

紫草素干预破骨细胞生成及破骨相关基因的表达

<https://doi.org/10.12307/2022.837>

薄雨佳^{1,2}, 林静^{1,2}, 王莉平^{1,2}, 赵今^{1,2}

投稿日期: 2021-10-08

采用日期: 2021-11-09

修回日期: 2022-01-04

在线日期: 2022-01-22

中图分类号:

R459.9; R781.4; R318

文章编号:

2095-4344(2022)32-05126-06

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△探讨紫草素对核因子κB受体活化因子配体诱导的破骨细胞生成及破骨相关基因表达的影响。

观察指标

(1) 破骨细胞形态;
(2) 抗酒石酸酸性磷酸酶的活性;
(3) 破骨相关基因 mRNA 的表达。

材料

(1) RAW264.7 细胞复苏、培养、传代;
(2) 筛选紫草素作用于 RAW264.7 细胞的最佳浓度;
(3) 筛选诱导破骨细胞的核因子κB受体活化因子配体最佳浓度。

结论

(1) 紫草素抑制了破骨细胞的生成;
(2) 紫草素抑制了破骨相关基因的表达。

文题释义:

牙周炎:是一种常见的多因素感染性疾病,可导致牙周支持组织的破坏,是造成成年人失牙的首要原因,严重影响患者的生活质量。目前临床上治疗牙周炎的方法主要是机械性清除菌斑、牙石并控制其他局部刺激因素,并应用药物作为机械性治疗的辅助治疗控制炎症、阻断牙槽骨吸收及促进骨再生。

紫草素:为紫色片状结晶或结晶性粉末,不溶于水,溶于乙醇、有机溶剂和植物油,易溶于碱水,遇酸又沉淀析出的性质,是存在于紫草中的一种萘醌类化合物,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等作用。

摘要

背景:破骨细胞的活化在牙周炎的发生发展中起重要作用,紫草素因其毒副作用较小并具有抗炎等优点,可将其应用于牙周炎基础治疗后的辅助药物治疗。

目的:探讨紫草素对核因子κB受体活化因子配体(RANKL)诱导的破骨细胞生成及破骨相关基因表达的影响。

方法:采用CCK-8法检测不同浓度紫草素(0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μmol/L)对RAW264.7细胞的毒性,筛选出安全浓度;用不同质量浓度的核因子κB受体活化因子配体(0, 30, 50, 100 μg/L)诱导RAW264.7细胞向破骨细胞分化,经抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察破骨细胞数目,筛选出最佳核因子κB受体活化因子配体质量浓度;给予核因子κB受体活化因子配体和不同浓度的紫草素干预后,通过抗酒石酸酸性磷酸酶染色和抗酒石酸酸性磷酸酶活性检测其对破骨生成的影响;通过实时定量PCR技术检测破骨细胞标志基因基质金属蛋白酶9、组织蛋白酶K、核因子κB受体活化因子、活化T细胞核因子和原癌基因c-Fos的mRNA表达。

结果与结论:①高于0.5 μmol/L的紫草素显著抑制RAW264.7细胞的生长($P < 0.05$);②50 μg/L的核因子κB受体活化因子配体为最佳诱导浓度;③紫草素呈浓度依赖性的抑制体外破骨细胞生成($P < 0.05$);④紫草素呈浓度依赖性的抑制基质金属蛋白酶9、组织蛋白酶K、核因子κB受体活化因子、活化T细胞核因子和原癌基因c-Fos等参与破骨细胞分化的标志基因表达($P < 0.05$);⑤结果表明,紫草素能够在体外呈浓度依赖性的通过抑制破骨相关基因的表达,进而抑制核因子κB受体活化因子配体诱导的破骨细胞的生成。

关键词:紫草素;破骨细胞生成;牙周炎;RAW264.7;核因子κB受体活化因子配体;诱导;活化T细胞核因子;原癌基因c-Fos

缩略语:核因子κB受体活化因子配体:receptor activator for nuclear factor-κB ligand, RANKL;核因子κB受体活化因子:receptor activator for nuclear factor-κB, RANK

Shikonin intervenes with osteoclast formation and osteoclast-related gene expression

Bo Yujia^{1,2}, Lin Jing^{1,2}, Wang Liping^{1,2}, Zhao Jin^{1,2}

¹Department of Dentistry and Endodontics, First Affiliated Hospital (Affiliated Stomatological Hospital) of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Institute of Stomatology of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Bo Yujia, Master candidate, Department of Dentistry and Endodontics, First Affiliated Hospital (Affiliated Stomatological Hospital) of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Zhao Jin, Chief physician, Professor, Department of Dentistry and Endodontics, First Affiliated Hospital (Affiliated Stomatological Hospital) of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Institute of Stomatology of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

¹新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)牙体牙髓科,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830054; ²新疆维吾尔自治区口腔医学研究所,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830054

第一作者:薄雨佳,女,1996年生,新疆维吾尔自治区五家渠市人,汉族,新疆医科大学在读硕士,主要从事天然药物防治牙周病研究以及牙体牙髓病研究。

通讯作者:赵今,主任医师,教授,新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)牙体牙髓科,新疆维吾尔自治区口腔医学研究所,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830054

<https://orcid.org/0000-0002-9318-2469> (薄雨佳)

基金资助:国家重点实验室专项资金(SKLOD20210F04),项目负责人:赵今

引用本文:薄雨佳,林静,王莉平,赵今.紫草素干预破骨细胞生成及破骨相关基因的表达[J].中国组织工程研究,2022,26(32):5126-5131.



Abstract

BACKGROUND: The activation of osteoclast plays an important role in the occurrence and development of periodontitis. In recent years, shikonin has been used as an adjuvant drug after periodontal non-surgical treatment because of its small side effects and anti-inflammatory properties.

OBJECTIVE: To discuss the effects of shikonin on osteoclast formation induced by receptor activator for nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoclast-related gene expression.

METHODS: The toxicity of different concentrations of shikonin (0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1, and 2 μ mol/L) to RAW264.7 cells was detected by cell counting kit-8 assay, and the optimal concentration was determined. RAW264.7 cells were induced into osteoclasts by different concentrations of RANKL (0, 30, 50, 100 μ g/L). The number of osteoclasts was revealed by tartrate resistant acid phosphatase staining, and the optimal concentration of RANKL was determined. After treatment with different concentrations of shikonin, the effects of RANKL on osteoclast formation were detected by tartrate resistant acid phosphatase staining and tartrate resistant acid phosphatase activity. The mRNA expressions of osteoclast marker genes, including matrix metalloproteinase 9, cathepsin K, receptor activator for nuclear factor- κ B, nuclear factor of activated T cells and proto-oncogene c-Fos, were detected by real-time quantitative PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Shikonin at a concentration of higher than 0.5 μ mol/L significantly inhibited the growth of RAW264.7 cells ($P < 0.05$). The optimal induction concentration of RANKL was 50 μ g/L. Shikonin inhibited osteoclast formation in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Shikonin also inhibited the expression of matrix metalloproteinase 9, cathepsin K, receptor activator for nuclear factor- κ B, nuclear factor of activated T cells, and proto-oncogene c-Fos in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). To conclude, shikonin can inhibit RANKL-induced osteoclast formation by inhibiting the expression of osteoclast-related genes in a concentration-dependent manner *in vitro*.

Key words: shikonin; osteoclast formation; periodontitis; RAW264.7; receptor activator for nuclear factor- κ B ligand; induction; nuclear factor of activated T cells; proto-oncogene c-Fos

Funding: the Special Funds of State Key Laboratories, No. SKLOD20210F04 (to ZJ)

How to cite this article: BO YJ, LIN J, WANG LP, ZHAO J. Shikonin intervenes with osteoclast formation and osteoclast-related gene expression. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(32):5126-5131.

0 引言 Introduction

牙周炎是一种口腔常见的炎症性疾病，总体患病率为45%–50%，易造成牙周支持组织的破坏，是40岁以上成年人牙齿缺失最主要的原因。严重的牙周炎还会加重动脉粥样硬化、糖尿病等全身性疾病^[1-2]，因此牙周病的防治对于维持口腔及全身健康是非常重要的。目前临床上治疗牙周炎的方法主要是机械性清除菌斑、牙石并控制其他局部刺激因素，然而应用药物控制炎症、阻断牙槽骨吸收及促进骨再生也是治疗牙周炎不可缺少的一种方法。因此临床上常使用一些抗菌药物作为辅助治疗，常用的抗菌药物有硝基咪唑类^[3]、四环素类^[4]、大环酯类等^[5]。长期使用抗菌药物不仅会使细菌耐药性增强，而且还会导致患者口腔和肠道菌群紊乱，甚至出现牙面着色、呕吐和腹泻等不良反应^[6]。近年来随着中草药的不断发展，中西医结合治疗牙周炎不仅可以协调患者全身状况，还可减少西药使用剂量及其不良反应的发生^[7]，但因中草药理化性质复杂，进一步探索其治疗牙周炎的作用机制具有深远的意义。

破骨细胞是来源于骨髓造血系细胞的多核终末分化细胞。RAW264.7细胞系是来源于cAbelson白血病病毒转化的BALB/c小鼠细胞系的单细胞/巨噬细胞样细胞系，近年来因其在巨噬菌体介导的免疫、代谢和吞噬功能方面有很好的特性，被越来越多地用作研究破骨细胞的细胞模型^[8]。核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)与破骨细胞前体细胞结合，通过激活调节破骨细胞生成的转录因子，从而促进破骨细胞的生成^[9]。紫草素(Shikonin)是存在于紫草中的一种萘醌类化合物，具有抗炎^[10]、抗病毒^[11]、抗肿瘤等作用^[12]，近年来已有中医利用其清热解毒、消炎止痛的功效将紫草应用于牙周炎的治疗，并发现其疗效甚佳^[13]。SHINDO等^[14]研究表明紫草素可以抑制牙周膜干细胞中白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 刺激的炎症反应，进而证明其可以作为抗牙周炎的消炎药。因其化

学成分复杂，还需要进一步研究其防治牙周炎的作用机制。该实验旨在研究紫草素对RANKL诱导的破骨细胞生成的影响，并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods**1.1 设计 细胞学实验。**

1.2 时间及地点 实验于2021年3–8月在新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院完成。

1.3 材料 RAW264.7细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)、DMEM培养基、 α -MEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗(penicillin-streptomycin solution, PS)(Biological Industries公司,以色列);重组小鼠RANKL蛋白(Peprotech公司,美国);紫草素(源叶,中国上海);抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒、抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒(索莱宝,中国);细胞毒性试剂(Dojindo公司,日本);反转录试剂盒(Thermo Scientific公司,美国);Quanti Nova SYBR Green PCR试剂盒(QIAGEN公司,德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 小鼠单核巨噬细胞RAW264.7复苏后接种到含体积分数10%FBS、1%PS的DMEM完全培养基的细胞瓶内，置于37℃、体积分数5%CO₂培养箱中孵育过夜，次日观察细胞贴壁情况，待细胞融合至70%–80%传代、冻存。

RAW264.7 细胞的培养

细胞来源	小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为武汉普诺赛生命科技有限公司提供
培养基介绍	DMEM 培养基、 α -MEM 培养基
添加材料	含体积分数 10%FBS、1% 青霉素 - 链霉素双抗 (PS)
培养时间	置于 37℃、体积分数 5%CO ₂ 培养箱中孵育过夜，次日观察细胞贴壁情况
细胞传代	待细胞融合至 70%–80% 传代，2 d 传代 1 次，取第 5 代细胞进行实验

1.4.2 CCK-8 细胞毒性实验 将 RAW264.7 细胞以 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每组 6 个复孔。24 h 后弃掉原培养基加入含紫草素浓度为 0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μ mol/L 及含 0.1% 二甲基亚砷的 DMEM 完全培养基, 分别培养 24, 48, 72 h 后将培养基更换为含 10% CCK-8 试剂的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后于酶标仪上选择 450 nm 测吸光值。通过下述公式计算细胞存活率: [(实验孔 - 空白孔)/(对照孔 - 空白孔)] \times 100%。

1.4.3 RANKL 的质量浓度筛选 将 RAW264.7 细胞以 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每组 3 个复孔。24 h 后细胞贴壁弃去原培养基, 分别加入含有 0, 30, 50, 100 μ g/L RANKL 的 α -MEM 完全培养基, 隔天换液。培养 5 d 后用 PBS 冲洗, 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 10 min, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色法对细胞染色。倒置相差显微镜下观察, 记录破骨细胞阳性细胞的数量 (细胞核数 \geq 3)。

1.4.4 抗酒石酸酸性磷酸酶染色 将 RAW264.7 细胞以 2×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 每组 3 个复孔。24 h 后细胞贴壁弃去原培养基, 分别加入含有 RANKL(50 μ g/L) 且紫草素浓度为 0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 μ mol/L 的 α -MEM 完全培养基, 隔天换液。培养 5 d 后用 PBS 洗 2 遍, 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 10 min, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色法对细胞染色。倒置相差显微镜下观察, 记录破骨细胞阳性细胞的数量 (细胞核数 \geq 3)。

1.4.5 抗酒石酸酸性磷酸酶活性检测 将 RAW264.7 细胞以 1×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 每组 3 个复孔。24 h 后细胞贴壁弃去原培养基, 分别加入含有 RANKL(50 μ g/L) 且紫草素浓度为 0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 μ mol/L 的 α -MEM 完全培养基, 隔天换液。培养 5 d 后用 PBS 洗 2 遍, 使用 0.1% Triton 裂解细胞提取蛋白, 根据抗酒石酸酸性磷酸酶检测试剂盒在 405 nm 测定吸光度。根据酶活性定义, 计算出样本中的抗酒石酸酸性磷酸酶活性。

1.4.6 实时定量 PCR 将 RAW264.7 细胞以 1×10^5 /皿的密度接种于 6 cm 培养皿中, 每皿 5 mL, 每组 3 个平行皿。24 h 后细胞贴壁弃去原培养基, 别加入含有 RANKL 且紫草素浓度为 0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 μ mol/L 的 α -MEM 完全培养基, 隔天换液。培养 5 d 后采用 Trizol 法提取总 RNA, 并将其反转录成 cDNA 用于 Real-Time PCR 检测基质金属蛋白酶、RANK、组织蛋白酶 K、活化 T 细胞核因子 (nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1) 和原癌基因 c-Fos mRNA 的表达。使用反应体系为 10 μ L, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 40 个循环。基因引物序列见表 1, 以 GAPDH 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示目的基因的相对表达水平。

1.5 主要观察指标 ①筛选紫草素作用于 RAW264.7 细胞的最佳安全浓度; ②筛选诱导破骨细胞的最佳 RANKL 质量浓度; ③观察破骨细胞的形态、抗酒石酸酸性磷酸酶染色及抗酒石酸酸性磷酸酶活性情况; ④破骨细胞标志性基因基质金

表 1 | 基因引物序列

Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列	产物长度 (bp)
基质金属蛋白酶 9	forward 5'-AAA CCC TGT GTT CCC GTT CAT C-3'; reverse 5'- AGT TTA TCC TGG TCA TAG TTG GCT GTG-3'.	119
RANK	forward 5'-GTC TCA TCG TTC TGC TCC TCT TCA TC-3'; reverse 5'- GCT TTC CCT CCC TTC CTG TAG TAA AC-3'.	85
组织蛋白酶 K	forward 5'-CTT CCA ATA CGT GCA GCA GA-3'; reverse 5'-TCT TCA GGG CTT TCT CGT TC-3';	155
活化 T 细胞核因子	forward 5'-CCG TTG CTT CCA GAA AAT AAC A-3'; reverse 5'- TGT GGG ATG TGA ACT CGG AA-3'.	102
c-Fos	forward 5'-CCA GTC AAG AGC ATC AGC AA-3'; reverse 5'-AAG TAG TGC AGC CCG GAG TA-3'	247
GAPDH	forward 5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3'; reverse 5'-CTC GCT CCT GGA AGA TGG TG-3'	233

属蛋白酶 9、组织蛋白酶 K、RANK、活化 T 细胞核因子和 c-Fos 的 mRNA 表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学分析。计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 若满足正态性及方差齐性, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett 法; 若不满足正态性及方差齐性, 则采用秩和检验。检验水准: $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过新疆医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

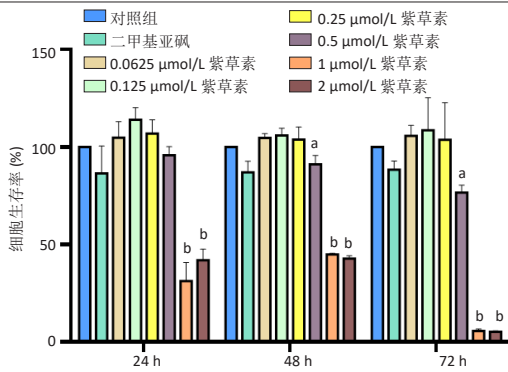
2.1 紫草素对 RAW264.7 细胞生存率的影响 因冻存细胞使用的冻存液含有 1% 的二甲基亚砷, 为排除紫草素抑制破骨细胞生成是药物本身细胞毒性以及冻存时使用的二甲基亚砷本身的毒性作用导致, 采用 CCK-8 比色法测定 0-2 μ mol/L 的紫草素浓度及 1% 二甲基亚砷对 RAW264.7 细胞在 24, 48, 72 h 的细胞毒性作用。结果显示, 0-0.5 μ mol/L 的紫草素及 1% 二甲基亚砷 72 h 内对 RAW264.7 的毒性作用较小; 0.5 μ mol/L 在 48, 72 h 时存活率分别为 91.1% 和 76.6% (均 $P < 0.05$); 1, 2 μ mol/L 在 24, 48, 72 h 时存活率均低于 50%, 与对照组 (0 μ mol/L) 相比差异有显著性意义, 而其他浓度与对照组相比差异无显著性意义。因此, 实验选择了 0.062 5-0.5 μ mol/L 的紫草素浓度进行后续实验, 见表 2 和图 1。

表 2 | 紫草素对 RAW264.7 细胞生存率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, %)

Table 2 | The effect of shikonin on cell viability of RAW264.7

组别	24 h	48 h	72 h
对照组 (0 μ mol/L)	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00	100.00 \pm 0.00
1% 二甲基亚砷	86.45 \pm 12.19	86.95 \pm 4.92	88.34 \pm 3.82
紫草素浓度			
0.062 5 μ mol/L	104.72 \pm 7.13	104.65 \pm 1.91	105.72 \pm 4.61
0.125 μ mol/L	113.98 \pm 5.43	105.88 \pm 3.23	108.58 \pm 14.46
0.25 μ mol/L	106.81 \pm 6.17	103.83 \pm 5.59	103.67 \pm 16.48
0.5 μ mol/L	95.72 \pm 3.86	91.11 \pm 3.90 ^a	76.62 \pm 3.30 ^a
1 μ mol/L	31.19 \pm 8.23 ^b	44.82 \pm 0.56 ^b	5.61 \pm 0.84 ^b
2 μ mol/L	41.82 \pm 4.94 ^b	42.70 \pm 1.32 ^b	5.13 \pm 0.44 ^b
F 值	62.41	191.50	202.80
P 值	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1

表注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

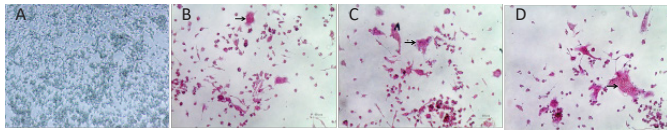


图注：与对照组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$

图 1 | 紫草素对 RAW264.7 细胞生存率的影响

Figure 1 | The effect of shikonin on cell viability of RAW264.7

2.2 RANKL 质量浓度对破骨细胞生成的影响 为研究 RANKL 质量浓度对破骨细胞生成的影响，用 0, 30, 50, 100 μg/L RANKL 处理 5 d。抗酒石酸酸性磷酸酶染色显示，RANKL 质量浓度越高破骨细胞数目越多，100 μg/L 组的破骨细胞内的细胞核较其他组明显更多。30, 50, 100 μg/L RANKL 组与阴性对照组相比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)，但 50 μg/L 与 100 μg/L 组之间差异无显著性意义。因此，实验选择了 50 μg/L 的 RANKL 浓度进行后续实验，见图 2，表 3。



图注：图 A 为阴性对照组；B 为 30 μg/L RANKL 组；C 为 50 μg/L RANKL 组；D 为 100 μg/L RANKL 组。抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性且细胞核数目大于 3 个的为破骨细胞（图中箭头所指）

图 2 | 核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) 质量浓度对破骨细胞生成的影响 (倒置显微镜下，抗酒石酸酸性磷酸酶染色，×100)

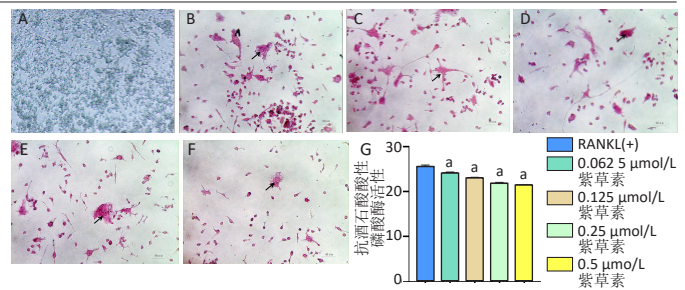
Figure 2 | Effect of receptor activator for nuclear factor-κB ligand concentration on osteoclast formation under an inverted microscope (tartrate-resistant acid phosphatase staining, ×100)

表 3 | RANKL 质量浓度对破骨细胞生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$, 个/视野)
Table 3 | Effect of receptor activator for nuclear factor-κB ligand concentration on osteoclast formation

RANKL 质量浓度	破骨细胞数量
阴性对照组 (0 μg/L)	0.00±0.00
30 μg/L	10.67±1.53 ^a
50 μg/L	25.67±1.53 ^a
100 μg/L	25.67±1.33 ^a
F 值	188.1
P 值	< 0.000 1

表注：按抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性且细胞核数目大于 3 个的破骨细胞进行计数，与对照组相比，^a $P < 0.01$ 。RANKL：核因子 κB 受体活化因子配体

2.3 紫草素抑制 RANKL 诱导的破骨细胞生成 为研究紫草素对破骨细胞生成的影响，用 RANKL 和不同浓度的紫草素 (0, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 μmol/L) 处理 5 d，进行抗酒石酸酸性磷酸酶染色。在 0.062 5–0.5 μmol/L 浓度时紫草素能够抑制体外 RANKL 诱导的破骨细胞分化，并呈浓度依赖性 ($F=124.2$, $P < 0.01$)。此外，紫草素还以浓度依赖的方式降低了破骨分化过程中抗酒石酸酸性磷酸酶的活性 ($F=676.1$, $P < 0.01$)，见图 3，表 4。



图注：图 A–D 为倒置显微镜下观察 (×100)，A 为空白组；B 为 RANKL 组；C 为 RANKL+0.062 5 μmol/L 紫草素组；D 为 RANKL+0.125 μmol/L 紫草素组；E 为 RANKL+0.25 μmol/L 紫草素组；F 为 RANKL+0.5 μmol/L 紫草素组。抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性且细胞核数目大于 3 个的为破骨细胞 (图中箭头所指)；G 为抗酒石酸酸性磷酸酶活性分析，空白组不参与方差分析，与 RANKL 组相比，^a $P < 0.01$

图 3 | 紫草素对核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) 诱导的破骨细胞分化的影响

Figure 3 | Effect of shikonin on osteoclast differentiation induced by receptor activator for nuclear factor-κB ligand

表 4 | 紫草素对 RANKL 诱导的破骨细胞分化的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, 个/视野)
Table 4 | Effect of shikonin on osteoclast differentiation induced by receptor activator for nuclear factor-κB ligand

组别	破骨细胞数量
空白组 (无 RANKL)	0.00±0.00
RANKL 组	25.67±1.53
RANKL+0.062 5 μmol/L 紫草素	16.67±1.53 ^a
RANKL+0.125 μmol/L 紫草素	11.33±0.58 ^a
RANKL+0.25 μmol/L 紫草素	8.67±1.53 ^a
RANKL+0.5 μmol/L 紫草素	4.00±1.00 ^a
F 值	124.2
P 值	< 0.000 1

表注：按抗酒石酸酸性磷酸酶染色阳性且细胞核数目大于 3 个的破骨细胞进行计数，与对照组相比，^a $P < 0.01$ 。RANKL：核因子 κB 受体活化因子配体

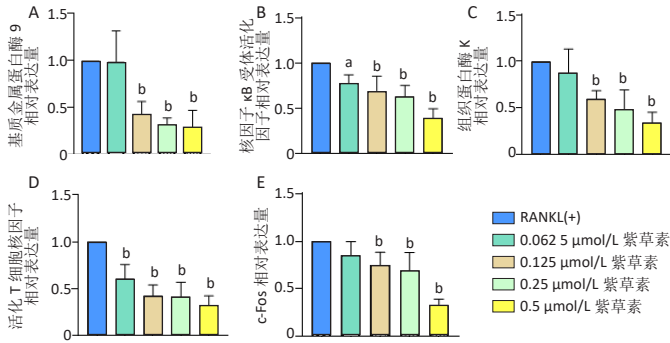
2.4 紫草素抑制 RANKL 诱导的破骨细胞相关基因表达 为进一步证实紫草素能够抑制破骨细胞的生成，通过实时定量 PCR 检测紫草素对 RANKL 诱导 5 d 后破骨细胞相关标志物基因 mRNA 表达的影响。紫草素 0.125–0.5 μmol/L 能够浓度依赖性地抑制基质金属蛋白酶 9、组织蛋白酶 K、c-Fos (均 $P < 0.01$) mRNA 水平的表达；0.062 5 μmol/L 的紫草素对 RANK、活化 T 细胞核因子 1 mRNA 水平的表达具有明显的抑制作用 (均 $P < 0.01$)，见表 5，图 4。

表 5 | 紫草素对 RANKL 诱导的破骨细胞相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$, 相对表达量)

Table 5 | Effect of shikonin on expression of osteoclast-related genes induced by receptor activator for nuclear factor-κB ligand

组别	基质金属蛋白酶 9	核因子 κB 受体活化因子	组织蛋白酶 K	活化 T 细胞核因子	c-Fos
RANKL 组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
RANKL+0.062 5 μmol/L 紫草素	0.99±0.42	0.77±0.12 ^a	0.87±0.34	0.61±0.16 ^b	0.85±0.19
RANKL+0.125 μmol/L 紫草素	0.43±0.17 ^b	0.69±0.20 ^b	0.60±0.11 ^b	0.43±0.13 ^b	0.75±0.18 ^b
RANKL+0.25 μmol/L 紫草素	0.32±0.09 ^b	0.63±0.14 ^b	0.49±0.26 ^b	0.41±0.19 ^b	0.70±0.24 ^b
RANKL+0.5 μmol/L 紫草素	0.29±0.23 ^b	0.39±0.11 ^b	0.34±0.15 ^b	0.33±0.13 ^b	0.33±0.08 ^b
F 值	21.37	23.64	15.26	30.14	20.95
P 值	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1	< 0.000 1

表注：与 RANKL 相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。RANKL：核因子 κB 受体活化因子配体



图注: 图A为基质金属蛋白酶9表达; B为核因子κB受体活化因子表达; C为组织蛋白酶K表达; D为活化T细胞核因子表达; E为c-Fos表达。与RANKL组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。RANKL: 核因子κB受体活化因子配体

图4 | 实时定量PCR检测紫草素对破骨细胞相关基因mRNA表达的影响
Figure 4 | Effect of shikonin on mRNA expression of osteoclast-related genes induced by receptor activator for nuclear factor-κB ligand detected by real-time quantitative PCR

3 讨论 Discussion

牙周炎是一种细菌导致的慢性炎症性疾病, 可导致牙周支持组织的破坏^[15]。牙槽骨作为牙周支持组织的组成部分, 其结构和其他骨骼基本一致, 是骨骼中变化最活跃的部分^[16], 牙槽骨的吸收是牙周炎病理性变化之一, 而破骨细胞是参与骨吸收的主要功能细胞。过去破骨细胞的体外分离和培养存在相当大的困难, 因此阻碍了破骨细胞的研究^[17]。为了解决破骨细胞培养的问题, 研究者们发现一些原代破骨细胞前体细胞, 包括骨髓巨噬细胞^[18]、脾细胞和外周血单核细胞^[19-20], 它们可以在RANKL、巨噬细胞集落刺激因子等信号因子的刺激下融合为多核细胞并最终活化成破骨细胞^[21]。然而, 由于这些细胞系的特征, 不同细胞研究准备之间的可用性和反应模式的差异给这些原代细胞的使用带来了困难^[22]。因此, 此次研究采用成熟的破骨细胞前体细胞RAW264.7。

MASHALKAR等^[23]研究表明绝经后妇女牙槽骨丢失的严重程度可能是全身性骨质流失的一个早期危险指标, 因此牙周炎早期的发现可以有助于预防骨质疏松的发生。目前中药治疗牙周炎的临床应用越来越广泛, 紫草素是存在于紫草中的一种萘醌类化合物, 但对其治疗牙周炎机制的研究较少。因此为初步探索其防治牙周炎的相关机制, 此次研究将紫草素倍比稀释成不同浓度作用于RAW264.7细胞, 结果显示0.5 μmol/L以下的紫草素对RAW264.7细胞是安全的。抗酒石酸酸性磷酸酶被称为破骨细胞表型标记物, 抗酒石酸酸性磷酸酶染色是用于检测破骨细胞生成的标准方法^[24], 此次研究通过抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察破骨细胞数目以及抗酒石酸酸性磷酸酶活性检测发现紫草素呈浓度依赖性降低RANKL诱导的破骨细胞生成, 证明紫草素可抑制RANKL诱导的破骨细胞生成。但从染色中可发现高浓度药物处理组细胞数量明显减少, 提示结果并非通过抑制破骨细胞分化, 而是通过诱导细胞凋亡发挥作用, 后续需通过细胞凋亡实验进一步证明。

基质金属蛋白酶是锌依赖性内肽酶家族, 基质金属蛋白酶9与骨骼发育、重塑和修复以及细胞外基质的降解有关, 其通过切割组蛋白H3N末端尾部在破骨细胞基因的活性转录中发挥关键作用刺激骨吸收^[25]。组织蛋白酶K是破骨细胞上的标志性表达, 在激活的破骨细胞中高水平的活化酶极化细胞皱褶缘, 溶酶体囊泡与细胞膜皱褶缘融合, 组织蛋白酶K被释放到细胞外^[26]。因此为进一步探讨紫草素抑制破骨细胞生成的机制, 此次研究通过实时定量PCR技术检测结果显示紫草素呈剂量依赖性的抑制了必需的转录因子基质金属蛋白酶9、组织蛋白酶K的mRNA表达水平。此外, RANK是表达在破骨细胞及其前体细胞上的RANKL受体^[27], RANKL只有与其结合后才能够诱导破骨细胞的生成, 实验通过实时定量PCR技术检测得出紫草素可以抑制RANKL的表达水平, 这提示其抑制破骨生成可能和减少了RANKL与RANK的结合有关。c-Fos是一种已建立的参与破骨细胞分化的必需转录因子, 由RANK-RANKL相互作用传递信号诱导的c-Fos可以直接激活活化T细胞核因子的表达^[28]。而活化T细胞核因子是在调节许多破骨细胞特异性基因, 例如组织蛋白酶K和基质金属蛋白酶9等基因的表达中起关键作用的下游核转录因子^[29]。因此, 阻断c-Fos/NFATc1信号通路及其标志表达, 对抑制RANKL诱导破骨细胞前体细胞向破骨细胞分化、减少破骨细胞生成有重要意义。结合实时定量PCR结果推断, 紫草素也可能是通过抑制RANK、活化T细胞核因子和c-Fos的表达进而抑制破骨细胞的生成。

综上所述, 紫草素通过抑制破骨细胞标志性基因基质金属蛋白酶9、RANK、组织蛋白酶K、活化T细胞核因子和c-Fos mRNA的表达, 来抑制体外RANKL诱导的破骨细胞生成, 从而对牙周炎牙槽骨的吸收显示出潜在的治疗作用, 但仍需与后期动物实验相互验证, 为牙周炎的防治提供有力的理论依据。破骨细胞的生物活性受到一系列信号通路的调控^[30], 但是若想证明紫草素是通过这一系列的信号通路抑制破骨细胞的生成仍需进一步的蛋白质免疫印迹技术检测相关因子蛋白水平表达的证实。前期课题组研究发现紫草粗提物对6种主要致龋细菌的生长代谢及致龋的毒力因子均有显著的抑制作用^[31], 证明了紫草素有着抑菌的作用。而牙周炎的主要致病因素为细菌, 因此紫草素是否能够通过抑制其相关致病菌的脂多糖进而防治牙周炎的发生发展还需进一步研究探讨。

致谢: 向赵今教授、新疆医科大学第一附属医院临床研究院各位老师以及所有参与实验的人员表示感谢。

作者贡献: 构思及实验设计为赵今和薄雨佳, 实验实施为薄雨佳、王莉平, 实验评估为赵今, 资料收集为林静, 数据统计为薄雨佳, 文章撰写为薄雨佳, 审校为赵今。

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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

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。

出版规范: 文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《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》。或者学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》, 出版前经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重, 经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] KATO T, FUJIWARA N, KURAJI R, et al. Relationship between periodontal parameters and non-vital pulp in dental clinic patients: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):109-118.
- [2] SANZ M, MARCO DEL CASTILLO A, JEPSEN S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020; 47(3):268-288.
- [3] 田军. 替硝唑联合牙周基础治疗对重度牙周炎的疗效观察 [J]. *北方药学*, 2020, 17(6):48-49.
- [4] PERAYIL J, MENON KS, BISWAS R, et al. Comparison of the efficacy of subgingival irrigation with 2% povidone-iodine and tetracycline HCl in subjects with chronic moderate periodontitis: A clinico microbiological study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016;13(2):98-109.
- [5] 吴晓翔, 李德泳. 大环内酯类抗生素联合牙周基础治疗对侵袭性牙周炎临床观察 [J]. *慢性病学杂志*, 2015, 16(2):213-214.
- [6] 李伶俐, 李潇. 黄芩苷预防和治理牙周炎研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(1):200-203.
- [7] 成思源. 中西医结合治疗牙周炎的研究进展 [J]. *医疗装备*, 2021, 34(14):187-188.
- [8] VISAGIE A, KASONGA A, DEEPAK V, et al. Commercial Honeybush Tea Extract Inhibits Osteoclast Formation and Bone Resorption in RAW264.7 Murine Macrophages-An in vitro Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(11):13779-13793.
- [9] ZHOU L, HUANG Y, ZHAO J, et al. Oridonin promotes osteogenesis through Wnt/ β -catenin pathway and inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro. *Life Sci*. 2020;26(2):118-123.
- [10] FAN C, ZHANG XF, UPTON Z. Anti-inflammatory effects of shikonin in human periodontal ligament cells. *Pharm Biol*. 2018;56(1):415-421.
- [11] ZHANG Y, HAN H, QIU H, et al. Antiviral activity of a synthesized shikonin ester against influenza A (H1N1) virus and insights into its mechanism. *Biomed Pharmacother*. 2017;93(21):636-645.
- [12] GUO C, HE J, SONG X, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin-A review in recent years. *Pharmacol Res*. 2019;149(18): 1044-1063.
- [13] 李晓瑾, 谭秀芳, 马媛, 等. 药用植物紫草的研究进展 [J]. *新疆师范大学学报*, 2005, 24(4):69-74.
- [14] SHINDO S, HOSOKAWA Y, HOSOKAWA I, et al. Shikonin Inhibits Inflammatory Cytokine Production in Human Periodontal Ligament Cells. *Inflammation*. 2016;39(3):1124-1129.
- [15] CORRÊA MG, PIRES PR, RIBEIRO FV, et al. Systemic treatment with resveratrol reduces the progression of experimental periodontitis and arthritis in rats. *PLoS One*. 2018;13(10):e0204414.
- [16] ALMEIDA JM, MATHEUS HR, FIORIN LG, et al. Influence of immunosuppression on the progression of experimental periodontitis and on healthy periodontal tissue: A rat in vivo study. *Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2021;15(2):94-99.
- [17] COLLIN-OSDOBY P, OSDOBY P. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol Biol*. 2012;16(8):187-202.
- [18] KONG L, WANG B, YANG X, et al. Integrin-associated molecules and signalling cross talking in osteoclast cytoskeleton regulation. *Cell Mol Med*. 2020;24(6):3271-3281.
- [19] REINKE DC, KOGAWA M, BARRATT KR, et al. Evidence for altered osteoclastogenesis in splenocyte cultures from Cyp27b1 knockout mice. *Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;16(4):353-360.
- [20] GUO T, ZHANG LQ, KONERMANN A, et al. Manganese superoxide dismutase is required to maintain osteoclast differentiation and function under static force. *Sci Rep-Uk*. 2015;5(8):89-108.
- [21] MENG J, ZHOU C, ZHANG W, et al. Stachydrine prevents LPS-induced bone loss by inhibiting osteoclastogenesis via NF- κ B and Akt signalling. *Cell Mol Med*. 2019;23(10):6730-6743.
- [22] KONG L, SMITH W, HAO D. Overview of RAW264.7 for osteoclastogenesis study: Phenotype and stimuli. *Cell Mol Med*. 2019;23(5):3077-3087.
- [23] MASHALKAR VN, SURAGIMATH G, ZOPE SA, et al. A Cross-Sectional Study to Assess and Correlate Osteoporosis and Periodontitis among Postmenopausal Women: A Dual Energy X-Ray Absorptiometry Study. *J Midlife Health*. 2018;9(1):2-7.
- [24] HAYMAN AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41(3): 218-233.
- [25] KIM Y, KIM J, LEE H, et al. Tetracycline Analogs Inhibit Osteoclast Differentiation by Suppressing MMP-9-Mediated Histone H3 Cleavage. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16):4038.
- [26] 宋倩, 李玉坤. 组织蛋白酶 K 与骨质疏松症治疗的研究进展 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 2014, 22(4):498-501.
- [27] KITAZAWA R, HARAGUCHI R, KOHARA Y, et al. RANK- NFATc1 signaling forms positive feedback loop on rank gene expression via functional NFATc1 responsive element in rank gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;57(2):86-91.
- [28] KIM JH, KIM M, JUNG HS, et al. Leonurus sibiricus L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation. *Int J Mol Med*. 2019;44(3):913-926.
- [29] ZENG XZ, HE LG, WANG S, et al. Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF- κ B and NFATc1 activation and DC-STAMP expression. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(2):255-263.
- [30] 谢冰洁, 冯捷, 韩向龙. 破骨细胞生物学特征的研究与进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(11):1770-1775.
- [31] 袁曦玉, 从兆霞, 吴泽钰, 等. 新疆软紫草粗提物对口腔主要致龋菌体外作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(3):552-555.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)