

网络出版时间:2025-10-28 13:50:44 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251027.1507.010

白头翁皂苷 B4 通过 NOS3-DHFR 轴对口腔扁平苔藓 上皮细胞谷氨酰胺代谢的影响及作用机制

李 敏,杨梦华,高 毅,张子建,江 丹

(河北省中医院口腔科,石家庄 050011)

摘要 **目的** 探究白头翁皂苷 B4(AB4)通过一氧化氮合酶 3(NOS3)-二氢叶酸还原酶(DHFR)轴对口腔扁平苔藓(OLP)上皮细胞谷氨酰胺代谢的影响及其作用机制。**方法** 生物信息学分析 OL P 的分子靶点、AB4 的分子靶点与谷氨酰胺代谢相关基因交集。使用脂多糖(LPS)诱导人口腔角质细胞 HOK-16B 构建 OL P 细胞模型。将 HOK-16B 细胞分为 7 组:Ctrl、OLP、AB4、OLP + oe-NOS3、OLP + sh-NOS3、OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR、OLP + sh-NOS3 + AB4 组,细胞计数试剂盒 8(CCK-8)检测细胞增殖;末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡率;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒检测细胞上清液中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的浓度,试剂盒测定谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量;蛋白质印迹测定 Na 依赖性谷氨酰胺载体 2(ASCT2)与谷氨酰胺合成酶(GLS)蛋白表达。**结果** 生物信息学分析 OL P、AB4 的分子靶点与谷氨酰胺代谢相关基因,共得到 3 个交集靶点,分别为 *NFE2L2*、*NOS1*、*NOS3*。与 Ctrl 组相比,OLP 组 HOK-16B 细胞活力降低($P < 0.001$)、凋亡率增加($P < 0.01$),IL-1 β 与 TNF- α 浓度上调($P < 0.001$),谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量升高($P < 0.01$),ASCT2 与 GLS 蛋白表达增强($P < 0.001$)。与 OLP 组相比,AB4 组细胞活力改善($P < 0.05$),细胞凋亡率与 IL-1 β 与 TNF- α 释放减少($P < 0.05$)($P < 0.05$),谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量降低($P < 0.05$),ASCT2 与 GLS 蛋白表达下降($P < 0.001$)。与 OLP 组相比,OLP + oe-NOS3 组 HOK-16B 细胞活力增加($P < 0.01$)、凋亡率减少($P < 0.05$),IL-1 β 与 TNF- α 浓度下降($P < 0.05$),谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量降低($P < 0.05$),ASCT2 与 GLS 蛋白表达减弱($P < 0.01$);而 OLP + sh-NOS3 组 HOK-16B 细胞活力降低($P < 0.05$)、凋亡率增加($P < 0.05$),IL-1 β 与 TNF- α 浓度上升($P < 0.01$),谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量上调($P < 0.05$),ASCT2 与 GLS 蛋白表达增强($P < 0.001$)。与 OLP + sh-NOS3 组相比,OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR 组与 OLP + sh-NOS3 + AB4 组 HOK-16B 细胞活力均增加($P < 0.001$)、凋亡率减少($P < 0.05$),IL-1 β 与 TNF- α 浓度下降($P < 0.01$),谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量降低($P < 0.05$),ASCT2 与 GLS 蛋白表达减弱($P < 0.05$)。**结论** AB4 通过调控 NOS3-DHFR 轴介导谷氨酰胺代谢进而抑制 OL P 进展。

关键词 白头翁皂苷 B4;一氧化氮合酶 3;二氢叶酸还原酶;谷氨酰胺代谢;口腔扁平苔藓

中图分类号 R 780.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2059-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.010

口腔扁平苔藓(oral lichen planus, OL P)是一种常见的慢性炎症性疾病,虽然大多数 OL P 病例为良性,但一部分病例也可能会发展成为口腔鳞状细胞癌等恶性疾病。因此,OL P 早诊断早治疗的重要性不容忽视^[1]。研究^[2]表明,白头翁汤含药血清能够显著降低由脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 OL P 细胞模型中炎症因子表达,进而有助于减轻疾病的症状和炎症反应。白头翁皂苷 B4(Anemoside B4, AB4)是中药白头翁中提取的代表性成分,常用于抗炎治疗,但尚无明确的研究表明 AB4 对 OL P 有

益^[3]。

一氧化氮合酶 3(nitric oxide synthase 3, *NOS3*)是一种谷氨酰胺代谢相关基因^[4],而二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, *DHFR*)是其关键靶基因之一^[5]。*NOS3* 表达水平的下降以及由此导致的一氧化氮生成减少可能参与 OL P 的发病过程^[6]。既往的研究^[7]表明 AB4 与 *NOS3* 之间具有强亲和力,并且 AB4 可能通过调节 *NOS3* 的功能或表达来影响溃疡性结肠炎的病理过程。但 AB4 是否能够调控 *NOS3* 水平影响 OL P 进展仍有待探讨。该研究使用 LPS 干预人口腔角质细胞 HOK-16B 构建 OL P 细胞模型,通过检测 HOK-16B 细胞增殖、凋亡率及谷氨酰胺代谢相关指标的变化,深入探究 AB4 对 OL P 的潜在治疗作用机制。

2025-09-22 接收

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(编号:2021071)

作者简介:李 敏,女,副主任医师,通信作者,E-mail: Liminf43@

163.com

1 材料与方法

1.1 试剂与材料 人口腔角质细胞 HOK-16B 购自上海 ATCC 细胞库(货号:BFN60804063);LPS(来源于大肠埃希菌 O55:B5)、AB4(货号:HY-D1056、HY-N0205)购自美国 MedChemExpress 公司;Vector、oe-NOS3、sh-NOS3、oe-DHFR 慢病毒载体由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成;Lipofectamine™ 3000 转染试剂购自美国赛默飞世尔科技公司(货号:L3000150);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自北京酷来博科技有限公司(货号:SK2060-500T);末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(terminal deoxynucleotide transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡试剂盒(红色荧光)购自爱必信上海生物科技有限公司(货号:abs50058);人白细胞介素 IL-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factors- α , TNF- α)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定试剂盒(货号:PI305、PT518)、谷氨酸试剂盒(货号:D799585-0050)、化学图像发光系统(型号:BeyoImager™ 600)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、聚偏氟乙烯膜(Polyvinylidene fluoride membrane, PVDF)、ECL 试剂、Hi-fair® II 第一链 cDNA 合成 SuperMix 试剂盒、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司(货号:20115ES、20201ES、36124ES、36208ES、11119ES60、11200 ES03);Na 依赖性谷氨酰胺载体 2(alanine-serine-cysteine transporter2, ASCT2)抗体、NOS3 抗体、DHFR 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司(货号:5345、9586、45710、98164、2118);谷氨酰胺合成酶(glutamine synthase, GLS)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号:29519-1-AP);谷氨酰胺检测试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司(货号:G0429W);培养板、细胞培养瓶购自美国 Corning 公司;倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 生物信息学分析 通过访问 NCBI 的 GEO 基因表达数据库平台(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)选择与 OLP 相关的基因表达芯片数据集 GSE70665、GSE131567 进行研究。基于校正后的 $P < 0.05$ 及 $|\log_{10}(FC)| > 1$ 的标准,筛选出表达水平在对照组与 OLP 组之间存在显著差异的基因。利

用 TargetNet 网站(http://targetnet.scbdd.com/calc-net/calc_text/)与 Prediction 网站(https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php)预测 AB4 的分子靶点。从 MsigDB 数据库(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>)与以往发表的文献^[8-10]中获得与谷氨酰胺代谢相关的基因。借助 Venn 图分析工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)将 OLP、AB4 的分子靶点与谷氨酰胺代谢相关基因取交集。分子对接:于 uniprot 数据库获取 NFE2L2 的结构,PDB 数据库获取 NOS1、NOS3 的 3D 结构,从 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获得 AB4 的结构,并通过 Open Babel 转换为 PDB 格式。将蛋白去水、加氢计算电荷并通过 Autodocktools 1.5.7 软件,转换为 pd-bqt 格式;将小分子加氢、确定扭转力、转换成 pdbqt 格式。使用 Autodock vina 软件完成分子对接,对接方式为半柔性对接并采用 pymol 2.1.0 对结果进行可视化展示。

1.3 细胞培养与分组 首先将 HOK-16B 细胞培养在添加 10% 的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中,并放置在 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱内进行培养。每 3 d 对细胞进行 1 次传代,选取第 3 代的细胞进行后续实验。将传代后的细胞进行计数,并调整细胞密度至 5×10^5 个细胞/mL。之后将细胞接种至 24 孔板中,每孔 1 mL,继续培养 24 h。使用 20 nmol/L 的 1,25 (OH)₂D₃ 对 HOK-16B 细胞预处理 12 h,之后使用 100 ng/mL 的 LPS 溶液刺激 HOK-16B 细胞 24 h,构建 OLP 体外细胞模型^[11]为 OLP 组,正常培养的 HOK-16B 细胞作为对照(Control, Ctrl)组。在 LPS 刺激 HOK-16B 细胞的基础上,添加不同浓度的 AB4 (1.00、2.50、5.00、10.00、15.00 mg/L)培养细胞 6 h,作为 AB4 组,探究 AB4 对 OLP 体外细胞模型的影响。通过慢病毒分子转染技术,按照试剂盒说明书将 oe-NOS3、sh-NOS3、sh-NOS3 + oe-DHFR 慢病毒载体与 Polybrene 转染至 HOK-16B 细胞,并通过逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)验证转染效率。之后在细胞转染的基础上,使用 1 ng/mL 的 LPS 溶液刺激细胞 24 h,分别作为 OLP + oe-NOS3、OLP + sh-NOS3、OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR 组。HOK-16B 细胞转染 sh-NOS3 慢病毒载体后,在 LPS 刺激 HOK-16B 细胞的基础上添加 AB4 干预 6 h,作为 OLP + sh-NOS3 + AB4 组,探究 AB4 对 OLP 细胞模型中 NOS3 蛋白表

达及其功能的影响。

1.4 CCK-8 检测细胞增殖活力 收集各组细胞并将其制备成浓度为 2×10^5 个/mL 的细胞悬液。将细胞接种至 96 孔板中,每孔 100 μ L,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 24 h。之后在每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,继续在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 4 h。最后使用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度。

1.5 TUNEL 检测细胞凋亡率 收集各组细胞并使用 PBS 清洗 1 次,使用 4% 多聚甲醛覆盖样本,并在 4 $^{\circ}$ C 下固定 30 min, PBS 洗涤 2 次。使用 0.2% Triton X-100 对样本通透处理 20 min, PBS 洗涤 2 次。根据样本数量,按 TUNEL 细胞凋亡试剂盒说明书比例混合末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 酶和 TUNEL Reaction Buffer 配制新鲜的 TUNEL 反应液,并添加至每个样本中。37 $^{\circ}$ C 下避光孵育 1 h,移除 TUNEL 反应液后, PBS 对样本清洗 2 次。使用含 5 mg/mL BSA 的 0.1% Triton X-100 清洗样本 3 次,每次 5 min。在每个样本上添加浓度为 5 μ g/mL 的 DAPI 染液,室温下避光孵育 5 min 进行核染色。最后在荧光显微镜下观察样本并记录观察实验结果。

1.6 ELISA 检测细胞上清液中的 IL-1 β 、TNF- α 水平 收集各组细胞,以 1 000 r/min 的转速离心 5 min 去除杂质及细胞碎片,分离得到上清液,之后按照 ELISA 试剂盒说明书步骤,检测上清液中 IL-1 β 与 TNF- α 的浓度。

1.7 RT-PCR 根据操作指南,先在离心管内按顺序添加 1 μ L 的 Total RNA, 2 μ L 的 DNA 消化缓冲液和 1 μ L 的 DNA 消化酶,再用无 RNA 酶的双蒸水补充至总体积 10 μ L。随后,遵循 Hifair[®] II 第一链 cDNA 合成 SuperMix 试剂盒的说明完成反转录过程。接着,利用 Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒测定细胞中 NOS3 与 DHFR 的表达水平, GAPDH 作为内参。最终,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 公式对实验结果进行分析。引物序列如下: GAPDH, (F) 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'、(R) 5'-AGGGGTCTCATGGCAACTG-3'; NOS3, (F) 5'-TGATGCATTGATCTTTGGA-3'、(R) 5'-CCATGTTACTGTGCGTCAC-3'; DHFR, (F) 5'-CCGGCACATCTTCATTCTTT-3'、(R) 5'-ATGCAACCCTTTGGTTCAAG-3'。

1.8 蛋白质印迹法检测 ASCT2、GLS、NOS3、DHFR 水平 收集各组细胞样品并加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,释放细胞内的蛋白质。在 4 $^{\circ}$ C 下,以 12 000 r/min 离心 10 min,收集含有蛋白质

的上清液并使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。制备一个包含 20 μ L 蛋白质的体系,并将其加热煮沸 10 min,利用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶对蛋白质样品进行分离。将凝胶上的蛋白质通过电转的方式转移至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉在室温下对 PVDF 膜进行了 2 h 的封闭处理。PBS 洗膜后,添加针对 ASCT2、GLS、NOS3、DHFR 的兔单克隆抗体(按 1:1 000 的比例稀释),在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。PBS 再次洗膜后添加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(按 1:2 000 的比例稀释),室温孵育 1 h。PBS 洗膜,使用 ECL 试剂在化学图像发光系统对膜进行处理,显现蛋白质条带。

1.9 谷氨酰胺摄取量 收集各组细胞取 5×10^6 个,加入 1 mL 提取液。采用超声波破碎法(200 w,超声处理 3 s、间隔 10 s,重复 30 次)在冰浴条件下破碎细胞壁,释放细胞内的谷氨酰胺。之后在 4 $^{\circ}$ C 条件下,以 12 000 r/min 转速离心 10 min,取上清液。按照谷氨酰胺检测试剂盒说明书步骤上机检测上清液中的谷氨酰胺含量。

1.10 谷氨酸生成 收集各组细胞,按照 1×10^7 个细胞加入 1 mL 含有蛋白酶抑制剂的缓冲液。通过超声破碎细胞壁,释放细胞内的谷氨酸,超声波功率设置为 20%,超声处理 3 s、间隔 10 s,重复 30 次。超声波破碎完成后,将样品在常温下以 1 000 r/min 转速离心 10 min,分离上清液。按照谷氨酸检测试剂盒说明书步骤检测上清液中的谷氨酸含量。

1.11 统计学处理 使用 SPSS 26.0 软件进行分析, GraphPad Prism 9.5 软件用于绘图。实验数据符合正态分布并采用均数 \pm 标准差形式呈现,两组间数据比较采用 t 检验。多组间数据比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AB4 改善 LPS 对 HOK-16B 细胞损伤的作用

CCK-8 实验结果显示,与 Ctrl 组相比, OLP 组 HOK-16B 细胞增殖活力降低($q = 9.52, P < 0.001$)。AB4 结构式见图 1A。不同浓度 AB4 (5.00、10.00、15.00 mg/L) 干预后, HOK-16B 细胞增殖活力增加($q = 3.81、1.92、2.79, P < 0.05$),见图 1B。10.0 mg/L 浓度的 AB4 对改善细胞增殖活力的效果最为显著,因此后续实验均采用此浓度。与 Ctrl 组相比, OLP 组 HOK-16B 细胞凋亡率增加($q = 8.48, P < 0.01$),且细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度升高

($q = 8.02, 9.41, P < 0.001$); AB4 干预后, 与 OLP 组相比, HOK-16B 细胞凋亡率降低 ($q = 6.46, P < 0.01$), 细胞上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 浓度下降 ($q = 5.570, 5.046, P < 0.05$), 见图 1C、D。

2.2 AB4 影响 OLP 细胞模型谷氨酰胺代谢异常

与 Ctrl 组相比, OLP 组谷氨酰胺摄取量、谷氨酸生成量升高 ($q = 13.42, 9.93, P < 0.01$), ASCT2、GLS 蛋白表达增强 ($q = 17.27, 10.67, P < 0.001$); 然而相比于 OLP 组, AB4 组谷氨酰胺摄取量、谷氨酸生成量降低 ($q = 8.29, 5.17, P < 0.05$), 并且 ASCT2、GLS

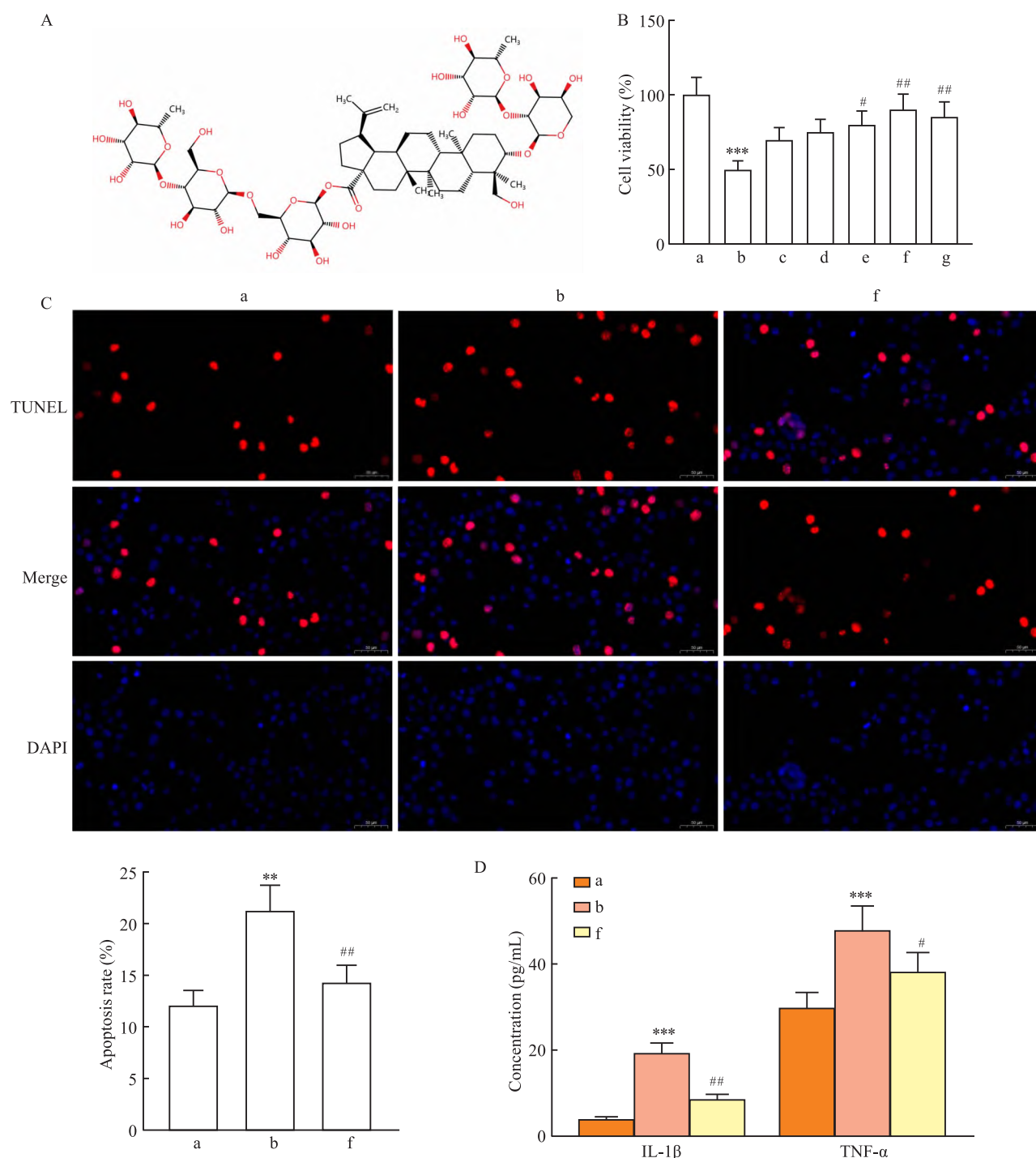


图 1 AB4 促进 LPS 处理的 HOK-16B 细胞增殖, 抑制细胞凋亡和炎症因子水平

Fig. 1 AB4 promoted the proliferation of LPS-treated HOK-16B cells and inhibited cell apoptosis and inflammatory factor levels

A: Chemical structure of AB4; B: Cell viability detected by CCK-8 assay; C: Cell apoptosis detected by TUNEL assay ($\times 200$); D: Levels of IL-1 β and TNF- α in cell supernatants detected by ELISA; a: Ctrl group; b: OLP group; c: AB4 1.00 group; d: AB4 2.50 group; e: AB4 5.00 group; f: AB4 10.00 group; g: AB4 15.00 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OLP group.

蛋白表达下降($q=10.67/4.32, P<0.001$)。见图2。

2.3 NOS3 为 AB4 治疗 OLP 的关键靶点 生物信息学分析结果显示 AB4、谷氨酰胺代谢与 OLP 分子靶点共存在 3 个交集靶点,分别为 *NFE2L2*、*NOS1*、*NOS3*, 见图 3A。分子对接得到 AB4 和 *NFE2L2*、*NOS1*、*NOS3* 的结合能分别为 35 564.00、36 819.20、41 421.60 J/mol,表明 AB4 和 *NOS3* 的结合效果最强且二者形成多个作用键,见图 3B。蛋白质印迹结果显示,与 Ctrl 组相比,OLP 组 HOK-16B 细胞中 *NOS3* 蛋白表达降低($q=18.02, P<0.001$) ,

而与 OLP 组相比,AB4 组 HOK-16B 细胞中 *NOS3* 蛋白表达增强($q=9.153, P<0.01$) ,见图 3C。

2.4 NOS3 表达与 OLP 细胞模型生物学行为及谷氨酰胺代谢相关 与 vector 组相比,oe-*NOS3* 组细胞 *NOS3* mRNA 表达水平增强($q=4.74, P<0.05$) , sh-*NOS3* 组 *NOS3* mRNA 表达水平降低($q=5.15, P<0.05$) ,见图 4A。与 Ctrl 组相比,OLP 组 HOK-16B 细胞活力降低($q=9.82, P<0.001$) ,凋亡率增加($q=7.61, P<0.01$) ,细胞上清液中 IL-1 β 与 TNF- α 浓度上调($q=7.41/4.43, P<0.001$) ,谷氨

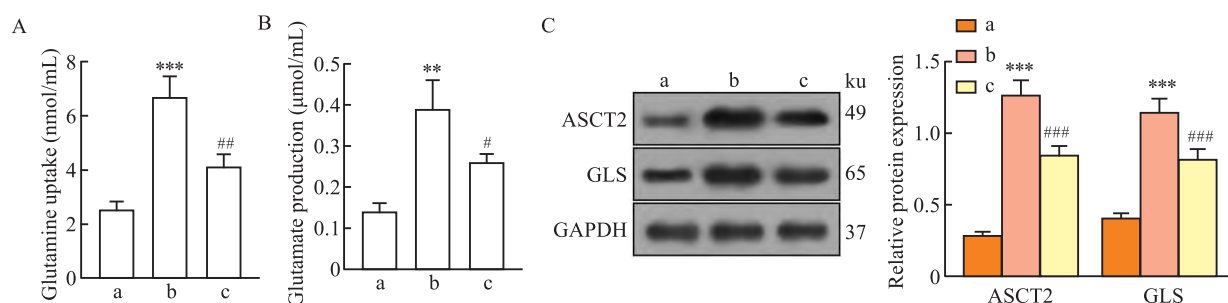


图2 AB4 抑制 OLP 细胞模型谷氨酰胺代谢异常

Fig.2 AB4 inhibited abnormal glutamine metabolism in the OLP cell model

A: Glutamine uptake; B: Glutamate production; C: Western blot detection of ASCT2 and GLS protein expression; a: Ctrl group; b: OLP group; c: AB4 group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs Ctrl group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs OLP group.

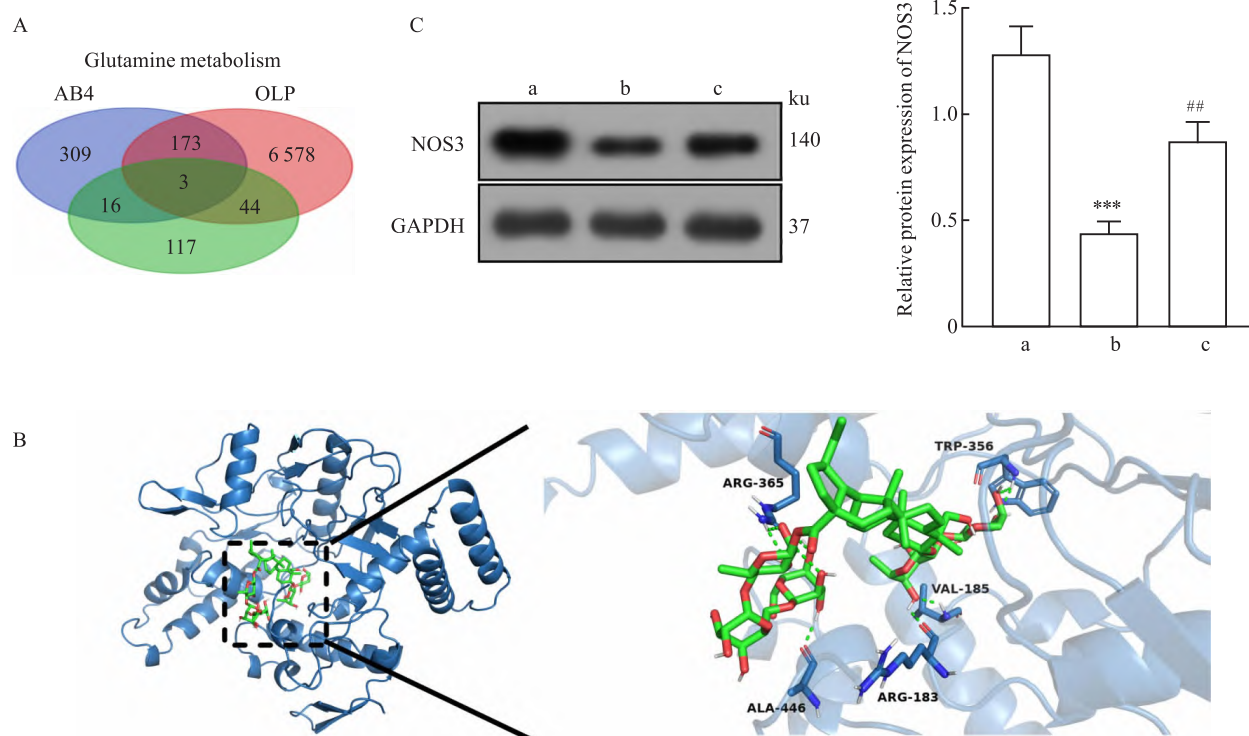


图3 AB4 促进 OLP 细胞模型中 NOS3 表达

Fig.3 AB4 promoted NOS3 expression in the OLP cell model

A: Intersection of AB4, glutamine metabolism, and OLP targets; B: Molecular docking results of AB4 and NOS3; C: Western blot analysis of NOS3 protein expression; a: Ctrl group; b: OLP group; c: AB4 group; *** $P<0.001$ vs Ctrl group; ## $P<0.01$ vs OLP group.

酰胺摄取量与谷氨酸生成量升高($q = 9.71, 6.49, P < 0.01$), ASCT2 与 GLS 蛋白表达增强($q = 14.69, 9.93, P < 0.001$)。与 OLP 组相比, OLP + oe-NOS3 组细胞活力增加($q = 7.39, P < 0.01$), 凋亡率降低($q = 5.61, P < 0.05$), 细胞上清液中 IL-1 β 与 TNF- α 浓度下降($q = 9.04, 7.62, P < 0.05$), 谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量降低($q = 7.52, 5.12, P < 0.05$), ASCT2 与 GLS 蛋白表达减弱($q = 7.03, 5.79, P <$

0.01)。与 OLP 组相比, OLP + sh-NOS3 组 HOK-16B 细胞活力降低($q = 4.87, P < 0.05$), 凋亡率增加($q = 5.27, P < 0.05$), 细胞上清液中 IL-1 β 与 TNF- α 浓度升高($q = 5.77, 5.61, P < 0.01$), 谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量上升($q = 5.01, 7.85, P < 0.05$), ASCT2 与 GLS 蛋白表达增强($q = 7.65, 7.86, P < 0.001$)。见图 4B~G。

2.5 AB4通过上调NOS3-DHFR影响OLP细胞

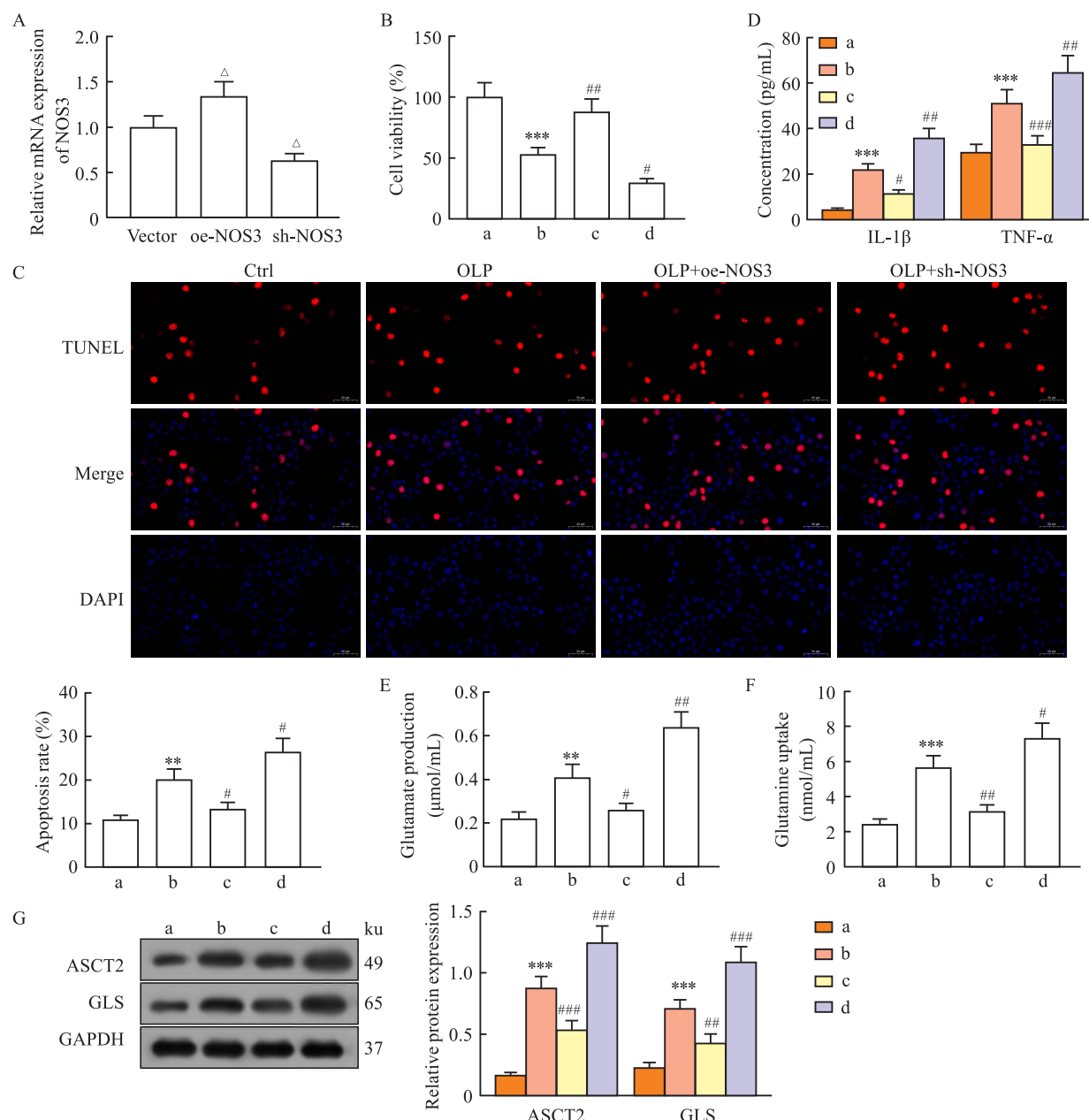


图4 NOS3 表达与 OLP 细胞模型生物学行为及谷氨酰胺代谢相关

Fig. 4 NOS3 expression was associated with the biological behavior and glutamine metabolism in the OLP cell model

A: RT-PCR detection of NOS3 mRNA expression; B: CCK-8 assay measurement of cell viability; C: TUNEL assay detection of cell apoptosis ($\times 200$); D: ELISA detection of IL-1 β and TNF- α in cell supernatant; E: Glutamine uptake; F: Glutamate detection; G: Western blot analysis of ASCT2 and GLS protein expression; a: Ctrl group; b: OLP group; c: OLP + oe-NOS3 group; d: OLP + sh-NOS3 group; $\Delta P < 0.05$ vs Vector group; $* P < 0.01$, $*** P < 0.001$ vs Ctrl group; $# P < 0.05$, $## P < 0.01$, $### P < 0.001$ vs OLP group.

模型生物学行为及谷氨酰胺代谢 与 vector 组相比,sh-DHFR 组细胞 DHFR mRNA 表达降低($t = 3.24, P < 0.05$),见图 5A。与 Ctrl 组相比,OLP 组 DHFR 蛋白表达减弱($q = 5.46, P < 0.001$)、凋亡率增加($q = 6.38, P < 0.01$)、HOK-16B 细胞活力降低($q = 10.66, P < 0.001$)、细胞上清液中 IL-1 β 与 TNF- α 浓度上调($q = 5.65, 7.36, P < 0.01$)、谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量升高($q = 7.52, 6.18, P < 0.01$)、ASCT2 与 GLS 蛋白表达增强($q = 12.15, 9.68, P < 0.001$)。与 OLP 组相比,OLP + sh-NOS3 组 DHFR 蛋白表达进一步减弱($q = 22.45, P < 0.001$)、凋亡率增加($q = 8.94, P < 0.001$)、HOK-16B 细胞活力进一步降低($q = 6.97, P < 0.01$)、细胞上清液中 IL-1 β 与 TNF- α 浓度上调($q = 5.14, 8.02, P < 0.05$)、谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量升高($q = 9.72, 8.43, P < 0.01$)、ASCT2 与 GLS 蛋白表达增强($q = 7.41, 9.49, P < 0.001$)。与 OLP + sh-NOS3 组相比,OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR 组和 OLP + sh-NOS3 + AB4 组 DHFR 蛋白表达增强($q = 7.89, 7.58, P < 0.001$)、凋亡率减少($q = 6.61, 7.38, P < 0.01$)、HOK-16B 细胞活力增加($q = 5.35, 5.68, P < 0.05$)、细胞上清液中 IL-1 β ($q = 4.27, 4.58, P < 0.01$)和 TNF- α 浓度下降($q = 5.94, 6.90, P < 0.01$)、谷氨酰胺摄取量($q = 6.82, 8.66, P < 0.01$)与谷氨酸生成量($q = 5.90, 7.59, P < 0.05$)降低,ASCT2($q = 4.37, 6.08, P < 0.05$)和 GLS 蛋白表达减弱($q = 4.75, 5.32, P < 0.05$),见图 5B~H。

3 讨论

目前,OLP 的发病机制尚未完全明确,缺乏针对特定致病途径的治疗方法,临床治疗主要侧重于缓解糜烂性病变引起的不适和监测恶性转化^[12-13]。本研究表明 AB4 可能作为一种潜在治疗药物,通过促进 NOS3-DHFR 轴表达,抑制谷氨酰胺代谢,进而能够抑制 OLP 进展。

谷氨酰胺代谢在 OLP 进展中起着关键作用,其代谢能力增强可能通过调节 T 细胞的分化和增殖、维持氧化还原平衡以及促进淋巴细胞浸润等,促进疾病进程^[14]。AB4 被发现具有抗炎、抗癌、抗病毒等多种生理活性,临床常用于治疗炎症性肠病^[15],但在 OLP 中作用的研究有限。本研究通过构建 OLP 体外细胞模型并使用 AB4 干预治疗发现,AB4 能够有效促进 HOK-16B 细胞的增殖活力、显著抑制细胞凋亡,同时抑制炎症因子浓度,表明其可能通过

抗炎作用促进修复和替换受损的口腔组织。此外,ASCT2 是一种转运酶,主要负责丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸及谷氨酰胺等氨基酸的跨膜转运,而 GLS 是一种参与谷氨酰胺代谢的关键酶,两者均属于谷氨酰胺代谢相关蛋白^[16-17]。本研究表明,AB4 能够调节 OLP 细胞模型中的谷氨酰胺代谢,降低谷氨酰胺摄取量与谷氨酸生成量,并抑制相关蛋白 ASCT2 和 GLS 的表达,这进一步证实谷氨酰胺代谢异常与 OLP 相关,并且抑制谷氨酰胺代谢可能对 OLP 产生积极的治疗作用。

NOS3 是产生 NO 的关键酶,其活性增加可能有助于增加 NO 的产生,进而能够抑制炎症细胞的黏附和迁移,减少炎症因子产生,减轻炎症反应^[18]。此外,NOS3 衍生的 NO 通过促进 DHFR 的 S-亚硝基化能够维持 DHFR 的稳定性^[19]。在慢性缺血状态下,膀胱中的 NOS3 和 DHFR 表达增加,有助于预防动脉粥样硬化的进展,同时能够保护下尿路功能^[20]。本研究结果显示,AB4、谷氨酰胺代谢与 OLP 之间存在分子靶点的交集,分别为 NFE2L2、NOS1 和 NOS3。其中 NOS3 作为本研究的核心靶点,其表达在 OLP 组的 HOK-16B 细胞中显著减弱,并且 AB4 能够改善 NOS3 的异常表达。功能实验结果显示 OLP 的发展不仅与 NOS3 的异常表达相关,而且与谷氨酰胺代谢的紊乱紧密相连。进一步实验表明在 OLP 细胞模型中敲低 NOS3 可促进 DHFR 下调、细胞活力下降、凋亡及炎症因子释放,并增强谷氨酰胺-谷氨酸代谢流;而外源过表达 DHFR 或 AB4 处理均能逆转上述损伤,恢复 DHFR 水平,抑制 ASCT2/GLS 活性,减少谷氨酰胺摄取与谷氨酸生成,显著改善细胞生存和炎症状态,证实 AB4 通过上调 NOS3-DHFR 轴调控 OLP 生物学行为及谷氨酰胺代谢。

综上所述,该研究揭示了 NOS3 与 DHFR 在 OLP 上皮细胞谷氨酰胺代谢中的重要作用,通过调节这一轴的功能,AB4 能够影响细胞的活力、凋亡、炎症反应以及谷氨酰胺代谢的多个环节,进而抑制 OLP 进展。该研究不仅关注了 AB4 对 OLP 上皮细胞的直接影响,还深入探讨了其背后的分子机制,为理解 OLP 的发病机理和治疗提供了新的视角。尽管该研究在细胞和分子水平上取得了重要发现,但是 OLP 是一种复杂的疾病,涉及多个因素如遗传、免疫和环境等,目前尚未建立起能够完全模拟 OLP 病理特征的动物模型,AB4 在 OLP 临床治疗中的具体应用还需要进一步的动物实验与临床试验验证。

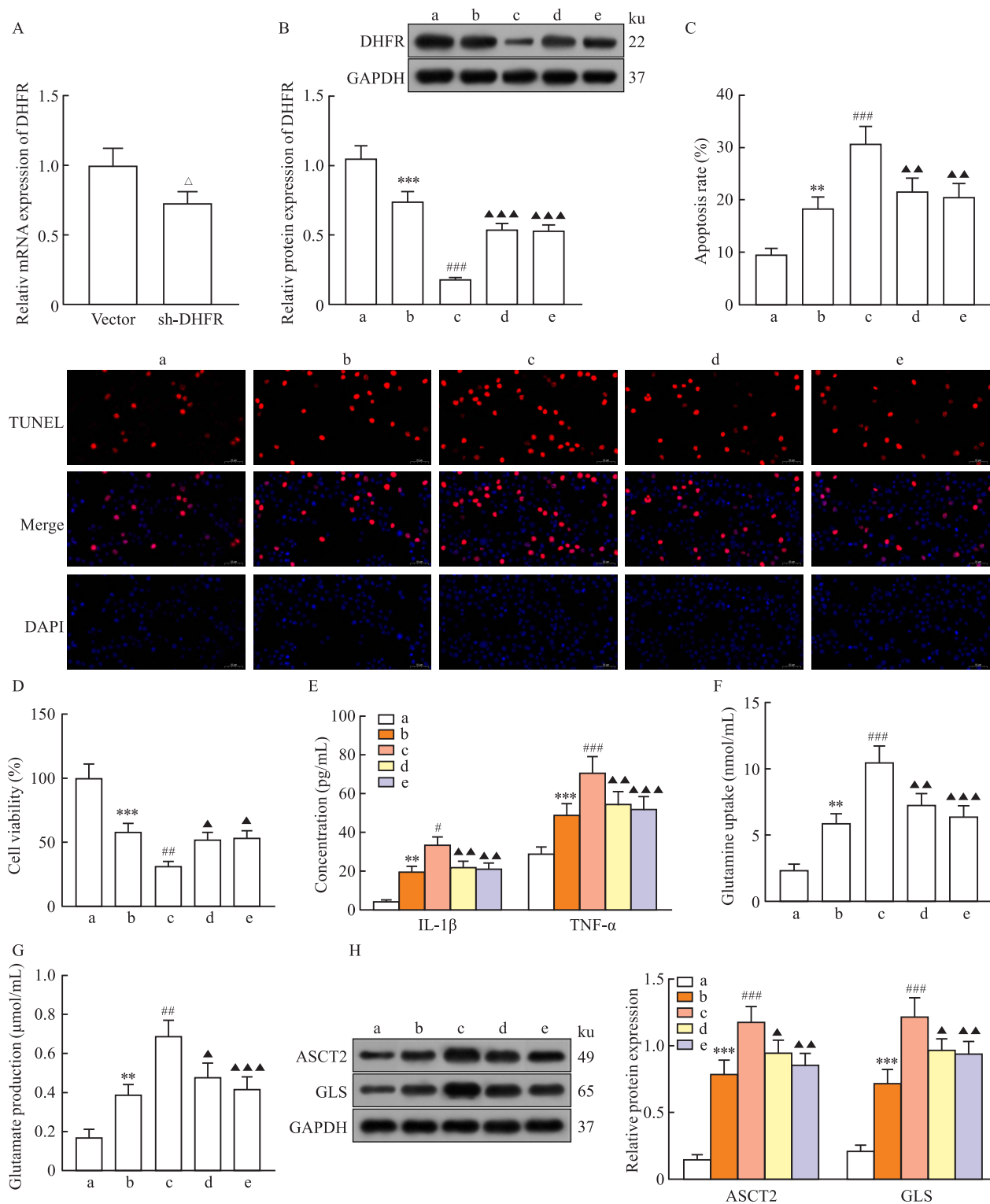


图5 AB4通过上调NOS3-DHFR影响OLP细胞模型生物学行为及谷氨酰胺代谢

Fig. 5 AB4 affected the biological behavior and glutamine metabolism in the OLP cell model by upregulating the NOS3-DHFR pathway

A: RT-PCR detection of NOS3 mRNA expression; B: Western blot analysis of DHFR protein expression; C: TUNEL assay detection of cell apoptosis ($\times 200$); D: CCK-8 assay measurement of cell viability; E: ELISA detection of IL-1 β and TNF- α in cell supernatant; F: Glutamine uptake; G: Glutamate detection; H: Western blot analysis of ASCT2 and GLS protein expression; a: Ctrl group; b: OLP group; c: OLP + sh-NOS3 group; d: OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR group; e: OLP + sh-NOS3 + AB4 group; $^{\triangle}P < 0.05$ vs Vector group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs Ctrl group; $^{#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs OLP group; $^{\blacktriangle}P < 0.05$, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$, $^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.001$ vs OLP + sh-NOS3 group.

参考文献

- [1] Vinayahalingam S, van Nistelrooij N, Rothweiler R, et al. Advancements in diagnosing oral potentially malignant disorders; leveraging vision transformers for multi-class detection[J]. Clin Oral Investig, 2024, 28(7): 364. doi: 10.1007/s00784-024-05762-8.
- [2] 李敏, 王双双, 高毅, 等. 白头翁汤含药血清对口腔扁平苔藓上皮细胞增殖、凋亡及 Fas/FasL 信号通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(14): 3541-4. doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.14.052.
- [2] Li M, Wang S S, Gao Y, et al. Effects of serum containing Pulsatilla decoction on proliferation, apoptosis and Fas/FasL signaling pathway of oral lichen planus epithelial cells[J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(14): 3541-4. doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.14.052.
- [3] Zou M, Chen F J, Deng L R, et al. Anemoside B4 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by modulating inflammatory responses and the gut microbiota[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 931: 175185. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175185.
- [4] Muroya S, Zhang Y, Kinoshita A, et al. Maternal undernutrition during pregnancy alters amino acid metabolism and gene expression associated with energy metabolism and angiogenesis in fetal calf muscle[J]. Metabolites, 2021, 11(9): 582. doi: 10.3390/metabo11090582.
- [5] Mandal P, Pradhan S M, Mathew A A, et al. Exploring the effects of vasoactive constituents in large cardamom: implications for the anti-hypertensive effect via ENOS coupling pathway-an *in vitro* study in rat endothelial cells[J]. Nat Prod Res, 2024; 1-7. doi: 10.1080/14786419.2024.2351534.
- [6] Wang L, Wu W, Chen J, et al. microRNA microarray-based identification of involvement of miR-155 and miR-19a in development of oral lichen planus (OLP) by modulating Th1/Th2 balance via targeting ENOS and Toll-like receptor 2 (TLR2)[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3591-603. doi: 10.12659/msm.907497.
- [7] 白珊泽, 姚万玲, 纪鹏, 等. 白头翁汤治疗溃疡性结肠炎“成分-靶标-通路”网络分析及效应机制预测[J]. 动物医学进展, 2022, 43(6): 69-78. doi: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2022.06.020.
- [7] Bai S Z, Yao W L, Ji P, et al. Analysis of “component-target-pathway” network and prediction of effect mechanism of Pulsatilla decoction in the treatment of ulcerative colitis[J]. Prog Vet Med, 2022, 43(6): 69-78. doi: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2022.06.020.
- [8] Ying L, Cheng M, Lu Y, et al. Glutamine metabolism scoring predicts prognosis and therapeutic resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2021, 27: 1610075. doi: 10.3389/pore.2021.1610075.
- [9] He S, Zhang S, Yao Y, et al. Turbulence of glutamine metabolism in pan-cancer prognosis and immune microenvironment[J]. Front Oncol, 2022, 12: 1064127. doi: 10.3389/fonc.2022.1064127.
- [10] Wu Z, Li N, Gao Y, et al. Correction: glutamine metabolism-related genes and immunotherapy in nonspecific orbital inflammation were validated using bioinformatics and machine learning[J]. BMC Genomics, 2024, 25(1): 224. doi: 10.1186/s12864-024-10105-8.
- [11] Ge X, Wang L, Li M, et al. Vitamin D/VDR signaling inhibits LPS-induced IFN γ and IL-1 β in Oral epithelia by regulating hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway[J]. Cell Commun Signal, 2019, 17(1): 18. doi: 10.1186/s12964-019-0331-9.
- [12] Didona D, Caposiena Caro R D, Sequeira Santos A M, et al. Therapeutic strategies for oral lichen planus: state of the art and new insights[J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 997190. doi: 10.3389/fmed.2022.997190.
- [13] Wu T, Bai Y, Jing Y, et al. What can we learn from treatments of oral lichen planus? [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2024, 14: 1279220. doi: 10.3389/fcimb.2024.1279220.
- [14] Li W, Ling Z, Wang J, et al. ASCT2-mediated glutamine uptake promotes Th1 differentiation via ROS-EGR1-PAC1 pathway in oral lichen planus[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 216: 115767. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115767.
- [15] Lv L, Li Q, Wang K, et al. Discovery of a new anti-inflammatory agent from anemoside B4 derivatives and its therapeutic effect on colitis by targeting pyruvate carboxylase[J]. J Med Chem, 2024, 67(9): 7385-405. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c00222.
- [16] 马牧天, 谭振亚, 周园琴, 等. 谷氨酰胺转运蛋白 ASCT2 介导激活突变 Ptpn11(SHP2)促进骨髓增殖性肿瘤的发生[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(12): 1815-21. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.001.
- [16] Ma M T, Tan Z Y, Zhou Y Q, et al. Glutamine transporter ASCT2 mediates activation mutation PTPN11 (SHP2) to promote the occurrence of myeloproliferative neoplasms[J]. Acta Univ Med Anhui, 2020, 55(12): 1815-21. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.001.
- [17] Ge J, Wang B, Zhao S, et al. Inhibition of lncRNA NEAT1 sensitizes medulloblastoma cells to cisplatin through modulating the miR-23a-3p-glutaminase (GLS) axis[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 7670-82. doi: 10.1080/21655979.2021.2008695.
- [18] Xu X, Liu S, Gao Y, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) alleviates inflammation and endothelial dysfunction and improves pregnancy outcomes in preeclampsia (PE)-like rats via ENOS/Nrf2/HO-1 pathway[J]. J Reprod Immunol, 2024, 164: 104263. doi: 10.1016/j.jri.2024.104263.
- [19] Cai Z, Lu Q, Ding Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide prevents dihydrofolate reductase degradation via promoting S-nitrosylation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015, 35(11): 2366-73. doi: 10.1161/atvbaha.115.305796.
- [20] Akaihashi H, Hata J, Tanji R, et al. Tetrahydrobiopterin prevents chronic ischemia-related lower urinary tract dysfunction through the maintenance of nitric oxide bioavailability[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 19844. doi: 10.1038/s41598-020-76948-9.

Mechanism of Anemoside B4 on glutamine metabolism in oral lichen planus epithelial cells *via* the NOS3-DHFR axis

Li Min, Yang Menghua, Gao Yi, Zhang Zijian, Jiang Dan

(Dept of Stomatology, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011)

Abstract Objective To investigate the mechanism of Anemoside B4 (AB4) on glutamine metabolism in oral lichen planus (OLP) epithelial cells *via* the nitric oxide synthase 3 (NOS3)-dihydrofolate reductase (DHFR) axis.

Methods Bioinformatics analysis was performed to identify the intersection of molecular targets of OLP, AB4, and genes related to glutamine metabolism. A lipopolysaccharide (LPS)-induced HOK-16B model of OLP was established. HOK-16B were divided into Ctrl group, OLP group, AB4 group, OLP + oe-NOS3 group, OLP + sh-NOS3 group, OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR group, and OLP + sh-NOS3 + AB4 group. Cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK-8); cell apoptosis was detected by TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL); inflammatory factors interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factors- α (TNF- α) concentrations in cell supernatants were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits; glutamine uptake and glutamate production were determined using kits; and the protein expression of alanine-serine-cysteine transporter2 (ASCT2) and glutamine synthase (GLS) was assessed by Western blot. **Results** Bioinformatics analysis of molecular targets of OLP, AB4, and genes related to glutamine metabolism revealed three intersection targets: NFE2L2, NOS1, and NOS3. Compared with the Ctrl group, the OLP group exhibited decreased HOK-16B cell viability ($P < 0.001$), increased apoptosis rate ($P < 0.01$), upregulated concentrations of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.001$), elevated glutamine uptake and glutamate production ($P < 0.01$), and enhanced expression of ASCT2 and GLS proteins ($P < 0.001$). Compared with the OLP group, the AB4 group showed improved cell viability ($P < 0.05$), reduced apoptosis rate and release of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.05$), decreased glutamine uptake and glutamate production ($P < 0.05$), and downregulated expression of ASCT2 and GLS proteins ($P < 0.001$). Compared with the OLP group, the OLP + oe-NOS3 group had increased HOK-16B cell viability ($P < 0.01$), reduced apoptosis rate ($P < 0.05$), decreased concentrations of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.05$), lowered glutamine uptake and glutamate production ($P < 0.05$), and weakened expression of ASCT2 and GLS proteins ($P < 0.01$); whereas the OLP + sh-NOS3 group had decreased HOK-16B cell viability ($P < 0.05$), increased apoptosis rate ($P < 0.05$), elevated concentrations of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.01$), increased glutamine uptake and glutamate production ($P < 0.05$), and enhanced expression of ASCT2 and GLS proteins ($P < 0.001$). Compared with the OLP + sh-NOS3 group, both the OLP + sh-NOS3 + oe-DHFR group and the OLP + sh-NOS3 + AB4 group showed increased HOK-16B cell viability ($P < 0.001$), reduced apoptosis rate ($P < 0.05$), decreased concentrations of IL-1 β and TNF- α ($P < 0.01$), lowered glutamine uptake and glutamate production ($P < 0.05$), and weakened expression of ASCT2 and GLS proteins ($P < 0.05$). **Conclusion** AB4 inhibits the progression of OLP by mediating glutamine metabolism *via* the regulation of the NOS3-DHFR axis.

Key words Anemoside B4; nitric oxide synthase 3; dihydrofolate reductase; glutamine metabolism; oral lichen planus

Fund program Scientific Research Project of Hebei Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (No. 2021071)

Corresponding author Li Min, E-mail: Liminf43@163.com