

淫羊藿苷在炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响

韩月, 王雨菲, 刘婉晴, 董明, 牛卫东

<https://doi.org/10.12307/2024.455>

投稿日期: 2023-07-03

采用日期: 2023-08-21

修回日期: 2023-08-30

在线日期: 2023-09-04

中图分类号:

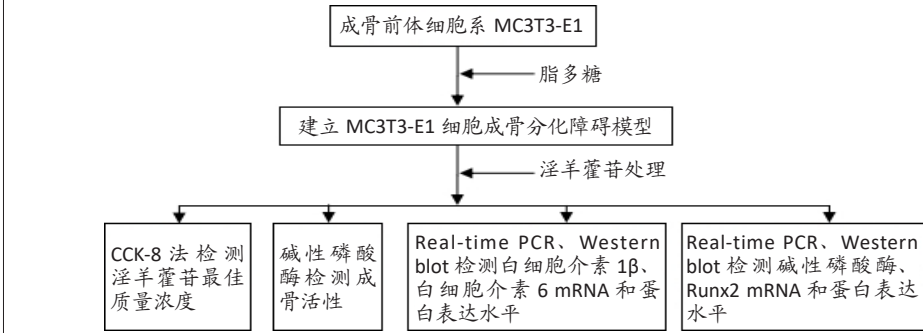
R459.9; R394.2; R781

文章编号:

2095-4344(2024)23-03709-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 淫羊藿苷对脂多糖诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化障碍的保护作用



文题释义:

淫羊藿苷: 是从小檗属淫羊藿中提取的天然类黄酮化合物, 具有许多生物活性和药理作用, 可能通过促进骨形成和抑制炎症在炎症性骨破坏疾病中发挥重要作用。此外淫羊藿苷还具有抗氧化、抗衰老和抗肿瘤作用。

脂多糖: 是牙髓卟啉单胞菌外膜的主要成分, 可直接或间接抑制成骨细胞功能和刺激破骨细胞形成来影响骨结构。

摘要

背景: 研究表明慢性根尖周炎是常见的炎症性骨破坏疾病之一, 淫羊藿苷可以促进成骨分化、抑制骨吸收, 可能对慢性根尖周炎引起的骨破坏起到保护作用。

目的: 探讨在脂多糖刺激的炎症环境下淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响。

方法: 应用脂多糖刺激 MC3T3-E1 细胞建立体外炎症环境, 采用 CCK-8 检测脂多糖最佳作用质量浓度及作用时间; CCK-8 检测在 1 μg/mL 脂多糖刺激下淫羊藿苷的最佳作用质量浓度; 碱性磷酸酶染色、Real-time PCR 及 Western blot 检测炎症环境下淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的影响; Real-time PCR 及 Western blot 检测炎症环境下淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞炎症相关因子白细胞介素 1β、白细胞介素 6 表达的影响。

结果与结论: ① CCK-8 结果显示, 淫羊藿苷的最佳作用质量浓度为 0.1 μg/mL; ② 在炎症环境下, 淫羊藿苷增强了碱性磷酸酶的表达, 促进了成骨细胞分化; ③ 与脂多糖组相比, 脂多糖+淫羊藿苷组成骨相关因子碱性磷酸酶、Runx2 表达升高; ④ 与脂多糖组相比, 脂多糖+淫羊藿苷组炎症相关因子白细胞介素 1β、白细胞介素 6 表达水平下降; ⑤ 结果提示, 脂多糖能导致 MC3T3-E1 细胞成骨分化能力减弱并加重炎症反应, 淫羊藿苷对其具有保护作用。

关键词: MC3T3-E1 细胞; 淫羊藿苷; 慢性根尖周炎; 脂多糖; 成骨分化

Effects of icariin on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells in an inflammatory environment

Han Yue, Wang Yufei, Liu Wanqing, Dong Ming, Niu Weidong

Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Han Yue, Master candidate, Physician, Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Corresponding author: Niu Weidong, MD, Professor, Doctoral supervisor, Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that chronic apical periodontitis is one of the common inflammatory bone destruction diseases. Icariin can promote osteogenic differentiation, inhibit bone resorption, and may play a protective role in bone destruction caused by chronic apical periodontitis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of icariin on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells in the inflammatory environment stimulated by lipopolysaccharides.

METHODS: Lipopolysaccharides were used to stimulate MC3T3-E1 cells to establish an inflammatory environment in vitro, and cell counting kit-8 was used to detect the best concentration and optimal action time of lipopolysaccharides. Cell counting kit-8 was used to detect the optimal concentration of icariin under the stimulation of lipopolysaccharides at a concentration of 1 μg/mL. Alkaline phosphatase detection, Real-time PCR and western blot assay were used to detect the effect of icariin on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells in the inflammatory environment. Real-time PCR and western blot were used to detect the effects of icariin on the expression of interleukin-1β and interleukin-6 in MC3T3-E1 cells in the lipopolysaccharide-stimulated inflammatory environment.

大连医科大学口腔医学院牙体牙髓科, 辽宁省大连市 116044

第一作者: 韩月, 女, 1997 年生, 辽宁省大石桥市人, 汉族, 大连医科大学在读硕士, 主要从事根尖周炎与骨破坏研究。

通讯作者: 牛卫东, 博士, 教授, 大连医科大学口腔医学院牙体牙髓科, 辽宁省大连市 116044

<https://orcid.org/0009-0003-8966-4427> (韩月)

基金资助: 国家自然科学基金 (82270971, 82100998), 项目负责人: 牛卫东; 辽宁省教育厅面上项目 (LJKZ0841), 项目负责人: 牛卫东; 辽宁省科学技术计划项目 (2021JH2/10300027), 项目负责人: 牛卫东; 辽宁省自然科学基金 (2022-BS-237), 项目负责人: 牛卫东

引用本文: 韩月, 王雨菲, 刘婉晴, 董明, 牛卫东. 淫羊藿苷在炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(23):3709-3714.



RESULTS AND CONCLUSION: Cell counting kit-8 results showed that the optimal concentration of icariin was 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the inflammatory environment, icariin enhanced the expression of alkaline phosphatase and promoted osteoblast differentiation. Compared with the lipopolysaccharide group, the expression of osteogenesis-related factors alkaline phosphatase and Runx2 was increased in the lipopolysaccharide+icariin group. Compared with the lipopolysaccharide group, the expression levels of inflammation-related factors interleukin-1 β and interleukin-6 decreased in the lipopolysaccharide+icariin group. To conclude, lipopolysaccharides weaken the osteogenic ability of MC3T3-E1 cells and aggravate the inflammatory response, but icariin has a protective effect on them.

Key words: MC3T3-E1 cell; icariin; chronic apical periodontitis; lipopolysaccharide; osteogenic differentiation

Funding: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 82270971 and 82100998 (to NWD); General Project of Liaoning Provincial Department of Education, No. LJKZ0841 (to NWD); Liaoning Provincial Science and Technology Program, No. 2021JH2/10300027 (to NWD); Liaoning Provincial Natural Science Foundation, No. 2022-BS-237 (to NWD)

How to cite this article: HAN Y, WANG YF, LIU WQ, DONG M, NIU WD. Effects of icariin on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells in an inflammatory environment. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(23):3709-3714.

0 引言 Introduction

慢性根尖周炎是世界范围内流行的口腔疾病，其特征是由牙髓中长期感染引起根尖周组织的炎症反应和骨破坏^[1-2]。然而，组织对抗感染的结果是正常组织的丧失^[3]。值得注意的是，根尖周肉芽肿是慢性根尖周炎的早期阶段，其炎症反应比根尖周囊肿更强烈^[4-5]。骨质流失是慢性根尖周炎的另一个临床特征，是由微生物因素和免疫防御反应引起的。作为一种炎症性疾病，慢性根尖周炎会导致骨吸收和重建之间的不平衡，引起骨质流失^[6]。正常情况下，骨吸收量等于骨形成量，处于动态平衡，这个过程称为骨耦合^[7]。在慢性根尖周炎中，当病原微生物通过根管到达根尖周组织时，局部会发生炎症，在炎症因子的影响下，激活破骨细胞，开始骨吸收，抑制成骨细胞增殖分化，骨吸收大于骨形成，最终导致牙槽骨丢失^[8-10]。然而，慢性根尖周炎的骨质流失是不可阻挡的^[11]，并且很难修复。

革兰阴性菌有2个不同的膜：内膜和外膜。外膜外小叶的一个突出成分是脂多糖。许多细菌的脂多糖成分是有毒的^[12]。研究表明，革兰阴性厌氧微生物会导致根尖周感染^[13-14]。牙髓卟啉单胞菌 (*P. endodontalis*) 是一种革兰阴性厌氧微生物，最常从感染的根管和根尖周病变中分离出来^[15-16]。牙髓卟啉单胞菌的主要毒力因子是脂多糖，它可以诱导各种细胞分泌炎症性细胞因子并促进骨破坏^[17-18]。如核因子 κB 是一种转录因子，响应脂多糖而被激活并易位到细胞核内。已有研究表明，脂多糖影响成骨细胞分化并诱导骨丢失，并通过核因子 κB 信号通路促进破骨形成^[19]。因此，对于慢性根尖周炎骨破坏的研究需以脂多糖作为研究背景。

为了寻找治疗骨质疏松症的预防或替代疗法，越来越多的研究人员转向传统中药，特别是类黄酮。淫羊藿是具有数百年历史的中国传统草药，用于治疗骨折、关节疾病和性腺功能障碍^[20]。淫羊藿苷是从淫羊藿中分离的典型类黄酮化合物^[21]。越来越多的证据表明，淫羊藿苷可能通过刺激骨形成同时抑制骨吸收，在骨骼健康中发挥双重作用^[22]。重要的是，淫羊藿苷已被用于治疗多种炎症性疾病，如阿尔茨海默病、炎症性肠病、骨关节炎和牙周炎，对促炎信号的传导有强大的抑制作用^[23]。研究表明淫羊藿苷既有骨修复作用又有减轻炎症的作用，但是淫羊藿苷能否在脂多糖诱导的炎症环境下减轻炎症并促进骨修复尚不清楚。该实验以小鼠成骨前体细胞 (MC3T3-E1) 为研究对象，应用脂多糖刺激建立体外炎症环

境，探讨淫羊藿苷在炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响，为临床治疗慢性根尖周炎提供新思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 2022-05-01/2023-04-01 在大连医科大学口腔医学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 小鼠成骨前体细胞 (MC3T3-E1) 购自中国科学院细胞库。

1.3.2 实验仪器 二氧化碳培养箱 (Thermo); 超净工作台 (Boxun); 显微照相系统 (OLYMPUS); 电泳仪及电泳槽 (北京六一厂); 凝胶成像系统 (BIO-RAD); 酶标仪、反转录仪 (BIO-RAD); PCR 仪 (TaKaRa)。

1.3.3 药品与试剂 淫羊藿苷 (曼思特生物科技有限公司, 50 mg/瓶); α -MEM 培养基 (Hyclone); ECL 超高敏显影液 (Thermo Fish); CCK-8 (东仁化学科技有限公司); 碱性磷酸酶染色试剂盒 (碧云天); 碱性磷酸酶试剂盒 (Elabscience); Western blot 检测抗体 (华安生物); 总 RNA 提取试剂盒 (生物工程股份有限公司); 反转录试剂盒 (TaKaRa); PCR 引物 (Thermo Fish)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 将 MC3T3-E1 细胞培养于含有体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素及链霉素的 α -MEM 培养基中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的孵育箱中培养，定期观察，待细胞融合至 80% 左右进行传代，弃去原培养基，PBS 洗 2 次，加入 0.25% 胰酶消化 3 min，加入培养液终止消化，1 500 r/min 离心 5 min，弃去上清，加入培养液吹打混匀，进行后续实验。

1.4.2 药物配制 称取淫羊藿苷粉末 0.001 g，溶解于 1 mL 二甲基亚砜中，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的储存液，-80 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.4.3 细胞增殖检测 将 MC3T3-E1 细胞接种于 96 孔板中 (4 000 个/孔)，分别加入 0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激 24 h，筛选其最佳作用质量浓度；将 MC3T3-E1 细胞接种于 96 孔板中 (4 000 个/孔)，分别加入 0, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激 0, 24, 48 h，筛选其最佳作用时间。将 MC3T3-E1 细胞接种于 96 孔板中 (4 000 个/孔)，在加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖基础上分别用 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿苷处理 0,

24, 48 h, 以确定淫羊藿苷最佳作用质量浓度。在上述作用时间点, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂及 90 μL α -MEM 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 培养箱内孵育 1 h, 酶标仪检测 450 nm 处吸光度。

1.4.4 碱性磷酸酶染色 将 MC3T3-E1 细胞以每孔 6×10^4 的密度接种于 6 孔板中, 24 h 后更换成骨诱导培养液 (每 100 mL 培养液含胎牛血清 20 mL、 α -MEM 培养基 77.9 mL、50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 维生素 C 100 μL 、1 mol/L β -甘油磷酸钠 1 mL、1 mmol/L 地塞米松 1 μL 、青霉素/链霉素 1 mL), 对照组仅加入成骨诱导液, 脂多糖组及脂多糖+淫羊藿苷组在成骨诱导液中加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖及 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖+0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿苷, 每 2 d 更换 1 次成骨诱导液。在细胞诱导 7 d 后进行碱性磷酸酶染色: 弃去诱导液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 1 mL 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, ddH₂O 洗 3 次, 每次 5 min, 配置碱性磷酸酶染色反应液, 每孔加入 1 mL 反应液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, ddH₂O 洗 3 次终止显色反应, 显微镜下观察碱性磷酸酶染色情况。

1.4.5 碱性磷酸酶活力检测 将 MC3T3-E1 细胞以每孔 6×10^4 的密度接种于 6 孔板中, 按照 1.4.4 的方法处理 7 d 后提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 将标准品稀释至 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL 质量浓度, 在酶标孔板中加样, 酶标仪检测吸光度值, 根据公式计算碱性磷酸酶活力。

标准品拟合曲线: $y=ax+b$

碱性磷酸酶活力 (金氏单位 /g) = $(\Delta A - b) \div a \div \text{Cpr} \times f$ 。

ΔA : 测定孔吸光度值; f : 样本加入检测体系前的稀释倍数; Cpr : 待测样本的蛋白质量浓度 (g/mL)。

1.4.6 Real-time PCR 检测目的基因表达 将 MC3T3-E1 细胞以 1×10^6 的密度接种于 6 孔板, 对照组不采用脂多糖刺激, 脂多糖组用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激 24 h, 脂多糖+淫羊藿苷组在脂多糖刺激 24 h 后加入 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿苷作用 48 h, 根据 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 并检测 RNA 浓度, 然后反转录为 cDNA 用于后续实验, 采用实时荧光定量 PCR 检测目的基因的表达, 以 GAPDH 作为内参引物, 序列见表 1。

表 1 | Real-time PCR 相关基因引物序列
Table 1 | Primer sequences of related genes

基因名称	引物序列
碱性磷酸酶	Forward: 5'-TGA ATC GGA ACA ACC TGA CTG A-3' Reverse: 5'-GAG CCT GCT TGG CCT TAC C-3'
Runx2	Forward: 5'-CCT CTG GCC TTC CTC TCT CA-3' Reverse: 5'-TAG GTA AAG GTG GCT GGG TAG TG-3'
白细胞介素 1 β	Forward: 5'-CCA GCT TCA AAT CTC ACA GCA G-3' Reverse: 5'-CTT CTT TGG GTA TTG CTT GGG ATC-3'
白细胞介素 6	Forward: 5'-TCC AGT TGC CTT CTT GGG AC-3' Reverse: 5'-GTA CTC CAG AAG AGA GG-3'
GAPDH	Forward: 5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3' Reverse: 5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'

1.4.7 Western blot 检测目的蛋白表达 将 MC3T3-E1 细胞以 1×10^6 的密度接种于 6 孔板, 用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激 24 h, 脂多糖+淫羊藿苷组在脂多糖刺激 24 h 后加入 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫

羊藿苷作用 48 h, 每孔加入 100 μL 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂和 PMSF) 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 然后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜, 封闭, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 一抗包括碱性磷酸酶抗体 (1 : 1 000)、Runx2 抗体 (1 : 500)、白细胞介素 1 β 抗体 (1 : 500)、白细胞介素 6 抗体 (1 : 500)、GAPDH 抗体 (1 : 5 000), TBST 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 然后与辣根过氧化物酶偶联的抗兔、抗山羊或抗小鼠二抗 (稀释 1 : 5 000) 在室温下孵育 1 h, 然后膜用增强化学发光 (ECL) 处理, 用 Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像。

1.5 主要观察指标 ①采用 CCK-8 检测在脂多糖刺激的炎症环境下淫羊藿苷的最佳作用质量浓度; ②采用碱性磷酸酶染色、Western blot、Real-time PCR 检测炎症环境下淫羊藿苷干预后 MC3T3-E1 细胞成骨相关指标碱性磷酸酶、Runx2 的表达水平; ③ Western blot、Real-time PCR 检测炎症环境下淫羊藿苷干预后 MC3T3-E1 细胞中炎症相关因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 的表达水平。

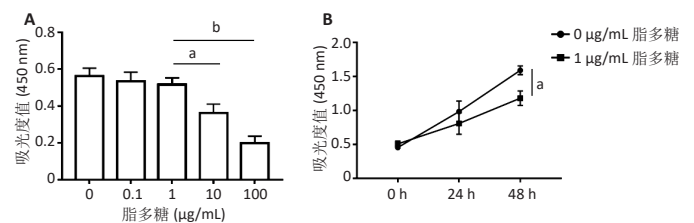
1.6 统计学分析 通过 SPSS 27.0 软件, 运用 one-way ANOVA 分析各组实验结果。结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过大连医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 脂多糖作用于 MC3T3-E1 细胞的最佳作用质量浓度与时间

2.1.1 最佳作用质量浓度 加入 0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激 MC3T3-E1 细胞 24 h, 可以看到 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞增殖活性明显降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 说明高质量浓度的脂多糖刺激对 MC3T3-E1 细胞产生了毒性作用, 最终确定以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳作用质量浓度, 见图 1A。

2.1.2 最佳作用时间 以 0, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖分别刺激 MC3T3-E1 细胞 0, 24, 48 h, 结果显示 24 h 时脂多糖组细胞的增殖活性降低, 48 h 时脂多糖组细胞的增殖活性明显下降, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 因此确定最佳实验时间 24 h, 见图 1B。

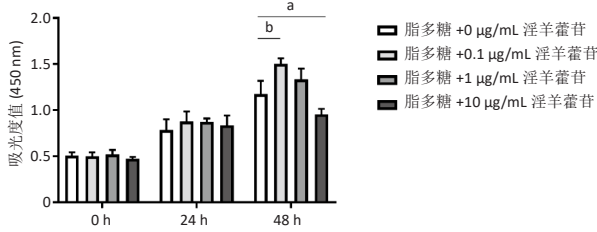


图注: 图 A 为 CCK-8 检测不同质量浓度脂多糖作用于 MC3T3-E1 细胞 24 h 的增殖情况; B 为 CCK-8 检测 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖作用不同时间 MC3T3-E1 细胞增殖情况。^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$

图 1 | 脂多糖作用于 MC3T3-E1 细胞的最佳作用质量浓度与时间
Figure 1 | The optimal concentration and time of lipopolysaccharides acting on MC3T3-E1 cells

2.2 淫羊藿苷最佳作用质量浓度 在加入 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激的基础上, 分别用 0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿苷处理 MC3T3-E1 细胞 0, 24, 48 h 后, CCK-8 结果显示 48 h 时

0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿苷在炎症环境下促进 MC3T3-E1 细胞增殖活性最佳, 当淫羊藿苷质量浓度达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 MC3T3-E1 细胞产生了细胞毒性, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

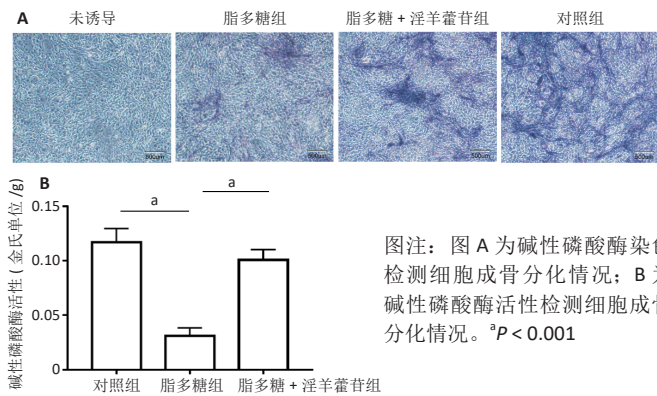


图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 2 | 淫羊藿苷作用于 MC3T3-E1 细胞的最佳作用质量浓度

Figure 2 | The optimal concentration of icariin acting on MC3T3-E1 cells

2.3 淫羊藿苷在脂多糖刺激的炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞成骨分化过程中碱性磷酸酶表达的影响 MC3T3-E1 细胞采用成骨诱导液诱导 7 d 后进行碱性磷酸酶染色, 与对照组相比, 脂多糖组碱性磷酸酶染色程度明显降低, 与脂多糖组相比, 脂多糖 + 淫羊藿苷组碱性磷酸酶染色程度明显升高, 见图 3A; 在检测碱性磷酸酶活性时发现, 与脂多糖组相比, 脂多糖 + 淫羊藿苷组细胞成骨分化能力显著增强, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 3B。



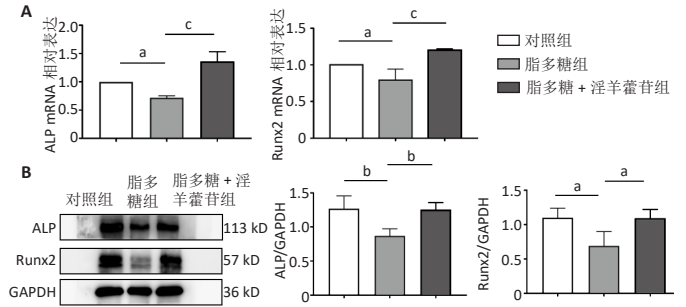
图注: 图 A 为碱性磷酸酶染色检测细胞成骨分化情况; B 为碱性磷酸酶活性检测细胞成骨分化情况。^a $P < 0.001$

图 3 | 淫羊藿苷在炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶表达的影响

Figure 3 | Effect of icariin on alkaline phosphatase expression in MC3T3-E1 cells in an inflammatory environment

2.4 淫羊藿苷在脂多糖刺激的炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞成骨分化过程中成骨相关因子碱性磷酸酶、Runx2 表达的影响 Real-time PCR 结果显示, 与对照组相比, 脂多糖组成骨相关基因碱性磷酸酶、Runx2 mRNA 的表达水平均受到明显抑制, 与脂多糖组比较, 脂多糖 + 淫羊藿苷组碱性磷酸酶、Runx2 mRNA 的表达水平明显提高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 4A; Western blot 检测结果同样显示, 与脂多糖组比较, 脂多糖 + 淫羊藿苷组碱性磷酸酶、Runx2 蛋白表达水平显著升高, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 4B。

2.5 淫羊藿苷在脂多糖刺激的炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞炎症相关因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 表达的影响 Real-time PCR 结果显示, 与对照组相比, 脂多糖组炎症相关因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 mRNA 表达水平明显升高, 在淫羊藿苷作用 48 h 后, 与脂多糖组相比, 脂多糖 + 淫羊藿

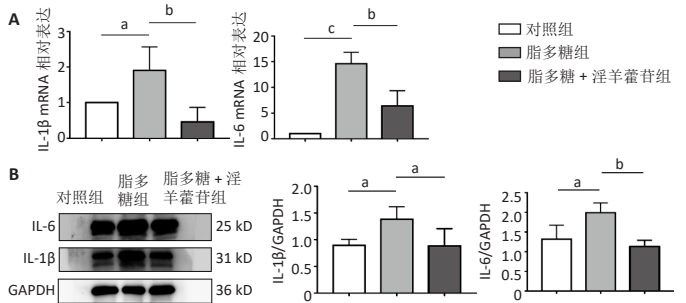


图注: 图 A 为 Real-time PCR 结果显示淫羊藿苷在脂多糖诱导的炎症环境下可以增强 MC3T3-E1 中 ALP、Runx2 mRNA 的表达; B 为 Western blot 结果显示淫羊藿苷在脂多糖诱导的炎症环境下可以增强 MC3T3-E1 中 ALP、Runx2 蛋白的表达。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 4 | 淫羊藿苷在炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞成骨相关因子碱性磷酸酶 (ALP)、Runx2 表达的影响

Figure 4 | Effect of icariin on the expression of osteogenesis-related factors alkaline phosphatase and Runx2 in MC3T3-E1 cells in an inflammatory environment

苷组白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 mRNA 表达水平明显降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5A。Western blot 结果显示, 与对照组相比, 脂多糖组炎症相关因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 蛋白表达水平明显升高, 与脂多糖组相比, 脂多糖 + 淫羊藿苷组白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 蛋白表达水平明显降低, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图 5B。



图注: 图 A 为 Real-time PCR 结果显示淫羊藿苷在脂多糖诱导的炎症环境下可以减弱 MC3T3-E1 中 IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达; B 为 Western blot 结果显示淫羊藿苷在脂多糖诱导的炎症环境下可以减弱 MC3T3-E1 中 IL-1 β 、IL-6 蛋白的表达。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$

图 5 | 淫羊藿苷在炎症环境下对 MC3T3-E1 细胞炎症相关因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6) 表达的影响

Figure 5 | Effects of icariin on the expression of inflammation-related factors interleukin-1 β and interleukin-6 in MC3T3-E1 cells in an inflammatory environment

3 讨论 Discussion

骨组织稳态由破骨细胞和成骨细胞调节^[23-24]。影响骨形成和骨破坏平衡的因素可导致骨形成障碍, 慢性根尖周炎是一种以炎症性骨破坏为主要临床表现的疾病。炎症可抑制成骨细胞的增殖和分化, 骨形成受到阻碍^[25]。脂多糖是革兰阴性菌的主要毒力因子^[26], 是根尖周炎炎症骨破坏的致病因素^[26]。该实验选用脂多糖来干预成骨前体细胞系 MC3T3-E1, 体外模拟慢性根尖周炎时的炎症性骨破坏。实验结果发现, 采用高脂多糖处理后, MC3T3-E1 细胞增殖活力明显受到抑制, 产生了细胞毒性。将不同质量浓度的淫羊藿苷作用于 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖刺激的 MC3T3-E1 细胞后, 筛选出 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳

作用质量浓度。

MC3T3-E1 细胞是来源于小鼠头骨的前成骨细胞，通常用于研究骨形成过程^[27]。成骨细胞主要通过细胞增殖、分化和矿化参与骨形成^[28-30]。碱性磷酸酶是细胞矿化和成骨分化过程中重要的单磷酸水解酶，在矿化组织的细胞中高度表达^[31-32]。碱性磷酸酶在生长早期产生，很容易在细胞表面和所有组织、骨骼和钙化软骨中找到^[33]。该实验以脂多糖处理 MC3T3-E1 细胞并经过成骨诱导后进行碱性磷酸酶染色，结果显示与正常对照组相比，脂多糖组显色明显减弱，证明脂多糖对 MC3T3-E1 细胞成骨分化具有抑制作用。

Runx2 为成骨细胞特异性转录因子，Runx2 对于成骨细胞分化和软骨细胞成熟至关重要^[34]。有研究表明，基因敲除的 Runx2^{-/-} 小鼠成骨细胞分化能力减弱，骨形成受到抑制，软骨细胞成熟也明显受抑制^[35-37]。该实验结果证实，与正常对照组相比，脂多糖组明显降低了成骨相关因子碱性磷酸酶、Runx2 mRNA 和蛋白的表达水平。白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 均为炎症反应的关键递质^[38-39]，主要在巨噬细胞和中性粒细胞中表达^[40]。该实验确认了脂多糖对促炎因子的调节功能，脂多糖可以诱导白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 mRNA 和蛋白表达升高，说明脂多糖可以诱导炎症以及 MC3T3-E1 细胞的成骨分化障碍。

淫羊藿苷是一种典型的黄酮醇糖苷，已被确定对预防骨质流失和促进骨再生具有有益的作用^[41]。研究表明，将淫羊藿苷加入到成骨细胞中，它促进了人成骨细胞和 MC3T3-E1 细胞系的增殖^[42]。另据报道，淫羊藿苷显著促进大鼠成骨细胞中 I 型胶原蛋白和骨桥蛋白 mRNA 的表达，并且随着淫羊藿苷质量浓度的增加，表达逐渐增强^[43]。在该研究中使用 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淫羊藿苷处理 MC3T3-E1 细胞，结果显示与脂多糖组相比，脂多糖 + 淫羊藿苷组碱性磷酸酶显色更加明显，碱性磷酸酶活性也显著增加，成骨相关因子碱性磷酸酶、Runx2 mRNA 和蛋白表达也明显升高。抗炎在骨骼愈合中起着重要作用，淫羊藿苷通过对促炎和抗炎信号通路等施加有效的调节作用，具有显著的抗炎活性^[44]。在骨关节炎大鼠模型中，淫羊藿苷显著降低了促炎细胞因子水平，包括 NLRP3、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18^[45]。研究表明淫羊藿苷可以抵消脂多糖对骨髓间充质干细胞成骨分化的抑制作用，成骨相关因子碱性磷酸酶、Runx2、骨桥蛋白和骨形态发生蛋白 2 表达升高，并且淫羊藿苷显著抑制脂多糖诱导的 IKK α 、IKK β 和 p65 磷酸化^[46]。已有学者发现淫羊藿苷可以促进成骨细胞增殖和分化以及小鼠颅骨缺损骨修复^[47]。该实验探讨淫羊藿苷能否在炎症环境下促进 MC3T3-E1 细胞增殖分化，在建立脂多糖诱导 MC3T3-E1 细胞成骨分化障碍的基础上，观察淫羊藿苷发挥促进成骨分化并抗炎的作用。与脂多糖组相比，脂多糖 + 淫羊藿苷组炎症相关因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 mRNA 和蛋白表达水平降低，这突出了淫羊藿苷作为治疗剂治疗细菌诱导的骨质丧失疾病的潜在用途。

实验主要的不足之处：一是未建立小鼠体内根尖周炎模型，没有对淫羊藿苷在体内的影响进行验证；二是未设置阳性对照，无法判断出淫羊藿苷的药效；三是未进行机制方面的研究。以上将是实验室继续研究的重点与方向。

综上所述，应用脂多糖干预 MC3T3-E1 细胞后，导致 MC3T3-E1 细胞成骨分化障碍。淫羊藿苷可通过提高成骨相关因子碱性磷酸酶、Runx2 mRNA 及蛋白的表达并降低炎症相关因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6 mRNA 及蛋白的表达，提高 MC3T3-E1 细胞增殖分化的能力，促进骨修复，从而为临床治疗慢性根尖周炎提供新思路。

致谢：感谢导师在研究及论文撰写过程中的指导，以及师弟师妹们在实验上的帮助和支持。

作者贡献：实验设计为第一作者和通讯作者，实验实施、资料收集为全体作者。

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。

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。

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。

出版规范：该文章撰写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。

4 参考文献 References

- CAVALLA F, LETRA A, SILVA RM, et al. Determinants of Periodontal/ Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*. 2021;100(1):29-36.
- MÖLLER AJ, FABRICIUS L, DAHLÉN G, et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981;89(6):475-484.
- DAHLÉN G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000*. 2002;28:206-239.
- LIN X, CHI D, MENG Q, et al. Single-Cell Sequencing Unveils the Heterogeneity of Nonimmune Cells in Chronic Apical Periodontitis. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:820274.
- GALLER KM, WEBER M, KORKMAZ Y, et al. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1480.
- LUO X, WAN Q, CHENG L, et al. Mechanisms of bone remodeling and therapeutic strategies in chronic apical periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:908859.
- YU W, ZHONG L, YAO L, et al. Bone marrow adipogenic lineage precursors promote osteoclastogenesis in bone remodeling and pathologic bone loss. *J Clin Invest*. 2021;131(2):e140214.
- WEI W, LI J, LIU X, et al. Inhibition of RGS10 Aggravates Periapical Periodontitis via Upregulation of the NF- κ B Pathway. *J Endod*. 2022; 48(10):1308-1318.
- HAJISHENGALLIS G. New developments in neutrophil biology and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2020;82(1):78-92.
- TAN X, HUANG D, ZHOU W, et al. Dickkopf-1 may regulate bone coupling by attenuating wnt/ β -catenin signaling in chronic apical periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2018;86:94-100.

- [11] XU R, GUO D, ZHOU X, et al. Disturbed bone remodelling activity varies in different stages of experimental, gradually progressive apical periodontitis in rats. *Int J Oral Sci.* 2019;11(3):27.
- [12] WANG X, QUINN PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):97-107.
- [13] WITTGOW WC JR, SABISTON CB JR. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod.* 1975;1(5):168-171.
- [14] FELIPE PEREIRA R, WILLIAN LATTARI TESSARIN G, YAMAMOTO CHIBA F, et al. Apical periodontitis promotes insulin resistance and alters adaptive immunity markers in rats. *Saudi Dent J.* 2021;33(8):979-986.
- [15] LOMBARDO BEDRAN TB, MARCANTONIO RA, SPIN NETO R, et al. Porphyromonas endodontalis in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *J Oral Microbiol.* 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.10123.
- [16] WANG R, YANG D, YU YQ, et al. Effect of inhibition of Porphyromonas endodontalis on osteoblast differentiation. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2021;30(4):350-354.
- [17] FU X, SUN X, ZHANG C, et al. Genkwanin Prevents Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Bone Destruction and Ovariectomy-Induced Bone Loss. *Front Nutr.* 2022;9:921037.
- [18] YANG D, LI R, QIU LH, et al. Effects of lipopolysaccharides extracted from Porphyromonas endodontalis on the expression of IL-1 β mRNA and IL-6 mRNA in osteoblasts. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2009;18(2):194-197.
- [19] FANG C, HE M, LI D, et al. YTHDF2 mediates LPS-induced osteoclastogenesis and inflammatory response via the NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Cell Signal.* 2021;85:110060.
- [20] HONG C, YANG L, ZHANG Y, et al. Epimedium brevicornum Maxim. Extract exhibits pigmentation by melanin biosynthesis and melanosome biogenesis/transfer. *Front Pharmacol.* 2022;13:963160.
- [21] LUO Z, DONG J, WU J. Impact of Icarin and its derivatives on inflammatory diseases and relevant signaling pathways. *Int Immunopharmacol.* 2022;108:108861.
- [22] MING LG, CHEN KM, XIAN CJ. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling. *J Cell Physiol.* 2013;228(3):513-521.
- [23] KARSENTY G, WAGNER EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002;2(4):389-406.
- [24] TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):292-304.
- [25] LI Y, LING J, JIANG Q. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. *Front Immunol.* 2021;12:691013.
- [26] ALQURIA TA, ALFIRDOUS RA, GUPTA S, et al. Comparison of conventional and contemporary root canal disinfection protocols against bacteria, lipoteichoic acid (LTA), and lipopolysaccharide (LPS). *Sci Rep.* 2023;13(1):1206.
- [27] SUDO H, KODAMA HA, AMAGAI Y, et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol.* 1983;96(1):191-198.
- [28] TIAGO DM, CANCELA ML, LAIZÉ V. Proliferative and mineralogenic effects of insulin, IGF-1, and vanadate in fish osteoblast-like cells. *J Bone Miner Metab.* 2011;29(3):377-382.
- [29] NIU T, ROSEN CJ. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene.* 2005;361:38-56.
- [30] KITASE Y, PRIDEAUX M. Targeting osteocytes vs osteoblasts. *Bone.* 2023;170:116724.
- [31] CAO FY, LONG Y, WANG SB, et al. Fluorescence light-up AIE probe for monitoring cellular alkaline phosphatase activity and detecting osteogenic differentiation. *J Mater Chem B.* 2016;4(26):4534-4541.
- [32] VIMALRAJ S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855.
- [33] SILLER AF, WHYTE MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res.* 2018;33(2):362-364.
- [34] KOMORI T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells.* 2020;43(2):168-175.
- [35] INADA M, YASUI T, NOMURA S, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn.* 1999;214(4):279-290.
- [36] KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997;89(5):755-764.
- [37] KOMORI T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1694.
- [38] MALKOV MI, LEE CT, TAYLOR CT. Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines. *Cells.* 2021;10(9):2340.
- [39] LOPEZ-CASTEJON G, BROUGH D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-195.
- [40] ZHANG H, LIU L, JIANG C, et al. MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts. *Innate Immun.* 2020;26(4):259-269.
- [41] ZHOU M, GUO M, SHI X, et al. Synergistically Promoting Bone Regeneration by Icarin-Incorporated Porous Microcarriers and Decellularized Extracellular Matrix Derived From Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:824025.
- [42] CAO H, KE Y, ZHANG Y, et al. Icarin stimulates MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation through up-regulation of bone morphogenetic protein-2. *Int J Mol Med.* 2012;29(3):435-439.
- [43] XIAO Q, CHEN A, GUO F. Effects of Icarin on expression of OPN mRNA and type I collagen in rat osteoblasts in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005;25(6):690-692.
- [44] SHAUKAT A, SHAUKAT I, RAJPUT SA, et al. Icarin Alleviates Escherichia coli Lipopolysaccharide-Mediated Endometritis in Mice by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10219.
- [45] LI X, KHAN I, XIA W, et al. Icarin enhances youth-like features by attenuating the declined gut microbiota in the aged mice. *Pharmacol Res.* 2021;168:105587.
- [46] LIU J, LI D, SUN X, et al. Icarin Restores LPS-Induced Bone Loss by Downregulating miR-34c Level. *Inflammation.* 2016;39(5):1764-1770.
- [47] YU X, DONG M, WANG L, et al. Nanotherapy for bone repair: milk-derived small extracellular vesicles delivery of icariin. *Drug Deliv.* 2023;30(1):2169414.

(责任编辑: WL, MZH, ZN, LWJ)