

脂多糖刺激小鼠 MLO-Y4 骨细胞白细胞介素 6 及核因子 κ B 受体活化因子配体的表达<https://doi.org/10.12307/2022.608>刘奇奇¹, 刘敏², 杨健¹, 余科¹

投稿日期: 2021-07-06

采用日期: 2021-08-19

修回日期: 2021-10-21

在线日期: 2021-11-30

中图分类号:

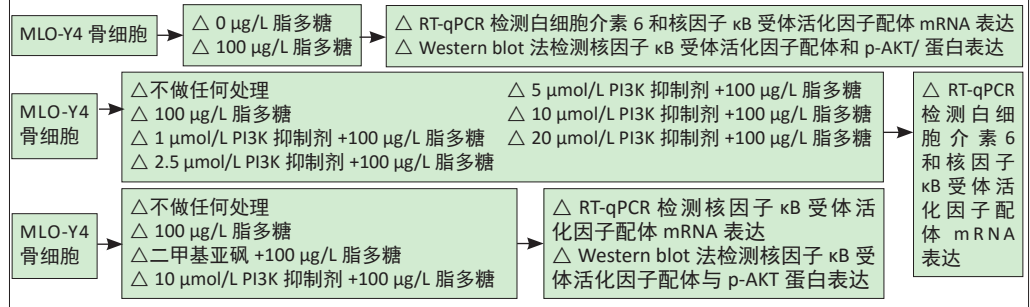
R459.9; R364.5; R780.2

文章编号:

2095-4344(2022)20-03121-06

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

脂多糖: 是革兰阴性细菌内毒素的主要活性成分, 在炎症性骨吸收中发挥着重要作用, 可诱导多种炎性细胞因子, 如白细胞介素 1/6、前列腺素等。脂多糖由类脂 A、核心多糖、O-抗原组成, 主要与存在于宿主细胞细胞膜表面的 Toll 样受体相结合, 而 Toll 家族与炎性细胞因子表达有关, 在炎症免疫中起着重要作用。

PI3K/AKT 信号通路: 在调控各种不同细胞功能(包括代谢、生长、增殖、存活、转录及蛋白质合成)方面发挥重要作用。PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成的二聚体, 当它与细胞因子受体结合后可改变 AKT 的蛋白结构并使其活化, 并以磷酸化作用激活或抑制下游一系列底物及其他信号转导途径。在脂多糖的刺激下, PI3K/AKT 信号通路可以介导多种炎性细胞因子的产生。

摘要

背景: 前期研究证实, 脂多糖刺激小鼠 MLO-Y4 骨细胞上调炎症相关细胞因子白细胞介素 6 的表达, 白细胞介素 6 上调破骨细胞生成相关因子核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)的表达, 而 PI3K/AKT 信号通路是骨代谢中的重要调节通路, 验证其是否参与脂多糖诱导骨细胞炎症因子的产生, 对研究细菌炎症性骨吸收的机制具有重要意义。

目的: 验证 PI3K/AKT 信号通路是否参与脂多糖刺激下小鼠 MLO-Y4 骨细胞白细胞介素 6 及 RANKL 的表达。

方法: ①分别以 0, 100 μ g/L 的脂多糖刺激 MLO-Y4 骨细胞, 1, 2, 4, 6, 8 h 后, 采用 RT-qPCR 检测白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达, Western blot 法检测 RANKL 和 p-AKT 蛋白表达; ②取对数生长期的 MLO-Y4 骨细胞, 分 7 组处理: 不做任何处理(对照组)、100 μ g/L 脂多糖、1 μ mol/L PI3K 抑制剂+100 μ g/L 脂多糖、2.5 μ mol/L PI3K 抑制剂+100 μ g/L 脂多糖、5 μ mol/L PI3K 抑制剂+100 μ g/L 脂多糖、10 μ mol/L PI3K 抑制剂+100 μ g/L 脂多糖、20 μ mol/L PI3K 抑制剂+100 μ g/L 脂多糖, 采用 RT-qPCR 检测白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达; ③将 MLO-Y4 骨细胞分 4 组处理: 不做任何处理(对照组)、100 μ g/L 脂多糖、二甲基亚砷+100 μ g/L 脂多糖、10 μ mol/L PI3K 抑制剂+100 μ g/L 脂多糖, 采用 RT-qPCR 检测 RANKL 的 mRNA 表达, Western blot 法检测 RANKL 与 p-AKT 蛋白表达。

结果与结论: ①脂多糖刺激后, 骨细胞内白细胞介素 6 与 RANKL 的 mRNA 表达呈先升高后降低的趋势, 各时间点的两基因表达量均高于无脂多糖刺激组($P < 0.05$); ②1-10 μ mol/L 的 PI3K 抑制剂呈浓度依赖性降低脂多糖诱导的骨细胞白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达量升高, 浓度越高降低效果越明显, 当浓度达到 20 μ mol/L 时降低效果与 10 μ mol/L 无明显差异; ③二甲基亚砷与 PI3K 抑制剂均可降低脂多糖刺激诱导的骨细胞 RANKL 蛋白与 mRNA 表达量的升高, 降低脂多糖刺激诱导的骨细胞 p-AKT 蛋白表达, 其中以 PI3K 抑制剂的降低效果更明显; ④结果表明, PI3K/AKT 信号通路参与了脂多糖刺激小鼠 MLO-Y4 骨细胞白细胞介素 6 和 RANKL 的表达。

关键词: 骨细胞; 白细胞介素 6; 脂多糖; PI3K/AKT; 核因子 κ B 受体活化因子配体; 骨吸收; 磷酸化; PI3K 抑制剂

缩略语: 核因子 κ B 受体活化因子配体: receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL

Lipopolysaccharide stimulates the expression of interleukin-6 and nuclear factor kappa B receptor activator ligand in mouse MLO-Y4 osteoblasts

Liu Qiqi¹, Liu Min², Yang Jian¹, Yu Ke¹¹Department of Oral Implantology, ²Department of Prosthodontics, School/Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Liu Qiqi, Master candidate, Department of Oral Implantology, School/Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

西南医科大学附属口腔医院, ¹种植科, ²修复科, 四川省泸州市 646000

第一作者: 刘奇奇, 男, 1994 年生, 重庆市人, 汉族, 西南医科大学在读硕士, 主要从事口腔种植临床与基础研究。

通讯作者: 余科, 博士, 副教授, 西南医科大学口腔医院附属口腔医院口腔种植科, 四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0001-7677-9901> (刘奇奇)

基金资助: 四川省教育厅 2017 年科研计划(17ZB0481), 项目负责人: 余科; 中国口腔医学会西部口腔医学临床研究基金

(CSA-W2018-03), 项目负责人: 余科; 泸州市人民政府-西南医科大学战略合作项目(2020LZXNYDJ31), 项目负责人: 余科

引用本文: 刘奇奇, 刘敏, 杨健, 余科. 脂多糖刺激小鼠 MLO-Y4 骨细胞白细胞介素 6 及核因子 κ B 受体活化因子配体的表达 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(20):3121-3126.



Corresponding author: Yu Ke, MD, Associate professor, Department of Oral Implantology, School/Hospital of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have confirmed that lipopolysaccharide could up-regulated the expression of interleukin-6, an inflammation-related cytokine, in mouse MLO-Y4 osteocytes, and interleukin-6 could further up-regulate the expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), a factor related to osteoclastogenesis, in osteoblasts. PI3K/AKT signaling pathway is an important regulatory pathway in bone metabolism. Verifying whether this signaling pathway is involved in the production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharides is greatly beneficial to studying the mechanism of bone resorption that is caused by bacterial inflammation.

OBJECTIVE: To verify whether PI3K/AKT signaling pathway is involved in the expression of interleukin-6 and RANKL in mouse MLO-Y4 osteocytes stimulated by lipopolysaccharides.

METHODS: MLO-Y4 osteoblasts were stimulated with 0 or 100 μ g/L lipopolysaccharides for 1, 2, 4, 6, and 8 hours. Then the mRNA expressions of interleukin-6 and RANKL were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction, and the protein expression of RANKL and p-AKT were detected by western blot. MLO-Y4 osteocytes in logarithmic growth was divided into seven groups: no treatment group (control group), 100 μ g/L lipopolysaccharide group, 1 μ mol/L PI3K inhibitor+100 μ g/L lipopolysaccharide group, 2.5 μ mol/L PI3K inhibitor+100 μ g/L lipopolysaccharide group, 5 μ mol/L PI3K inhibitor+100 μ g/L lipopolysaccharide group, 10 μ mol/L PI3K inhibitor+100 μ g/L lipopolysaccharide group, 20 μ mol/L PI3K inhibitor+100 μ g/L lipopolysaccharide group. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of interleukin 6 and RANKL. MLO-Y4 osteocytes were divided into four groups: no treatment group (control group), 100 μ g/L lipopolysaccharide group, dimethyl sulfoxide+100 μ g/L lipopolysaccharide group, and 10 μ mol/L PI3K inhibitor+100 μ g/L lipopolysaccharide group. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of RANKL, and western blot was used to detect the protein expression of RANKL and p-AKT.

RESULTS AND CONCLUSION: After lipopolysaccharide stimulation, the mRNA expression of interleukin-6 and RANKL in osteocytes was increased first and then decreased; however, the mRNA expression levels were higher than those in the control group at each time point ($P < 0.05$). After lipopolysaccharide stimulation, the protein expression of RANKL and p-AKT in osteocytes was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$) at each time point, although the protein expression in lipopolysaccharide groups was increased first and then decreased. PI3K inhibitor of 1–10 μ mol/L could decrease the mRNA expression of interleukin 6 and RANKL in lipopolysaccharide-induced osteocytes in a concentration-dependent manner, while 20 and 10 μ mol/L PI3K inhibitor showed similar effects. Both dimethyl sulfoxide and PI3K inhibitors could inhibit the increase in the protein and mRNA expression of RANKL and the protein expression of p-AKT in osteocytes induced by lipopolysaccharide. Furthermore, PI3K inhibitor showed the better inhibitory effect. These results indicate that lipopolysaccharide stimulates the expression of interleukin-6 and RANKL in mouse MLO-Y4 osteocytes through the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: osteocyte; interleukin-6; lipopolysaccharide; PI3K/AKT; receptor activator of nuclear factor- κ B ligand; bone resorption; phosphorylation; PI3K inhibitor

Funding: the 2017 Scientific Research Plan of the Educational Department of Sichuan Province, No. 17ZB0481 (to YK); Western Stomatology Clinical Research Fund of Chinese Stomatological Association, No. CSA-W2018-03 (to YK); the Luzhou Municipal People's Government – Southwest Medical University Strategic Cooperation Project, No. 2020LZXNYDJ31 (to YK)

How to cite this article: LIU QQ, LIU M, YANG J, YU K. Lipopolysaccharide stimulates the expression of interleukin-6 and nuclear factor kappa B receptor activator ligand in mouse MLO-Y4 osteoblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(20):3121-3126.

0 引言 Introduction

脂多糖是革兰阴性细菌内毒素的主要活性成分, 研究表明其与多种炎症性骨吸收有关, 如慢性根尖周炎^[1]、牙周炎^[2]、种植体周围骨吸收^[3-5]、类风湿性关节炎^[6]、骨坏死^[7], 然而, 脂多糖引起炎症性骨吸收的机制仍未完全清楚。骨吸收是由骨重建过程中成骨细胞和破骨细胞功能不平衡或溶解性疾病中破骨细胞活性增强引起的^[8], 因此越来越多的研究集中于脂多糖如何诱导破骨细胞的生成。破骨细胞生成的关键因子有核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)^[9-10]、肿瘤坏死因子家族成员^[8]。RANKL 主要来源于成骨谱系细胞, 包括成骨细胞和骨细胞, 但哪种成骨谱系细胞产生的 RANKL 水平更高仍存在争议^[11]。研究表明脂多糖诱导的骨吸收可通过降低 RANKL 的表达来抑制^[12], 因此可以认为 RANKL 是炎症性骨吸收中的关键细胞因子。

虽然已有研究证实脂多糖可诱导骨细胞表达 RANKL^[4], 但该过程中涉及的信号传导途径仍未完全清楚。基于现有研究, Toll 样受体是各种细胞中 (包括成骨细胞和骨细胞) 脂多糖的经典受体, 当脂多糖与成骨谱系细胞中的 Toll 样受体结合时一系列信号通路被激活, 并且诱导骨重塑细胞因子的表达, 例如白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、白细胞介素 8、骨涎蛋白、前列腺素 E2、肿瘤坏死因子 α 和基质金属蛋白酶^[13-14]。其中白细胞介素 6 可以诱导骨组织中的 RANKL 表达^[15], 并通过促进 RANKL 活性来增强骨细胞介导的破骨细胞生成^[16-17], 因此, 骨细胞中脂多糖 - 白细胞介素 6-RANKL

途径成为研究脂多糖诱导骨吸收疾病的焦点。前期研究证实 ERK1/2 信号通路参与了脂多糖诱导骨细胞白细胞介素 6 的分泌, 白细胞介素 6 通过自分泌的方式进一步刺激骨细胞表达 RANKL^[4]; 然而, 当 ERK1/2 信号通路被阻断时, 脂多糖诱导骨细胞中白细胞介素 6 和 RANKL 表达的上调未被完全抑制, 表明可能还有其他信号通路参与其中^[4]。

PI3K/AKT 信号通路是骨生物学中与细胞凋亡^[18]、成骨细胞增殖和分化^[19]、破骨细胞产生和活化有关的重要信号转导途径^[20], 该途径由机械应力^[21]、循环压缩力^[22]、脂多糖激活^[23], 随后激活下游核因子 κ B 信号通路^[24], 并表现出与经典 Wnt/ β -连环蛋白信号传导途径的串话^[25]。研究表明, PI3K/AKT 不仅与脂多糖诱导的白细胞介素 6 表达有关, 而且与 RANKL 的产生有关, 当脂多糖刺激的 AKT 活化被抑制时白细胞介素 6 在成骨样细胞中的表达也被抑制^[26]。鉴于 PI3K/AKT 信号通路在骨代谢中的重要性, 实验将验证其是否参与了脂多糖刺激骨细胞白细胞介素 6 和 RANKL 的表达, 以丰富脂多糖诱导的炎症性骨吸收的机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验, 计量资料采用单因素 ANOVA 分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 6 月至 2021 年 2 月在西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 细胞系 MLO-Y4 来源于 Lynda F. Bonewald 博士 (密苏里州堪萨斯城密苏里大学口腔生物学系, 美国) 惠赠^[27],

该细胞系为 Y4 小鼠长骨中分离的骨细胞。

1.3.2 主要试剂 α -MEM 培养基购自美国 HyClone 公司；小牛血清和胎牛血清均购自杭州四季青公司；胰酶和 LY294002 (PI3K 抑制剂) 购自上海碧云天生物技术有限公司；胶原购自美国 Biosciences 公司；脂多糖、链霉素和青霉素均购自美国 Sigma Aldrich 公司；抗 RANKL 抗体、抗 β -肌动蛋白抗体及二抗均购自美国 Abcam 公司；RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；qPCR RT Master Mix 购自日本 TOYOBO 公司；qPCR Master Mix 购自上海生工生物工程股份有限公司；CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液及蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；ECL 显影液购自北京英格恩生物科技有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞的培养 复苏 MLO-Y4 细胞后，加入含 89% α -MEM 培养基、体积分数 5% 胎牛血清、体积分数 5% 小牛血清和 1% 双抗 (100 g/L 链霉素和 100 U/mL 青霉素) 的完全培养基培养，培养于 37 °C、体积分数 95% 空气和 5%CO₂ 组成的潮湿环境中。将 MLO-Y4 细胞以 1×10^9 L⁻¹ 的细胞浓度接种在单独的培养瓶中，待细胞长到 90% 时用磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 洗涤 2 次并进行传代，加入 0.25% 胰酶消化液 1 mL，37 °C 消化约 3 min，显微镜下观察细胞已呈流沙样脱落，再加入 2.5 mL 完全培养基终止消化后，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清后加入新鲜完全培养基重悬细胞，平均分装到新的培养瓶中。

1.4.2 脂多糖对骨细胞的白细胞介素 6、RANKL 表达及 AKT 磷酸化的影响 将 MLO-Y4 细胞以 1×10^9 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板中，每孔 2.5 mL，待细胞贴壁后分 2 组处理：实验组加入含脂多糖 (使其质量浓度为 100 μ g/L)^[4]，对照组不做处理。培养 1, 2, 4, 6, 8 h 后提取细胞总 RNA 和总蛋白，采用 RT-qPCR 检测白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达，Western blot 法检测 RANKL 和 p-AKT/AKT 蛋白表达。

1.4.3 不同浓度 LY294002 对脂多糖诱导骨细胞白细胞介素 6、RANKL 表达的影响 将对数生长期的 MLO-Y4 细胞以 1×10^9 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板中，每孔 2.5 mL，每孔分别加入一定量的 LY294002 溶液 (溶于二甲基亚砜中)，使其浓度分别为 1, 2.5, 5, 10, 20 μ mol/L。培养 1 h 后，每孔加入脂多糖使其质量浓度为 100 μ g/L，处理 2 h 或 4 h。设置单独脂多糖处理组与对照组 (不做任何处理)。提取细胞总 RNA，采用 RT-qPCR 检测白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达。

1.4.4 二甲基亚砜对骨细胞增殖的影响 将 MLO-Y4 细胞以 1×10^9 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 96 孔板中，每孔 0.1 mL，实验组加入 1 μ L 二甲基亚砜，对照组未加入二甲基亚砜。24, 48, 72 h 后，采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况。

1.4.5 LY294002 或二甲基亚砜对脂多糖诱导骨细胞 RANKL 表达与 AKT 磷酸化的影响 将 MLO-Y4 细胞以 1×10^9 L⁻¹ 的细胞浓度接种于 6 孔板中，每孔 2.5 mL，分 4 组处理：对照组不做任何处理，培养 4 h 或 6 h；脂多糖组加入脂多糖 (质量浓度为 100 μ g/L) 处理 4 h 或 6 h；二甲基亚砜组加入二甲基亚砜 (与 LY294002 组加入的二甲基亚砜量相同) 处理 1 h，随后加

入脂多糖 (质量浓度为 100 μ g/L) 处理 4 h 或 6 h；LY294002 组加入 LY294002 溶液 (浓度为 10 μ mol/L) 处理 1 h，随后加入脂多糖 (质量浓度为 100 μ g/L) 处理 4 h 或 6 h。提取细胞总 RNA 和总蛋白，采用 RT-qPCR 检测 RANKL 的 mRNA 表达，Western blot 法检测 RANKL 与 p-AKT/AKT 蛋白表达。

1.4.6 相关指标检测方法

RT-qPCR 检测：磷酸缓冲盐溶液洗涤细胞 2 次后，用 RNA 提取试剂盒严格按照说明书从细胞中提取总 RNA，并用 Rever traAce[®]qPCR RT Master Mix 反转录成 cDNA。用 2 \times SG Fast qPCR Master Mix 在 ABI PRISM 7300 Fast Real-Time PCR System 中进行 PCR 扩增引物。PCR 引物，见表 1。

表 1 | PCR 引物

Table 1 | PCR primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
白细胞介素 6	正义链: 5'-GAC AAA GCC AGA GTC CTT CAG AG-3'
	反义链: 5'-TCC TTA GCC ACT CCT TCT GTG AC-3'
核因子 κ B 受体活化因子配体	正义链: 5'-CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG-3'
	反义链: 5'-GGA AGG GTT GGA CAC CTG AAT G-3'
GAPDH	正义链: 5'-GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG C-3'
	反义链: 5'-GAA GGT GGA AGA GTG GGA GTT-3'

倍数变化计算为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ ，以及 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ 。所有引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。每次实验取 3 孔平均值为样本检测值，每组重复实验 3 次。

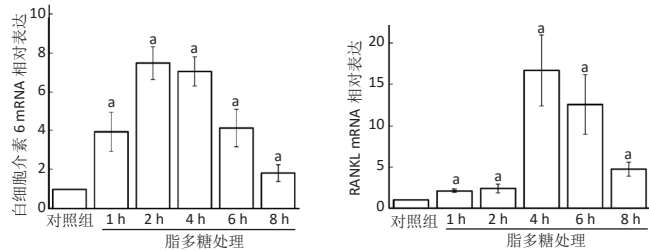
Western blot 法检测：用低温的磷酸缓冲盐溶液 (pH=7.4) 洗涤细胞 3 次，使用总蛋白提取试剂盒在冰上提取总蛋白，4 °C 下 13 000 r/min 离心 15 min，使用 BCA 方法定量测定上清液蛋白浓度，以 SDS 样品缓冲液 (0.125 mol/L Tris-HCl, pH=6.8; 10% 甘油; 2% β -巯基乙醇; 2%SDS; 0.1% 溴酚蓝) 稀释来自每个样品的等量蛋白质 (20 μ g)，再沸水浴 8 min，通过 SDS-PAGE 分离样品并转移到 PVDF 膜上。将膜与 50 g/L 牛血清白蛋白 TBST (10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0; 150 mmol/L NaCl; 0.05%Tween20) 在室温下孵育 2 h 来阻断非特异性蛋白质结合，随后将膜分别与抗 AKT、抗磷酸化 AKT、抗 RANKL 或抗 β -actin 抗体在 4 °C 过夜。将膜用 TBST 洗涤 3 次，每次 5 min，并与辣根过氧化物酶结合的二抗在室温下孵育 1 h。再次将膜在 TBST 中洗涤 3 次 (每次 5 min) 以除去过量的二抗。滴加 ECL 显色液，根据说明书推荐，使用美国 GE Healthcare 公司 ECL 系统检测可视化蛋白条带，使用美国 Bio-Rad 公司 Quantity OneV.4.6.6 软件分析条带。每个结果重复实验 3 次。

1.5 主要观察指标 脂多糖对骨细胞的白细胞介素 6、RANKL 表达及 AKT 磷酸化的影响，不同浓度 LY294002 对脂多糖诱导骨细胞白细胞介素 6、RANKL 表达的影响，以及 10 μ mol/L LY294002 对脂多糖诱导骨细胞 RANKL 表达与 AKT 磷酸化的影响。

1.6 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 22 软件 (IBM, 美国) 通过单因素 ANOVA 分析数据，并使用 SNK 测试进行样品之间的多重比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脂多糖上调骨细胞白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达 脂多糖处理后，骨细胞白细胞介素 6 与 RANKL 的 mRNA 表达显著升高，白细胞介素 6 mRNA 表达于 2 h 达峰值，RANKL mRNA 表达于 4 h 达峰值，脂多糖处理不同时间点的细胞白细胞介素 6 与 RANKL mRNA 表达均高于对照组 ($P < 0.05$)，并且脂多糖处理不同时间点间的细胞白细胞介素 6 与 RANKL mRNA 表达比较差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 1。

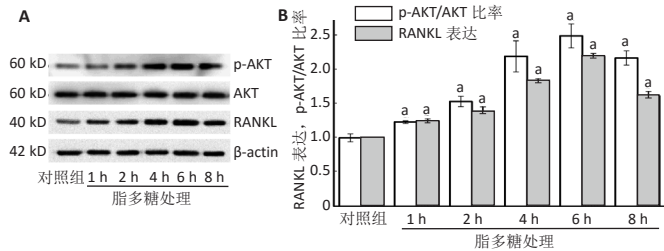


图注：与对照组比较，^a $P < 0.05$

图 1 | 脂多糖对 MLO-Y4 骨细胞中白细胞介素 6 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL)mRNA 表达的影响

Figure 1 | Effects of lipopolysaccharide on the mRNA expression of interleukin-6 and nuclear factor kappa B receptor activator ligand in mouse MLO-Y4 osteocytes

2.2 脂多糖上调骨细胞 RANKL 和 p-AKT/AKT 蛋白的表达 脂多糖处理后，骨细胞 RANKL 与 p-AKT 蛋白表达显著升高，于 6 h 两种蛋白表达达峰值，脂多糖处理不同时间点的 RANKL 与 p-AKT 蛋白表达均高于对照组 ($P < 0.05$)，脂多糖处理不同时间点的 AKT 蛋白与对照组比较差异均无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 2。



图注：A 为 RANKL、p-AKT/AKT 蛋白表达条带；B 为 RANKL、p-AKT/AKT 蛋白表达定量分析结果，与对照组比较，^a $P < 0.05$

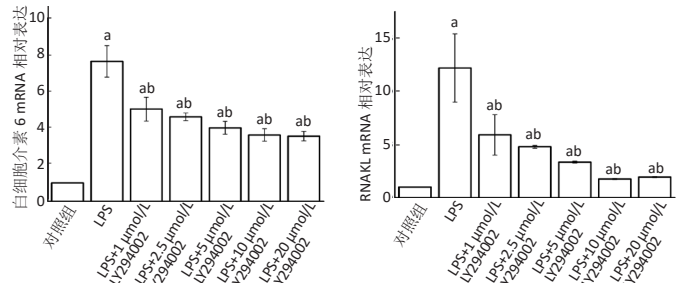
图 2 | 脂多糖对 MLO-Y4 骨细胞中核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 蛋白表达和 AKT 磷酸化的影响

Figure 2 | Effects of lipopolysaccharide on the protein expression of nuclear factor kappa B receptor activator ligand and p-AKT in mouse MLO-Y4 osteocytes

由于 AKT 磷酸化激活 PI3K/AKT 信号途径，实验分析 p-AKT/AKT 蛋白比率以确定 PI3K/AKT 在脂多糖刺激白细胞介素 6 和 RANKL 表达中的作用。与对照组比较，脂多糖处理 1 h 后的 p-AKT/AKT 蛋白比率增加 ($P < 0.05$)，6 h 后的 p-AKT/AKT 蛋白比率显著高于其他时间点 ($P < 0.05$)，然后 p-AKT/AKT 蛋白比率下降，各时间点间两两比较均差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)，见图 2。

2.3 PI3K 抑制剂降低脂多糖诱导的骨细胞白细胞介素 6 和 RANKL mRNA 表达 与对照组比较，脂多糖处理后骨细胞的白

细胞介素 6 和 RANKL mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$)。与单独脂多糖处理比较，不同浓度的 LY294002 预处理 + 脂多糖处理组骨细胞的白细胞介素 6 和 RANKL mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$)；其中 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 预处理 + 脂多糖处理组与 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 预处理 + 脂多糖处理组骨细胞的白细胞介素 6 和 RANKL mRNA 表达比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，但均低于其他浓度 LY294002 预处理 + 脂多糖处理组 ($P < 0.05$)，见图 3。

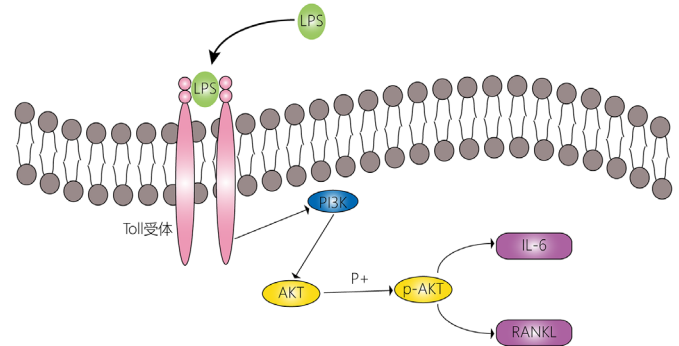


图注：LY294002 为 PI3K 抑制剂，LPS 为脂多糖。与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与 LPS 组比较，^b $P < 0.05$

图 3 | 不同浓度 LY294002 预处理对脂多糖诱导 MLO-Y4 骨细胞白细胞介素 6 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL)mRNA 表达的影响

Figure 3 | Effects of pretreatment with various concentrations of LY294002 on mRNA expression of interleukin-6 and nuclear factor kappa B receptor activator ligand stimulated by lipopolysaccharide in mouse MLO-Y4 osteocytes

表明可以通过对 PI3K 的抑制可下调脂多糖刺激下白细胞介素 6 和 RANKL 的表达，见图 4。

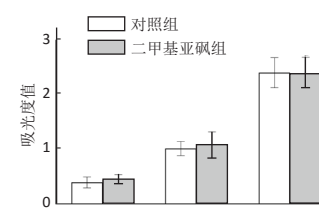


图注：LPS 为脂多糖，IL-6 为白细胞介素 6

图 4 | PI3K/AKT 信号通路在脂多糖刺激下白细胞介素 6 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 表达中的重要调控作用

Figure 4 | Important regulatory role of PI3K/Akt signaling pathway in the expression of interleukin-6 and nuclear factor kappa B receptor activator ligand stimulated by lipopolysaccharide

2.4 二甲基亚砜对骨细胞增殖的影响 二甲基亚砜处理骨细胞不同时间点的增殖吸光度值与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，见图 5。

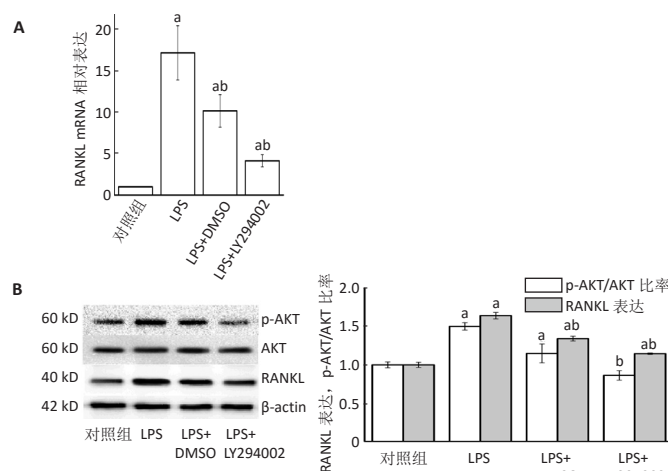


图注：二甲基亚砜处理骨细胞不同时间点的增殖吸光度值与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)

图 5 | 二甲基亚砜对 MLO-Y4 骨细胞增殖的影响

Figure 5 | Effect of dimethyl sulfoxide on proliferation of mouse MLO-Y4 osteocytes

2.5 LY294002 或二甲基亚砜对脂多糖诱导骨细胞 RANKL 表达与 AKT 磷酸化的影响 与对照组比较, 脂多糖组骨细胞的 RANKL mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), p-AKT 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与脂多糖组比较, 二甲基亚砜组骨细胞的 RANKL mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), p-AKT 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 但是并未降到对照组的水平, 与对照组比较差异仍有显著性意义 ($P < 0.05$), 说明二甲基亚砜部分阻断了 PI3K/AKT 信号通路。与脂多糖组比较, LY294002 组骨细胞的 RANKL mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), p-AKT 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 但是 RANKL 表达并未降到对照组的水平, 与对照组比较差异仍有显著性意义 ($P < 0.05$), 说明 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002 可完全抑制 AKT 的磷酸化, 但不能完全阻断脂多糖诱导的 RANKL 表达, 见图 6。



图注: LPS 为脂多糖, DMSO 为二甲基亚砜, LY294002 为 PI3K 抑制剂。A 为 RANKL mRNA 的表达, 与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 LPS 组比较, $^bP < 0.05$ 。B 为 RANKL 与 p-AKT 蛋白的表达, 与对照组比较, $^aP < 0.05$; 与 LPS 组比较, $^bP < 0.05$ 。

图 6 | LY294002 或二甲基亚砜预处理对脂多糖诱导 MLO-Y4 骨细胞核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) 表达及 AKT 磷酸化的影响

Figure 6 | Effects of LY294002 or dimethyl sulfoxide pretreatment on the expression of nuclear factor kappa B receptor activator ligand and p-AKT in mouse MLO-Y4 osteocytes induced by lipopolysaccharides

3 讨论 Discussion

脂多糖在炎症性骨吸收中起关键作用, 特别是在口腔感染性疾病中如种植体周围炎、牙周炎和根尖周炎^[19, 28], 常引起严重的牙槽骨吸收, 导致牙脱落或种植体失败。因此, 迫切需要通过进一步的研究来对脂多糖所致的炎症性骨吸收提供新的治疗选择和理论依据, 然而脂多糖诱导骨吸收的机制仍未完全清楚。目前有较多的研究集中于脂多糖诱导成骨谱系细胞产生白细胞介素 6 和 RANKL 的机制。白细胞介素 6 属于常见的炎症因子, 拥有多种细胞效性, 可激活多种下游信号通路^[16]。RANKL 不仅存在于病理性骨吸收中, 也在正常的生理性骨重塑中发挥重要作用^[29]。成骨谱系细胞作为 RANKL 的重要来源已被许多研究证实^[30-32]。许多因素都可以刺激成骨细胞表达 RANKL, 例如机械刺激、脂多糖和炎症因子^[21-23], 在这些因素中, 脂多糖是引起局部免疫应答重要的

初始刺激, 它在微生物入侵时与许多细胞 (包括成骨细胞和骨细胞) 中表达的 Toll 样受体结合引发免疫反应。许多研究证实, 在炎症过程中脂多糖和 Toll 样受体的相互作用可上调 RANKL 的表达, 从而启动破骨细胞的生成过程^[8, 33-34], 这一结论再次得到此次实验的证实。然而, 脂多糖诱导骨细胞中 RANKL 表达的机制仍不清楚, 特别是 RANKL 和其他细胞因子之间的复杂关系及参与的相关信号传导途径仍然未知, 这些均是治疗炎症性骨吸收的挑战。

前期研中证实, 脂多糖通过 ERK1/2 通路上调白细胞介素 6 的表达, 但当 ERK1/2 通路被抑制时, 脂多糖诱导的白细胞介素 6 和 RANKL 表达虽有降低但仍然高于正常水平^[4], 因此推测还有其他一个或多个通路涉及此过程。首先考虑 PI3K/AKT 信号通路参与这一过程是因为: 已有研究证实成骨细胞中 PI3K/AKT 和 ERK1/2 两个通路共同参与了循环压缩力诱导的白细胞介素 6 分泌^[23], 此外 PI3K/AKT 和 ERK 信号传导途径表现出串联和代偿的关系^[35]。PI3K/AKT 信号通路严格控制整个身体的细胞存活、生长和增殖^[36], 各种分子包括胰岛素、葡萄糖、多种生长因子和细胞因子都能启动 PI3K/AKT 信号传导^[37]。其他信号传导途径也表现出与 PI3K/AKT 的串联关系, 例如核因子 κB 和 Wnt/ β -连环蛋白^[24-25, 38]。实验结果也表明, PI3K/AKT 确实参与了脂多糖诱导的白细胞介素 6 和 RANKL 的表达。

PI3K/AKT 是成骨细胞和破骨细胞中的重要信号转导系统, 在骨生物学中发挥重要作用, 并与骨组织中的 MAPK 亚家族 (ERK、p38、JNK)、GSK3 β 和 Wnt 相互作用以调节骨代谢^[39-40]。当成骨细胞中 PI3K/AKT 被抑制时可以观察到 3 种细胞表型的自主异常: 对细胞凋亡的易感性增加, 分化和功能受到抑制, RANKL 表达降低^[26]。有研究表明, 在成骨细胞中 PI3K/AKT 是脂多糖激活的核因子 κB 信号传导中的重要中间途径, 其介导许多炎症细胞因子的产生^[24]。实验结果显示, 当 PI3K 被 LY294002 抑制时脂多糖诱导的 RANKL 表达降低, 这有利于抑制破骨细胞生成。在破骨细胞中, PI3K/AKT 是 RANKL 活化的重要信号传导途径, 当 AKT 被抑制时, RANKL 诱导的破骨细胞形成受到抑制^[41]。因此, 在成骨细胞和破骨细胞中 PI3K/AKT 信号传导途径的抑制有利于阻止破骨细胞的活化, 减少脂多糖诱导的炎症性骨吸收。

实验以脂多糖诱导 MLO-Y4 骨细胞 RANKL 表达的峰值时间明显晚于白细胞介素 6, 这个发现有两种可能的解释: 第一, RANKL 的表达与白细胞介素 6 之间无任何联系; 第二, RANKL 是白细胞介素 6 的下游。前期研究中抑制白细胞介素 6 下游的 STAT3 途径导致 RANKL 表达显著降低^[4], 这表明 RANKL 是脂多糖刺激下骨细胞白细胞介素 6 的下游因子。在加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, 白细胞介素 6 和 RANKL 的 mRNA 表达水平都出现了明显降低, 这表明 PI3K/AKT 可能既存在于白细胞介素 6 的上游来影响白细胞介素 6 的表达, 也存在于白细胞介素 6 的下游来影响 RANKL 的表达。白细胞介素 6 与 PI3K/AKT 的联系在多种疾病研究中已经被证实, 如慢

性炎症、糖尿病、前列腺癌^[42-44]，其中 Toll 样受体和 PI3K/AKT 在免疫细胞的聚集和多种炎症递质所导致的组织损伤中发挥了重要作用^[44]。

综上所述，脂多糖与骨细胞中的 Toll 样受体结合后同时激活 PI3K/AKT 和其他信号途径以诱导白细胞介素 6 和 RANKL 的表达，这一发现为骨细胞中脂多糖和 RANKL 的相互关联提供了另一条线索，但脂多糖诱导骨细胞中 RANKL 表达的机制仍需进一步研究。

作者贡献：所有作者共同进行实验的设计、实施和评估。

经费支持：该文章接受了“四川省教育厅 2017 年科研计划 (17ZB0481)、中国口腔医学会西部口腔医学临床研究基金 (CSA-W2018-03) 及泸州市人民政府—西南医科大学战略合作项目 (2020LZXNYDJ131)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明：该统计学方法已经西南医科大学生物统计学专家审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名—非商业性使用—相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] BRONZATO JD, DAVIDIAN MES, DE CASTRO M, et al. Bacteria and virulence factors in periapical lesions associated with teeth following primary and secondary root canal treatment. *Int Endod J*. 2021;54(5):660-671.

[2] 刘大勇, 王梅蕊, 兰玲玲, 等. 脂多糖干预卵巢切除小鼠骨髓间充质干细胞的成骨分化能力 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(14):2219-2225.

[3] 余科, 吴湘楠, 刘文佳, 等. LPS 刺激小鼠骨细胞 RANKL/OPG 和 IL-6 表达的实验研究 [J]. *口腔医学研究*, 2016(3):220-223.

[4] YU K, MA Y, LI X, et al. Lipopolysaccharide increases IL-6 secretion via activation of the ERK1/2 signaling pathway to up-regulate RANKL gene expression in MLO-Y4 cells. *Cell Biol Int*. 2017;41(1):84-92.

[5] GALARRAGA-VINUEZA ME, DOHLE E, RAMANAUSKAITE A, et al. Anti-inflammatory and macrophage polarization effects of Cranberry Proanthocyanidins (PACs) for periodontal and peri-implant disease therapy. *J Periodontol Res*. 2020;55(6):821-829.

[6] LI G, LIU Y, MENG F, et al. LncRNA MEG3 inhibits rheumatoid arthritis through miR-141 and inactivation of AKT/mTOR signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(10):7116-7120.

[7] ZHAO X, ALQWBANI M, LUO Y, et al. Glucocorticoids decreased Cx43 expression in osteonecrosis of femoral head: The effect on proliferation and osteogenic differentiation of rat BMSCs. *J Cell Mol Med*. 2021;25(1):484-498.

[8] KITAUURA H, MARAHLEH A, OHORI F, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):5169.

[9] FENG W, GUO J, LI M. RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis. *J Oral Biosci*. 2019;61(1):16-21.

[10] AMIN N, BOCCARDI V, TAGHIZADEH M, et al. Probiotics and bone disorders: the role of RANKL/RANK/OPG pathway. *Aging Clin Exp Res*. 2020;32(3):363-371.

[11] MARTIN TJ, SIMS NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015;16(2):131-139.

[12] JIANG J, JIA Y, LU X, et al. Vitexin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced osteolysis. *J Cell Physiol*. 2019; 234(10):17549-17560.

[13] FANG L, WANG KK, HUANG Q, et al. Nucleolin Mediates LPS-induced Expression of Inflammatory Mediators and Activation of Signaling Pathways. *Curr Med Sci*. 2020;40(4):646-653.

[14] CHAE BS. Pretreatment of Low-Dose and Super-Low-Dose LPS on the Production of In Vitro LPS-Induced Inflammatory Mediators. *Toxicol Res*. 2018;34(1):65-73.

[15] LEE GL, YEH CC, WU JY, et al. TLR2 Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Chondrogenic Differentiation and Consequent Calcification via the Concerted Actions of Osteoprotegerin Suppression and IL-6-Mediated RANKL Induction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(3):432-445.

[16] KIM HJ, KIM HJ, CHOI Y, et al. Zoledronate Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclast Differentiation by IL-6/RANKL Axis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1467.

[17] MCGREGOR NE, MURAT M, ELANGO J, et al. IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2019;294(19):7850-7863.

[18] BEZERRA MÉS, BARBERINO RS, MENEZES VG, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling pathway. *Reprod Fertil Dev*. 2018;30(11):1503-1513.

[19] DENG S, DAI G, CHEN S, et al. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:602-608.

[20] MA Y, RAN D, ZHAO H, et al. Cadmium exposure triggers osteoporosis in duck via P2X7/PI3K/AKT-mediated osteoblast and osteoclast differentiation. *Sci Total Environ*. 2021;750:141638.

[21] DA Y, MOU Y, WANG M, et al. Mechanical stress promotes biological functions of C2C12 myoblasts by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2020;21(1):470-477.

[22] SONG F, WANG Y, JIANG D, et al. Cyclic Compressive Stress Regulates Apoptosis in Rat Osteoblasts: Involvement of PI3K/Akt and JNK MAPK Signaling Pathways. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165845.

[23] LI ST, DAI Q, ZHANG SX, et al. Ulinastatin attenuates LPS-induced inflammation in mouse macrophage RAW264.7 cells by inhibiting the JNK/NF-κB signaling pathway and activating the PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2018; 39(8):1294-1304.

[24] ZHONG Z, CHEN A, FA Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate PI3K/AKT pathway and down-regulate NF-κB pathway by secreting glial cell-derived neurotrophic factors to regulate microglial polarization and alleviate deafferentation pain in rats. *Neurobiol Dis*. 2020;143:104945.

[25] PROSSOMARITI A, PIAZZI G, ALQUATI C, et al. Are Wnt/β-Catenin and PI3K/AKT/mTORC1 Distinct Pathways in Colorectal Cancer? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;10(3):491-506.

[26] YAN L, LU L, HU F, et al. Piceatannol attenuates RANKL-induced osteoclast differentiation and bone resorption by suppressing MAPK, NF-κB and AKT signalling pathways and promotes Caspase3-mediated apoptosis of mature osteoclasts. *R Soc Open Sci*. 2019;6(6):190360.

[27] BONEWALD LF. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Metab*. 1999;17(1): 61-65.

[28] LIN CN, DING SJ, CHEN CC. Synergistic Photoantimicrobial Chemotherapy of Methylene Blue-Encapsulated Chitosan on Biofilm-Contaminated Titanium. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(4):346.

[29] DOUGALL WC, GLACCUM M, CHARRIER K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999;13(18):2412-2424.

[30] MARAHLEH A, KITAUURA H, OHORI F, et al. TNF-α Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. *Front Immunol*. 2019;10: 2925.

[31] KIM HN, XIONG J, MACLEOD RS, et al. Osteocyte RANKL is required for cortical bone loss with age and is induced by senescence. *JCI Insight*. 2020;5(19):e138815.

[32] UCHIBORI S, SEKIYA T, SATO T, et al. Suppression of tooth movement-induced sclerostin expression using β-adrenergic receptor blockers. *Oral Dis*. 2020;26(3): 621-629.

[33] ALQRANEI MS, CHELLAIAH MA. Osteoclastogenesis in periodontal diseases: Possible mediators and mechanisms. *J Oral Biosci*. 2020;62(2):123-130.

[34] TERAMACHI J, INAGAKI Y, SHINOHARA H, et al. PKR regulates LPS-induced osteoclast formation and bone destruction in vitro and in vivo. *Oral Dis*. 2017; 23(2):181-188.

[35] MENDOZA MC, ER EE, BLENIS J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(6):320-328.

[36] EVANGELISTI C, CHIARINI F, CAPPELLINI A, et al. Targeting Wnt/β-catenin and PI3K/Akt/mTOR pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol*. 2020;235(6):5413-5428.

[37] DE SANTIS MC, GULLUNI F, CAMPA CC, et al. Targeting PI3K signaling in cancer: Challenges and advances. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1871(2):361-366.

[38] JOHNSON GE, IVANOV VN, HEI TK. Radiosensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis*. 2008;13(6):790-802.

[39] XIE Y, SHI X, SHENG K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Mol Med Rep*. 2019;19(2):783-791.

[40] SUN K, LUO J, GUO J, et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(4):400-409.

[41] MANNING BD, TOKER A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017; 169(3):381-405.

[42] CHEN H, ZHOU L, WU X, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:1084-1091.

[43] BAI L, GAO J, WEI F, et al. Therapeutic Potential of Ginsenosides as an Adjuvant Treatment for Diabetes. *Front Pharmacol*. 2018;9:423.

[44] HOARE A, SOTO C, ROJAS-CELIS V, et al. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:1029857.

(责任编辑: GW, ZN, SX)