测药剂对 hPDLSCs 增殖的影响

取生长良好的第三代 hPDLSCs,将细胞消化离心,进行细胞计数。将细胞接种于 96 孔培养板中,每孔的细胞个数为 3×10^3 个,每组设计 5 个复孔。接种后置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养代细胞贴壁。细胞贴壁后,将培养基更换成 0 g/mL、 1×10^{-7} g/mL、 1×10^{-5} g/mL、 1×10^{-3} g/mL 不同浓度的组方中药、当归单味药和补骨脂单味药培养基。培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱内培养 1 天、3 天、5 天。弃去上清,每孔分别加入 100 μ L 的完全培养基。每孔加入 10 μ L CCK-8,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱内培养 1h。在酶标仪上测定其在 450nm 处 OD 值,筛选最佳药物浓度和最佳作用时间以便后续实验使用。

1.6 定量聚合酶链式反应(qPCR)检测成骨相关基因

实验分组按空白组、阳性对照组、最佳浓度补肾益气活血方处理组、最佳浓度单味药当归处理组、最佳浓度单味药补骨脂处理组,用含有 10% FBS、10 mM β -甘油磷酸酯、10 nM 地塞米松和 50 μ g/mL 抗坏血酸的 α -MEM 培养基作为成骨诱导液^[12],空白组仅加入培养基,阳性对照组加入上述成骨诱导液,实验组分别以 1×10^{-5} g/mL 浓度相应药物的含药成骨诱导液处理。成骨诱导 7 天后,收集上述六孔板细胞,提取总 RNA,测定各样本中 RNA 的浓度,按试剂盒说明反转录为 cDNA,检测 Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor-2, Runx2)、碱性磷酸酶(A Lkaline Phosphatase, ALP)骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)基因的表达量,以 β -actin 为内参对照。引物序列详见表 1。

1.7 茜素红染色检测矿化结节

成骨诱导 14 天后,收集上述六孔板细胞,去除各孔培养基,用 PBS 洗 2 次。使用 4%多聚甲醛室温固定 15 min。弃去固定液,用蒸馏水洗 3 次,加入茜素红染色液染色 30 min。去除染

表 1 基因引物序列(5'→3')
Table 1 Gene primer sequence(5'→3')

Gene	Primer sequence
ALP	Forward primer CCCTTCCTGGTGCTGCTT
	Downstream primer CCTCCTTGTTGGGTTTGG
OCN	Forward primer GAAGAGGAGGGAGAATGTTG
	Downstream primer CACTGAAGGGTCTGGTAGGA
OPN	Forward primer AAGAAGTTTCGACAGACC
	Downstream primer CTGTCCCAATCAGAAGG
Runx2	Forward primer TCAGGCATGTCCCTCGGTAT
	Downstream primer GGCTTCCATCAGCGTCAA
β -actin	Forward primer GGCACCCAGCACAAATGAA
	Downstream primer TAGAAGCATTTGCGGTGG

液,用蒸馏水洗 3 次,拍照。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析。经检验计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析+LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾益气活血方及其单味药对 hPDLSCs 增殖的影响

经免疫荧光检测 CCK-8 检测本实验成功分离培养了 hPDLSCs。结果显示,0 g/mL 时 hPDLSCs 的 OD 值随时间增加逐渐升高,细胞生长状态良好。组方和单味药与细胞共育一天后细胞活力未明显下降,说明三种药对细胞无明显毒性。与 0 g/mL

相比,补肾益气活血方各浓度在第一天和第三天时均能显著促进细胞增殖($P < 0.05$),而在第五天时仅浓度为 1×10^{-5} g/mL 的补肾益气活血方能显著促进细胞增殖($P < 0.05$),且浓度为 1×10^{-5} g/mL 在第三天、第五天时效果均最为显著($P < 0.05$);当归同样在浓度为 1×10^{-5} g/mL、第三天及第五天时效果均最为显著($P < 0.05$);补骨脂则仅在第一天时能显著促进细胞增殖($P < 0.05$)。本研究重点验证补肾益气活血方能否促进 hPDLSCs 成骨分化及其与两种单味药的效果对比,故选定浓度为 1×10^{-5} g/mL 的组方和单味药用于细胞周期实验和成骨分化实验。以上结果说明补肾益气活血方及当归和补骨脂在特定时间和浓度上均能显著促进 hPDLSCs 增殖,且补肾益气活血方效果更为明显。见表 2~ 表 4。

表 2 CCK8 法检测第一天细胞增殖情况($n=5, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Cell proliferation on the first day detected by CCK8 method($n=5, \bar{x} \pm s$)

On the first day	Bushen Yiqi Huoxue Recipe	Angelica sinensis	Psoralea corylifolia
0 g/mL	0.422±0.043	0.435±0.034	0.412±0.054
1×10^{-7} g/mL	0.650±0.105*	0.564±0.079	0.609±0.081*
1×10^{-5} g/mL	0.596±0.065*	0.582±0.088	0.620±0.100*
1×10^{-3} g/mL	0.585±0.053*	0.535±0.053*	0.560±0.089
F	9.733	4.839	6.746
P	0.001	0.014	0.004

Note: compared with 0 g/mL, * $P < 0.05$

表 3 CCK8 法检测第三天细胞增殖情况($n=5, \bar{x} \pm s$)
Table 3 Cell proliferation on the third day detected by CCK8 method ($n=5, \bar{x} \pm s$)

On the third day	Bushen Yiqi Huoxue Recipe	Angelica sinensis	Psoralea corylifolia
0 g/mL	0.738±0.070	0.739±0.052	0.785±0.067
1×10^{-7} g/mL	1.098±0.101*	0.893±0.123	0.861±0.121
1×10^{-5} g/mL	1.249±0.157*	1.057±0.115*	0.892±0.084
1×10^{-3} g/mL	1.003±0.100*	0.901±0.0096*	0.844±0.125
F	18.582	8.351	0.957
P	0.000	0.001	0.437

Note: compared with 0 g/mL, * $P < 0.05$.

表 4 CCK8 法检测第五天细胞增殖情况 ($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 4 Cell proliferation on the fifth day detected by CCK8 method ($n=5, \bar{x} \pm s$)

On the fifth Day	Bushen Yiqi Huoxue Recipe	Angelica sinensis	Psoralea corylifolia
0 g/mL	0.997±0.104	0.979±0.136	1.007±0.106
1×10 ⁻⁷ g/mL	1.203±0.123	1.047±0.147	1.073±0.142
1×10 ⁻⁵ g/mL	1.427±0.133*	1.287±0.121*	1.212±0.142
1×10 ⁻³ g/mL	1.185±0.170	1.100±0.131	0.952±0.110
F	8.574	4.861	3.959
P	0.001	0.014	0.027

Note: compared with 0 g/mL, * $P<0.05$.

2.2 补肾益气活血方及其单味药对 hPDLSCs 成骨分化能力的影响

成骨诱导 7 天后进行 qPCR 检测。结果表明 1×10⁻⁵ g/mL 的补肾益气活血方、当归、补骨脂与空白对照组相比,均能显著

提升成骨相关 Runx2、OCN、OPN、ALP 的表达($P<0.05$),且补肾益气活血方的上调效果最为显著(见图 1)。上述结果表明 1×10⁻⁵ g/mL 的补肾益气活血方及其单味药当归补骨脂水提醇沉液均能促进 hPDLSCs 成骨分化,且组方效果更为明显。

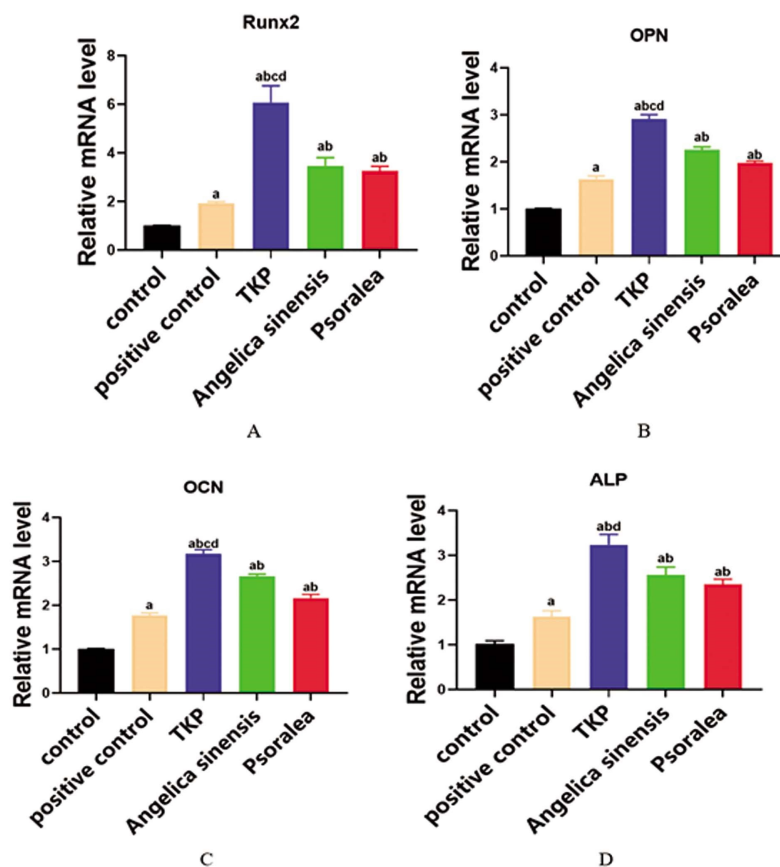


图 1 各组成骨相关基因比较

Fig. 1 Comparison of bone related genes among different components

Note: TKP group is Bushen Yiqi Huoxue Recipe group. Compared with blank control group, * $P<0.05$; compared with positive control group, ^b $P<0.05$; compared with Angelica sinensis group, ^c $P<0.05$; compared with Psoralea corylifolia, ^d $P<0.05$.

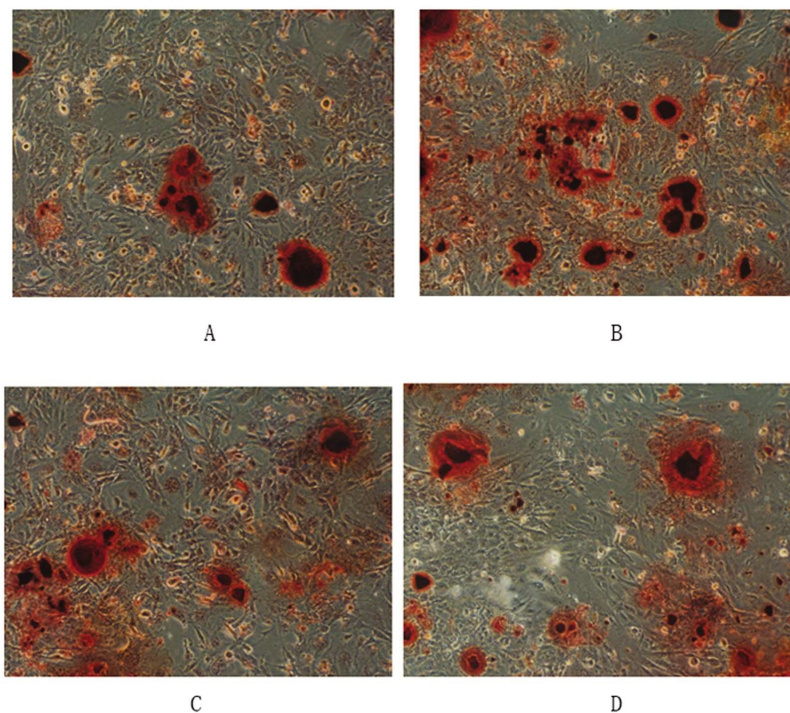
2.3 茜素红染色检测矿化结节

成骨诱导 14 天进行茜素红染色检测,结果显示补肾益气活血方组(图 2B)较阳性对照组(图 2A)矿化结节明显增多,颜色染色加深,钙化结节面积明显大于阳性对照组。当归组(图 2C)和补骨脂组(图 2D)较阳性对照组(图 2A)矿化结节也有所增多,颜色加深,结节面积相比于阳性对照组有所增大,但明显

少于补肾益气活血方组(图 2B)。

3 讨论

牙周炎是目前导致牙列缺失的主要原因^[13,14],消除炎症、促进已缺失的牙周组织再生是治疗牙周炎的两大主要目的。临床局部基础治疗对于消除炎症快捷有效,而促进缺失组织再生尚

图2 茜素红染色结果(标尺:100 μ m)Fig. 2 Alizarin red staining results (scale: 100 μ m)

Note: A: positive control group; B: Bushen Yiqi Huoxue Recipe group; C: Angelica sinensis group; D: Psoralea corylifolia group

无有效办法。hPDLSCs 具有多向分化的潜能,可形成类似于天然的牙周膜样结构^[15,16],是牙周再生组织工程的首选种子细胞^[17]。然而牙周炎抑制了受损位置 hPDLSCs 的增长,因此促进 hPDLSCs 数量增加和活性增强就成为牙周组织恢复的关键。

中医认为“齿者,骨之所终,髓之所养,肾实主之”,特别是慢性牙周炎与肾精亏损、肾气衰微有密切联系^[18]。临床上中医主要依据辨证分型和补肾益气治则进行治疗,着眼于增强整体免疫功能,通过补充肾精、行气活血使牙周抗菌能力和自我修复能力随之增强。中药为纯天然材料,与人体有更好的生物相容性,既可以起到消毒抑菌的作用,又能促进良好牙周生长环境的形成,推动牙周组织尽快修复。

已有研究发现,知柏地黄丸^[19]、六味地黄丸^[20]、扶脾温肾汤^[21]等补肾类组方在临床上治疗牙周炎有显著效果。在基础研究中,补肾类方剂对成骨细胞、干细胞的积极影响同样被证实^[22];二仙汤含血清可提高成骨细胞 ALP 活性和 OCN、BMP-2 的表达^[23];补肾活血汤能提高骨髓间充质干细胞(BMSCs)的 Runx2 和 Osterix 的表达,促进其成骨分化^[24];左、右归丸能促进 BMSCs 分化成骨细胞^[25]。当归和补骨脂的提取物或水提液亦能促进成骨细胞、BMSCs 的增殖和骨向分化^[26-28]。

本研究中,利用组织块法成功分离了 hPDLSCs, CCK-8 检测结果显示补肾益气活血方能显著促进 hPDLSCs 增殖,且效果较单味药当归、补骨脂更为明显,浓度 1×10^{-5} g/mL 时促进增殖的效果最佳,补肾益气活血方能提升 hPDLSCs 的增殖能力,促进细胞数量增加。ALP 是细胞早期骨向分化的标记物^[29], Runx2 是反映细胞成骨作用的关键因子, Runx2、ALP、OCN、OPN 是指示细胞成骨活性的指标^[30-32]。本研究发现,补肾益气活血方及当归、补骨脂单药均可显著上调 Runx2、ALP、OCN、

OPN 的表达水平,且补肾益气活血方上调最多。细胞成骨分化后期会出现钙沉积,产生矿化结节,茜素红染色检测结果显示补肾益气活血方治疗后矿化结节面积扩大,且比单味药效果更为明显。上述结果都显示,补肾益气活血方可促进 hPDLSCs 的成骨分化,这些结果验证了中医补肾益气治则拟定的中草药组方在促进 hPDLSCs 的增殖分化方面的有效性。

另外,本研究发现组方具有更好的协同作用。本实验中自拟补肾益气活血方是本课题组依据中医辨证分型理论与现代医学观点,针对气血不足型和肾阴亏损型牙周炎进行组方。由于组方按照“君臣佐使”将十余种中药配伍而成,各味中药协同起效发挥作用,较之当归、补骨脂的“独自作战”效果更为显著,这也验证了中医辨证施治和整体理论的科学性。具体来说黄芪补气固表^[33],当归补气和血^[34],熟地补脾益肾^[35],枸杞益精补血各味药合用以求补精益气、活血固齿功效,在人体内复杂的环境中,多角度、多位点、多靶向提升机体免疫能力,促进牙周组织修复和再生,细胞实验结果也说明组方较其他单味药具有更好的协同作用。

综上所述,本研究发现了补肾益气活血方能有效提升体外培养的 hPDLSCs 增殖和成骨分化的能力,且效果较当归和补骨脂单味药更佳。这一结果从细胞生物学和牙周组织工程的角度为中医药相关组方药应用于慢性牙周炎的临床治疗提供了实验支撑,对补肾益气活血方剂用于临床上治疗慢性牙周炎具有指导意义。

参考文献(References)

- [1] Kim H, Shin MH, Yoon SJ, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D levels, tooth loss, and the prevalence of severe periodontitis in Koreans aged 50 years and older [J]. J Periodontal Implant Sci, 2020,

- 50(6): 368-378
- [2] Shelswell J. Does periodontal treatment have an impact on metabolic control and systemic inflammation in patients with type 2 diabetes? [J]. Evid Based Dent, 2021, 22(1): 40-41
- [3] Wojtkowska A, Zapolski T, Wysokińska-Miszczuk J, et al. The inflammation link between periodontal disease and coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: case-control study[J]. BMC Oral Health, 2021, 21(1): 5
- [4] Manzo C, Kechida M. Periodontitis and rheumatoid arthritis: three messages from published literature to clinical practice [J]. Reumatologia, 2020, 58(5): 339-340
- [5] Kantarci A, Tognoni CM, Yaghoor W, et al. Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18561
- [6] Tomokiyo A, Wada N, Maeda H, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium [J]. Stem Cells Dev, 2019, 28(15): 974-985
- [7] Cedryck V, Pilipchuk SP, Mark BP, et al. Tissue Engineered Constructs for Periodontal Regeneration: Current Status and Future Perspectives[J]. Advanced Healthcare Materials, 2018, 7(21): e1800457
- [8] 李敏, 高毅, 王竞超, 等. 慢性牙周炎的中医辨证施治临床研究[J]. 河北中医药学报, 2015, 30(2): 25-27
- [9] 张丽. 齿为 "骨之余" 在临床治疗牙痛中的体会[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(1): 113-114
- [10] 徐斌, 徐婕, 刘宏伟. 人牙周膜干细胞的分离培养及体外诱导分化研究[J]. 口腔医学研究, 2011, 27(8): 702-705
- [11] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. Lancet, 2004, 364(9429): 149-155
- [12] Chen SC, Marino V, Gronthos S, et al. Location of putative stem cells in human periodontal ligament [J]. J Periodontal Res, 2010, 41(6): 547-553
- [13] 周维君, 车英林, 苏野, 等. 牙周组织再生术联合正畸治疗对牙周炎患者牙周状况及满意度的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(9): 1683-1686, 1691
- [14] Weider M, Schröder A, Docheva D, et al. A Human Periodontal Ligament Fibroblast Cell Line as a New Model to Study Periodontal Stress[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 7961
- [15] Xiang J, Bian Y. PWAR6 interacts with miR 106a 5p to regulate the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(4): 1
- [16] Li J, Wang Z, Huang X, et al. Dynamic proteomic profiling of human periodontal ligament stem cells during osteogenic differentiation[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 98
- [17] Liang Q, Du L, Zhang R, et al. Stromal cell-derived factor-1/Exendin-4 cotherapy facilitates the proliferation, migration and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in vitro and promotes periodontal bone regeneration in vivo [J]. Cell Prolif, 2021, 54(3): e12997
- [18] 裴霞, 华红, 徐治鸿. 中医药在牙周疾病的临床应用 [J]. 现代口腔医学杂志, 2001, 15(2): 151-152
- [19] 张芳, 陈燕, 蔡哲, 等. 补肾养阴清火法治疗慢性牙周炎的临床疗效和对龈沟液中 IL-1 β 、IL-6 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(12): 4324-4327
- [20] 汪婷婷, 申林, 苏阳. 六味地黄丸用于绝经期牙周炎患者牙周治疗临床评价[J]. 中国药业, 2017, 26(1): 71-73
- [21] 张芳, 路东升, 蔡哲, 等. 扶脾温肾汤对 8 例牙周炎患者成骨的评价[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 268-271
- [22] Liao J, Zhao L, Yoshioka M, et al. Effects of Japanese traditional herbal medicines (Kampo) on growth and virulence properties of *Porphyromonas gingivalis* and viability of oral epithelial cells [J]. Pharm Biol, 2013, 51(12): 1538-1544
- [23] 刘波, 王莹, 谢珍, 等. 二仙汤及其拆方含药血清对成骨细胞分化的影响[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(1): 22-27
- [24] 程英雄, 罗毅文, 王斌, 等. 补肾活血汤调控 Runx2 及 Osterix 促进 BMSCs 成骨分化的作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(8): 1085-1088
- [25] 孙千惠, 任艳玲, 吴琮, 等. 左、右归丸对去卵巢大鼠 BMSCs 成骨、成脂分化后 Caspase-3/Bcl-2 的影响 [J]. 中成药, 2017, 39(10): 2004-2008
- [26] Li WD, Yan CP, Wu Y, et al. Osteoblasts proliferation and differentiation stimulating activities of the main components of *Fructus Psoraleae corylifoliae*[J]. Phytomedicine, 2014, 21(4): 400-405
- [27] 廖锋, 刘瑶, 刘航航, 等. 当归多糖对高糖状态下大鼠骨髓间充质干细胞成骨向分化的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2019, 37(2): 193-199
- [28] Zhao H, Alexeev A, Sharma V, et al. Effect of SBD.4A--a defined multicomponent preparation of *Angelica sinensis* in periodontal regeneration models[J]. Phytother Res, 2008, 22(7): 923-928
- [29] Merlo P, Rochlitz C, Osthoff M. The Alkaline Phosphatase Flare Phenomenon: A Transient Substantial Increase in Alkaline Phosphatase Concentration in a Prostate Cancer Patient after Starting GnRH Agonist Treatment[J]. Case Rep Oncol, 2021, 14(1): 73-77
- [30] Sun X, Xie Z, Ma Y, et al. TGF- β inhibits osteogenesis by upregulating the expression of ubiquitin ligase SMURF1 via MAPK-ERK signaling[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(1): 596-606
- [31] 宋敏, 巩彦龙, 董平, 等. 基于 BMP-Smad/RUNX2 信号通路探讨固本增骨方含药血清对大鼠 BMSCs 增殖和成骨分化的影响[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2020, 22(4): 1159-1165
- [32] 景彦, 王欢. GsRg1 对牙周膜干细胞增殖作用及对 RUNX2、OPN 和 OCN 指标的影响探究 [J]. 临床口腔医学杂志, 2018, 34(12): 715-719
- [33] 胡妮娜, 张晓娟. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(1): 76-82
- [34] 刘如秀, 刘宇, 汪艳丽, 等. 当归的药理作用 [J]. 西部中医药, 2014, 27(11): 153-156
- [35] 周国威, 夏天卫, 文志, 等. 熟地黄治疗痹证的中医认识及药理学研究进展[J]. 中医药导报, 2019, 25(20): 125-128