

脂多糖作用下MLO-Y4骨细胞力学生物学响应

刘力铭, 黄诗兰, 于浩洋, 刘泽, 郭勇*

桂林医科大学, 广西桂林

摘要: 目的: 本研究旨在探讨脂多糖 (LPS) 作用下骨细胞的力学生物学响应及其机制。方法: 以小鼠骨细胞 MLO-Y4 为对象, 设置四组处理: 对照组、LPS 刺激组、力学刺激组 (2500 μ ε、0.5Hz、1h/d、持续3天) 及 LPS+力学刺激组。检测指标包括细胞增殖活性、功能相关分子 (NO、NOS、IGF-1、PGE2) 及氧化应激指标 (丙二醛和超氧化物含量)。结果: LPS 组细胞增殖活性显著低于对照组, 而力学刺激组显著升高; 联合处理组较 LPS 组显著上升。在功能指标方面, LPS 组各因子表达均低于对照组, 力学刺激组均上升, 联合组则显著高于 LPS 组。氧化应激水平方面, LPS 组超氧化物和丙二醛含量均高于对照组, 联合组则显著低于 LPS 组。结论: LPS 明显抑制骨细胞增殖与功能, 并增强氧化应激; 适宜的力学刺激不仅促进骨细胞增殖与功能, 还能有效拮抗 LPS 的抑制作用, 并在炎症条件下维持细胞功能。其机制与力学刺激增强骨细胞的抗氧化应激能力、减轻氧化损伤密切相关。本研究为理解力学刺激在炎症性骨病中的保护作用提供了细胞学依据。

关键词: 脂多糖; 骨细胞; 力学刺激

Mechanobiological Responses of MLO-Y4 Osteocytes under Lipopolysaccharide Stimulation

Liming Liu, Shilan Huang, Haoyang Yu, Ze Liu, Yong Guo*

Guilin Medical University, Guilin, Guangxi

Abstract: Objective: To observe the mechanobiological responses of osteocytes under lipopolysaccharide (LPS) stimulation and to preliminarily explore the underlying mechanisms. Methods: Mouse osteocyte-like MLO-Y4 cells were cultured in vitro and divided into four groups: (1) Control group (normal culture); (2) LPS group (stimulated with LPS); (3) Mechanical stimulation group (2500 μ ε, 0.5 Hz, 1 h/day for 3 consecutive days); (4) Combined LPS and mechanical stimulation group. The proliferation activity and functional indicators of osteocytes (NO, NOS, IGF-1, and PGE-2) as well as oxidative stress markers (malondialdehyde and superoxide content) were measured. NO (nitric oxide), NOS (nitric oxide synthase), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), and PGE-2 (prostaglandin E2) are key signaling molecules regulating bone metabolism. Results: Cell proliferation activity: The LPS group showed a significant decrease compared to the control group, while the mechanical stimulation group exhibited a significant increase compared to the control. The combined treatment group had significantly higher proliferation than the LPS group. Functional indicators of osteocytes: In the LPS group, the expression levels of NO, NOS, IGF-1, and PGE-2 were all lower than those in the control group. In contrast, the mechanical stimulation group showed higher levels

* 基金项目: 2023年国家大学生创新创业训练计划项目 (202310601049)。

第一作者简介: 刘力铭 (2000.12) 男, 汉族, 湖北荆州人, 生物医学工程硕士, 研究方向: 骨组织工程。

通讯作者简介: 郭勇 (1974.03-) 男, 汉族, 甘肃陇南人, 博士, 教授, 研究方向: 生物医学工程与力学生物学。

of these indicators compared to the control. The combined treatment group demonstrated significantly elevated expression of these functional factors compared to the LPS group. Oxidative stress levels: Superoxide content: LPS group>control group; combined treatment group<LPS group. Malondialdehyde changes followed the same trend as superoxide. Conclusion: LPS treatment significantly inhibited osteocyte proliferation, whereas appropriate mechanical stimulation effectively promoted osteocyte proliferation. More importantly, mechanical stimulation could markedly counteract the inhibitory effects of LPS, exerting a protective effect on cell proliferation even under inflammatory conditions. LPS treatment led to a comprehensive downregulation of key functional signaling molecules (NO, NOS, IGF-1, PGE2) in osteocytes, while mechanical stimulation significantly upregulated the expression of these functional factors and reversed the functional inhibition induced by LPS, thereby restoring and maintaining the normal physiological functions of osteocytes in an inflammatory environment. LPS treatment induced severe oxidative stress in osteocytes, as evidenced by significantly increased levels of malondialdehyde and superoxide. In contrast, mechanical stimulation exhibited certain anti-oxidative stress capabilities, effectively reducing the levels of these oxidative stress markers. In summary, mechanically stimulated osteocytes possess a certain antioxidant stress capacity, which alleviates LPS-induced oxidative damage. This mechanism is key to their ability to counteract the toxic effects of LPS, protect cell proliferation activity, and restore normal cellular function. This study provides direct cellular evidence for understanding the protective role of mechanical stimulation in inflammatory bone diseases.

Keywords: Lipopolysaccharide; Osteocytes; Mechanical stimulation

1 引言

骨细胞作为机械传感器和协调器，在骨重塑中发挥关键作用，其与其他器官间的复杂通讯对维持骨稳态至关重要[1]，而骨吸收与形成的失衡可导致骨质疏松等骨骼疾病[2,3]，骨骼通过感知和响应周围的力学环境并整合机械和化学信号来调节骨的形成和吸收[4]，骨细胞是骨骼中丰富的细胞，具有独特分子特征，是骨重塑与矿物质稳态的主要协调器。它们通过广泛的细胞间网络感知和响应环境机械刺激，能分泌多种分子调节骨形成、骨吸收及矿物稳态，其凋亡对骨吸收有调节作用[5]。随着年龄的逐渐增长，在运动过程中，一方面力学负荷有所减少，另一方面活性氧损伤在骨中不断积累，这两个因素共同导致骨细胞密度降低。而骨细胞密度的降低会致使骨细胞的力学信号转导随之减少，进而打破骨吸收和骨形成之间的平衡[6]。骨细胞作

为骨组织中数量最多的细胞类型，当骨细胞受到来自外界的机械应变等刺激时，其释放的NO、PGE2和ATP等信号分子会直接对成骨细胞的功能产生影响，进而调节成骨细胞的增殖与分化过程[7]，骨骼能适应新负荷和力，机械刺激是骨代谢重要驱动因素，其骨重塑过程受到力学环境的影响[8]，力学刺激对骨细胞的增殖、分化和代谢具有显著的促进作用[9]。

脂多糖（LPS）是革兰阴性菌的主要成分，具有双重作用：适量可增强免疫功能，高浓度则引起强烈炎症反应[10]。研究表明，脂多糖能抑制骨细胞的增殖和分化能力[11]，而积雪草苷可减轻LPS导致的细胞损伤，促进细胞增殖和分化[12]。此外，脂多糖还能通过诱导氧化应激反应和促炎因子的释放，加剧骨细胞的炎症损伤[13]，力学刺激对骨细胞炎症有着重要作用[14]，LPS抑制成骨细胞分化

并在骨髓炎发病机制中起到作用[15,16],在细菌感染等病理条件下,脂多糖引起的一系列反应会造成骨髓炎和骨关节炎等炎症骨性疾病的发生,最终造成骨生成减少和骨吸收增多和骨破坏现象[17]。具体来说,脂多糖(LPS)作为一种强效炎症因子,能够通过激活骨细胞的炎症信号通路(如TLR4/NF- κ B通路),诱导促炎因子(如IL-6、TNF- α)的分泌,导致骨细胞的炎症反应和氧化应激反应,从而引发骨组织的炎症性骨丢失[18-20]。这种骨细胞功能损伤不仅影响骨骼的稳定性和修复能力,也为细菌感染相关骨病(如骨髓炎或种植体周围炎)的发生和发展提供了相应病理基。

力学载荷能够调节骨细胞分泌信号分子以及蛋白因子,而骨细胞所分泌的这些因子会对成骨细胞的分化产生影响[21],因此研究力学载荷及脂多糖作用下对骨细胞的力学生物学响应具有十分重要的研究意义。本研究通过对体外培养的骨细胞进行力学刺激及脂多糖环境下培养,设置力学刺激组/对照组及脂多糖组/脂多糖+力学刺激组,通过检测骨细胞指标NO、NOS、IGF-1和PGE2的变化,分析骨细胞在脂多糖刺激下的力学生物学响应相关变化,检测氧化应激指标,探讨其与力学生物学响应的关系,可能是何原因造成的,这有助于深化对骨细胞如何在力学环境和脂多糖状态下生存和发挥功能的理解,也有望为相关骨病的防治提供新的理论依据和潜在靶点,具有显著的创新性和临床应用价值。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验细胞: 本实验所用的细胞为小鼠骨细胞MLO-Y4,购自于武汉尚恩生物技术有限公司,于桂林医科大学智能医学与生物技术学院生物医学工程实验室保存并用于实验。

实验试剂: 脂多糖(北京索莱宝科技有限公司);总一氧化氮(NO)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);总一氧化氮合成酶(NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);Mouse IGF-1 ELISA Kit(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);PGE2 ELISA Kit(武汉伊莱瑞特生物科技有限公

司);DMEM培养基(赛默飞世尔科技有限公司);MTT噻唑蓝细胞增殖检测试剂盒(上海蓝季科技发展有限公司);胎牛血清(美国Gibco公司);RIPA裂解液(碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白定量试剂盒(增强型)(碧云天生物技术有限公司);四点弯曲力学加载设备(军事医学科学院研制);倒置相差显微镜(德国莱卡公司);酶标仪(美国BIO-RAD公司);丙二醛(MDA)测定试剂盒;超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);CO₂细胞培养箱(广州沪瑞明仪器有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

实验器材: 四点弯曲的基底应变负载装置主要由动能加载单位、细胞培养单元和电路控制系统所组成。其中,动能加载单位主要是由发动机、中间固定的杠杆及两侧固定上下摆动频率的杠杆所组成。细胞培养单位由细胞培养板和聚苯乙烯膜制作而成。电路控制系统则由函数控制器、输出功率放大和电源制成。本仪器在制造时是已设计了2500 μ e、0.5Hz的周期性负载力,驱动电压24V,驱动电流2.4A,图1分别展示了四点弯曲力学加载装置与加载时简图。

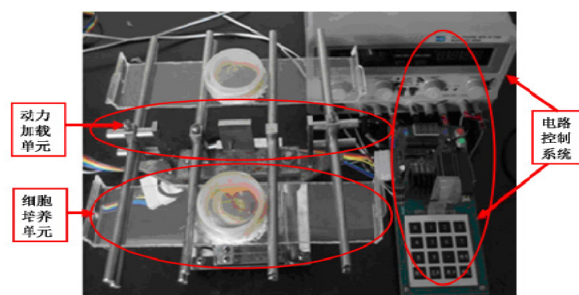


图1A. 四点弯曲力学加载装置实物图

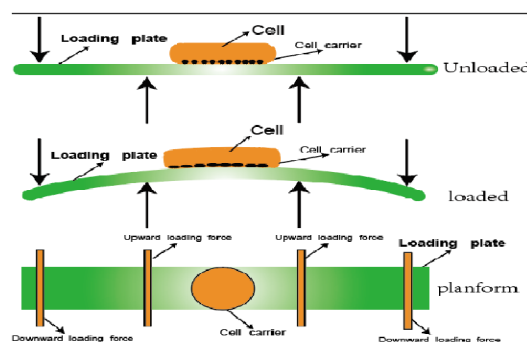


图1B. 装载示意图: 加载时, 细胞承受力学拉伸

2.2 细胞培养

复苏小鼠骨细胞MLO-Y4，加入含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基，置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中培养，每2天换液一次，显微镜下观察细胞的生长状况，选择生长状态良好的细胞，待细胞长满后进行实验。

2.3 细胞力学加载装置处理

四点弯曲的基底应变加载装置是本研究中用于施加周期性力学刺激的关键设备，主要由动能加载单元、细胞培养单元和电路控制系统组成。动能加载单元包括发动机、中间固定的杠杆和动态杠杆，能够施加均匀且精确的加载力。细胞培养单元由细胞培养板和聚苯乙烯膜构成，为细胞提供一个类似体内的生长环境。电路控制系统则由函数控制器、输出功率放大器和电源组成，确保整个装置的稳定运行。在实验中，MLO-Y4骨细胞被接种于四点弯曲加载装置的培养小室中，使用含10%胎牛血清的DMEM完全培养基进行培养，待细胞达到融合状态后开始实验。通过施加周期性张应变（ $\epsilon=2.5\%$ ， $f=0.5\text{Hz}$ ），持续8小时，使细胞受到机械刺激。

2.4 实验分组

取出培养的MLO-Y4细胞，将其分成4组处理：对照组（CO组）加入含体积分数10%胎牛血清、10mmol/L β -甘油磷酸钠的DMEM培养液；力学刺激组（MS组）加入含体积分数10%胎牛血清、10mmol/L β -甘油磷酸钠的DMEM培养液，施加力学载荷（2500 $\mu\epsilon$ 、0.5Hz、1h/d，持续3天）；脂多糖组（LP组）加入含10 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖、体积分数10%胎牛血清、10mmol/L β -甘油磷酸钠的DMEM培养液；脂多糖加力学刺激组（LS组）加入含10 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖、体积分数10%胎牛血清、10mmol/L β -甘油磷酸钠的DMEM培养液，并施加力学载荷（2500 $\mu\epsilon$ 、0.5Hz、1h/d，持续3天）。

2.5 MTT法检测细胞活性

每孔加入20 μL MTT溶液（配置方法为称取

50mg MTT粉末至15mL离心管中，避光处理，加入10mL PBS缓冲液，充分混匀后得到5mg/mL的MTT溶液），将处于生长期的MLO-Y4骨细胞用胰酶消化，离心后重悬，以每孔 5×10^3 细胞的密度接种于96孔板，每孔加入100 μL 培养基，置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中培养24h，孵育结束后吸去上清液，每组加入150 μL DMSO，采取低速振荡10分钟后，每组5个重复孔分别取200 μL 加入新的96孔板中，使用酶标仪在570nm处测量吸光度值，记录实验数据。

2.6 骨细胞培养上清和细胞内NO检测

收集第三天骨细胞上清液，4℃ 1000 $\times g$ ，离心15min，取上清置于冰上待测，使用PBS溶液将贴壁细胞清洗两次，加入1mL裂解液，冰上静置30min，收集得到的裂解液，4℃，1000 $\times g$ ，离心20min，用于NO的检测。按照说明书方法，空白对照组加入60 μL 样品稀释液，标准品组加入60 μL 标准品液，样品组加入10 μL 样品液；随后每组加入5 μL NADPH（2mM）、10 μL FAD、5 μL Nitrate Reductase，充分混匀后，置于37℃避光孵育30min；之后每组加入10 μL LDH Buffer、10 μL LDH，充分混匀后，置于37℃避光孵育30min；最后加入50 μL Griess Reagent I、50 μL Griess Reagent II，混匀后，在室温20-30℃孵育10min后测定A540。

2.7 骨细胞培养上清和细胞内NOS检测

收集第三天的细胞培养基，用PBS清洗贴壁细胞两次，加入500 μL 裂解液，作用30min后，收集裂解液，4℃，1000 $\times g$ ，离心20min，取30 μL 上清液进行蛋白定量，用于NOS的检测。按照说明书方法，每组上清液空白管加入100 μL 双蒸水、总NOS测定管中加入100 μL 样本；之后每组都加入试剂盒中的底物缓冲液200 μL 、促进剂10 μL 、显色剂100 μL 、将其放入摇床混匀后37℃，水浴15min后，继续加入透明剂100 μL 、终止液2000 μL ，摇床混匀后每组7个重复孔各200 μL 加入96孔板中，使用酶标仪在530nm，1cm光径处测量各管的吸光度。

2.8 骨细胞培养上清IGF-1和PGE2表达量检测

按照试剂说明书，配置成200 μ L的标准品溶液，取出培养三天后的骨细胞上清液，1000 \times g，离心15min，取上清液用作备用，分别将样本溶液分成两份，用于检测骨细胞中的IGF-1和PGE2表达量。

IGF-1测定：在96孔酶标板的标准孔中加入标准液100 μ L，样品孔中加入待测样本液100 μ L，空白孔中加入100 μ L标准品和样本稀释液，然后将酶标板放入37 $^{\circ}$ C温箱中孵育1.5h，甩尽孔内液体，不用洗涤，使IGF-1和抗体充分结合，加入生物素化抗体工作液100 μ L/孔，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C温育1h后，甩尽孔内液体，在洁净的吸水纸上拍干，再加入350 μ L/孔的洗涤液浸泡1min，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板步骤3次，加入100 μ L酶结合物工作液，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C温育30min后，甩尽孔内液体，洗板5次，加入底物溶液（TMB）50 μ L/孔，立即摇匀，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C避光孵育25min，最后加入50 μ L终止液，立即置于酶标仪中，设置波长450nm，测量各孔的吸光度（OD值）。

PEG2检测：在96孔酶标板的标准孔中加入标准液50 μ L，样品孔中加入待测样本液50 μ L，空白孔中加入50 μ L标准品和样本稀释液，然后将酶标板放入37 $^{\circ}$ C温箱中孵育45min，甩尽孔内液体，不用洗涤，使IGF-1和抗体充分结合，加入350 μ L/孔的洗涤液浸泡1min，吸去或甩掉酶标板内的液体，拍干。重复此洗板步骤3次，加入100 μ L酶结合物工作液，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C温育30min后，甩尽孔内液体，洗板5次，加入底物溶液TMB 50 μ L/孔，立即摇匀，酶标板加上覆膜，37 $^{\circ}$ C避光孵育25min，最后加入50 μ L终止液，立即置于酶标仪中，设置波长450nm，测量各孔的吸光度（OD值）。

2.9 骨细胞超氧化物含量检测

按试剂盒说明配制检测工作液，包括10mL缓冲液、500 μ L WST-1溶液、还原剂Catalase溶液100 μ L，配置成超氧化物检测工作液，将MLO-Y4

细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于96孔板，在96孔酶标板中加入待检测样本，将酶标板置于37 $^{\circ}$ C温箱中孵育3分钟，使SOD与底物充分反应，使用酶标仪，在指示波长为450nm处测量各孔的吸光度（OD）值。

2.10 骨细胞丙二醛含量检测

将细胞培养加载板内的培养液吸去，用PBS清洗贴壁细胞两次，加入裂解液，在冰上静置30分钟，收集裂解液并以14500rpm离心5分钟。取30 μ L上清液，通过BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度，用于后续的丙二醛（MDA）检测。随后，将剩余试剂盒与上清液中的提取液混合，置于100 $^{\circ}$ C水浴40分钟，冷却后以4000rpm离心10分钟，取样于96孔板，使用酶标仪在530nm处测量吸光度值，计算丙二醛含量。

2.11 统计学分析

采用GraphPad Prism 10软件对数据进行处理与绘图分析。数据以均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$, $n=X$ ）表示（如脂多糖组：5.32 \pm 0.12, $n=8$ ）。通过Shapiro-Wilk检验评估正态性，方差齐性采用Levene检验。若数据满足正态分布且方差齐性，组间差异比较采用单因素方差分析，两两比较使用Tukey检验（样本量均衡）或Games-Howell检验（方差不齐）；非正态分布数据采用Kruskal-Wallis检验及Dunn事后检验。显著性阈值设为 $P < 0.05$ （双尾）。

3 结果

3.1 骨细胞增殖活性

如图2所示，MTT实验的吸光度值反映细胞增殖活性水平的高低，活性越高表明吸光度值越大，将实验分成四组，分别为对照组（CO）、脂多糖组（LP）、力学刺激组（MS）、脂多糖加力学刺激组（LS）。培养3d后，在不同处理条件下，对照组与脂多糖组相比，脂多糖组中骨细胞增殖活性降低，这说明骨细胞在脂多糖环境下，骨细胞的增殖活性受到抑制；对照组与力学刺激组相比，力学刺激组中骨细胞增殖活性升高，这说明力学刺激对骨细胞增殖活性有促进的作用；脂多糖组与脂多糖加

力学刺激组相比，脂多糖加力学刺激组使骨细胞增殖活性升高，由此说明脂多糖环境会抑制骨细胞的增殖活性，而力学刺激则减弱了脂多糖环境对骨细胞造成的影响 ($P < 0.05$)。

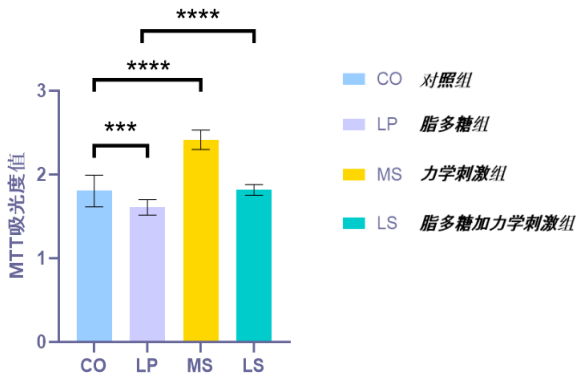


图2. MTT法测骨细胞增殖活性

3.2 骨细胞力学生物学响应

如图3所示，培养3d后，在上清液中和骨细胞内，脂多糖组与对照组相比，脂多糖组的NO表达量低于对照组，说明骨细胞在脂多糖环境下抑制了NO的生成；力学刺激组与对照组相比，力学刺激组的NO表达量高于对照组，说明力学刺激促进NO的生成；脂多糖组与脂多糖加力学刺激组相比，脂多糖加力学刺激组NO表达量升高，说明力学刺激可以减弱脂多糖对骨细胞NO生成的抑制作用；如图4所示，脂多糖组与对照组相比，脂多糖组的NOS表达量低于对照组，这说明脂多糖环境抑制了骨细胞一氧化氮合酶的生成；力学刺激组与对照组相比，力学刺激组的NOS表达量高于对照组，说明力学刺激促进NOS的生成；脂多糖组与脂多糖加力学刺激组相比，脂多糖加力学刺激组NOS表达量升高，说明力学刺激可以减弱脂多糖对骨细胞生成NOS的抑制作用。

如图5-6所示，脂多糖组上清液中IGF-1和PGE-2的表达量显著低于对照组，这表明脂多糖组的力学生物学响应减弱。回顾之前的研究结果，脂多糖组中NO和NOS的含量也明显比对照组降低，因此推测可能是脂多糖 (LPS) 引发了氧化

应激反应，进而导致骨细胞的力学生物学响应减弱。另一方面，力学刺激组与对照组相比，上清液中的IGF-1和PGE2表达量升高，这说明在力学载荷刺激下可以促进成骨细胞分化。此外，当脂多糖组与脂多糖加力学刺激组相比较时，发现后者骨细胞内IGF-1和PGE2的表达量有所增加，这进一步证实了力学刺激能够减轻脂多糖对骨细胞造成的氧化应激反应，并在一定程度上改善了骨细胞的力学生物学性能。

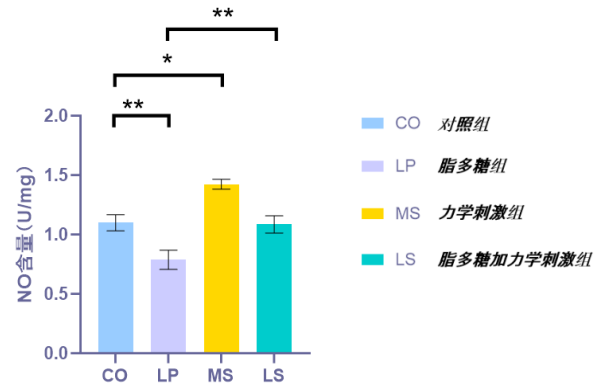


图3. 骨细胞一氧化氮含量

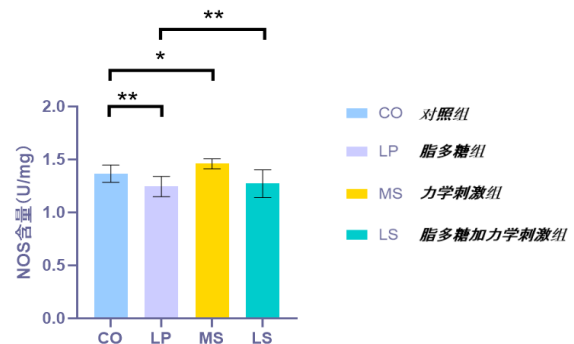


图4. 培养3d后，骨细胞一氧化氮合酶含量

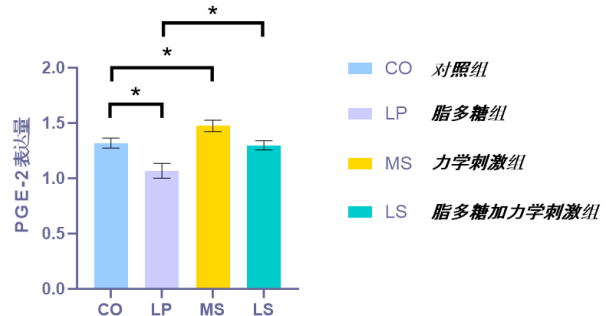


图5. IGF-1表达量

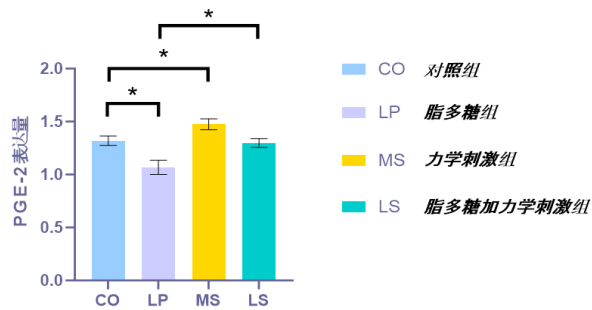


图6. PGE2表达量

3.3 骨细胞超氧化物含量

如图7所示，超氧化物含量越高意味着骨细胞的氧化应激水平越高。在培养3d后，对比脂多糖组和对照组，发现脂多糖组的超氧化物含量升高，这表明脂多糖环境引发了骨细胞的氧化应激反应；而将脂多糖组与脂多糖加力学刺激组进行比较时，脂多糖加力学刺激组的超氧化物含量低于脂多糖组，这说明力学刺激能够减弱由脂多糖环境引起的氧化应激反应。

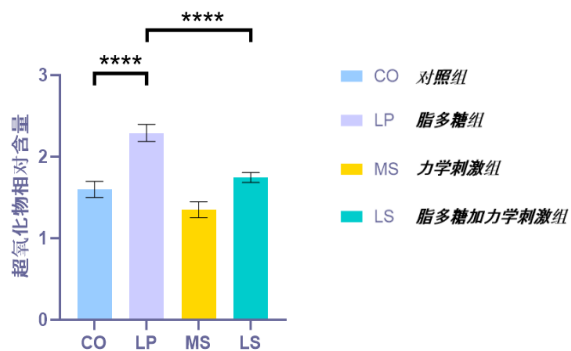


图7. 检测骨细胞超氧化物含量

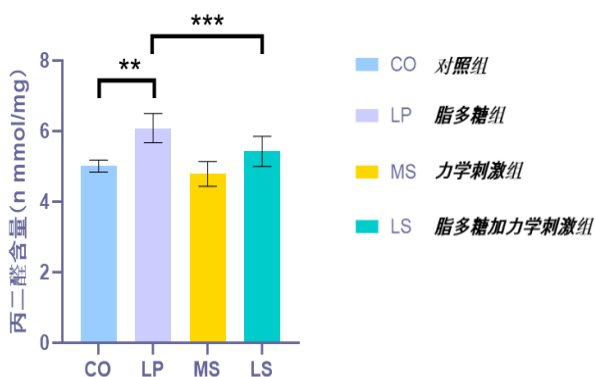


图8. 检测骨细胞丙二醛浓度

3.4 骨细胞丙二醛含量

如图8所示，就骨细胞而言，丙二醛能够反映其氧化应激水平的大小。具体来说，丙二醛含量越多，意味着细胞的氧化应激反应损伤越大，氧化应激水平也就越强。在培养3d后，将脂多糖组与对照组进行比较，发现脂多糖组骨细胞的丙二醛含量升高，这表明在脂多糖环境下，骨细胞的氧化应激损伤更大，氧化应激反应也更为强烈。而当对脂多糖加力学刺激组和脂多糖组进行对比时，脂多糖加力学刺激组骨细胞的丙二醛含量降低，这说明力学刺激对脂多糖环境下骨细胞的氧化应激损伤具有缓解作用，也就证明了力学刺激能够有效减轻脂多糖环境对骨细胞的氧化应激反应 ($P < 0.05$)。

4 讨论

研究发现，适度的力学刺激可以调控骨细胞功能，有效减轻脂多糖 (LPS) 引发的炎症损害。然而，LPS影响下骨细胞力学生物学特性的改变及其分子机理仍需更深入探索。本研究系统考察了LPS和力学刺激对骨细胞力学生物学行为的调控机制。实验证实，LPS能够上调炎症因子 (如IL-6、RANKL) 和骨吸收相关因子的表达，其中PI3K/AKT信号通路在骨代谢调控中扮演重要角色[22]。芒果苷可通过抑制LPS诱导的TNF- α 生成，显著降低小鼠成骨细胞凋亡率，这为炎症性骨损伤治疗提供了新思路[23]。值得注意的是，骨细胞不仅参与骨稳态维持，还与肌肉、肾脏和心脏等器官功能密切相关[24]。研究还发现，力学刺激能通过调控细胞因子分泌和信号通路激活，减轻炎症介质对骨细胞的损害[25]。LPS通过促进促炎因子释放抑制成骨细胞分化，而MMP9在LPS诱导的炎症中具有保护作用，这一发现为根尖周炎治疗提供了新靶点[26]。

现有研究表明，IGF-1、NOS等因子在成骨分化和骨代谢中起关键作用。基因敲除实验证实，一氧化氮 (NO) 参与调控骨形成过程，诱导型NOS缺失小鼠表现出骨形成异常和愈合障碍[27]。在力学刺激方面，高强度机械力可促进骨细胞NO

生成, 导致细胞皱缩, 持续负荷会诱导骨细胞凋亡并促进骨吸收, 其中NO发挥重要促凋亡作用[28]。流体剪切力作用下, 骨细胞骨架(特别是肌动蛋白丝)会沿受力方向排列, 这一过程与NO和PGE2分泌密切相关[29]。骨细胞对机械负荷的响应主要依赖于膜通道激活, 进而调控前列腺素、NO和钙离子水平, 最终影响骨组织重塑[30]。间歇性周期压力不仅能提升骨细胞NO和PGE2分泌水平, 还能增强其机械敏感性, 这与细胞骨架的有序排列有关[31]。此外, 缺氧反应可能参与调控骨细胞对不同类型机械力的差异性响应[32]。

在联合刺激研究中, LPS和压缩力共同作用可通过激活ephrinA2信号通路促进破骨细胞生成, 但持续暴露会部分抵消这种溶骨效应, 提示Eph-ephrin通路在牙周膜细胞响应炎症和力学刺激中起关键作用[33, 34]。唑来膦酸与LPS协同可抑制MC3T3-E1细胞分化, 其机制涉及Smad1/5/8磷酸化下调和BMP2-Smad通路干扰, 这可能是双膦酸盐相关颌骨坏死的致病机制之一[35]。氧化应激指标检测显示, 丙二醛水平与骨细胞氧化损伤程度呈正相关。糖皮质激素可通过加剧氧化应激诱导成骨细胞铁死亡, 进而抑制成骨功能, 这可能促进激素性股骨头坏死的发展[36]。超氧化物作为强氧化剂, 其含量可通过比色法测定, 吸光度值与氧化应激程度成正比。

5 结论

本研究深入探讨了LPS对骨细胞力学生物学特性的影响及其作用机制。实验结果显示, LPS处理显著抑制了骨细胞的增殖活性, 并导致NO、NOS、IGF-1和PGE2等关键功能信号分子表达全面下调, 削弱了骨细胞的正常生理功能。值得关注的是, 适宜的力学刺激不仅能有效促进骨细胞增殖与功能因子的表达, 还能显著逆转LPS所引发的功能抑制, 在炎症环境下恢复并维持细胞的正常力学响应能力。进一步的机制研究表明, LPS通过诱发氧化应激反应, 导致超氧化物和丙二醛等氧化标志物显著升高, 从而加剧细胞损伤; 而力学刺激则表现出明确的抗氧化应激作用, 可有效减轻上述氧

化损伤指标, 这很可能是其拮抗LPS毒性、维护细胞功能的关键机制。本研究不仅从分子层面揭示了LPS损害骨细胞功能的氧化应激机制, 也明确了力学刺激在炎症条件下维持骨细胞稳态的保护效应, 为炎症相关骨疾病的力学干预策略提供了重要的实验依据和理论支撑。该研究结果对炎症相关骨疾病的临床治疗具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 祝英文, 李亚楠, 曹振, 等. 力学刺激下骨细胞分泌含有miR-3110-5p和miR-3058-3p的外泌体促进成骨分化[J]. 医用生物力学, 2024, 39(S1): 23.
- [2] 景达. 正常和特殊力学环境下骨信号转导[J]. 医用生物力学, 2024, 39(S1): 10-11.
- [3] Rinaldo F, Silva DRGS, Estela S, et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.[J]. BioMed research international, 2015, 2015421746.
- [4] 杨全增, 张成俊, 姜金, 等. 骨细胞力学信号转导功能研究被引最高50篇相关文献分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(09): 1174-1179+1186.
- [5] Huayue C, Takao S, Kin-ya K. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis[J]. Medical molecular morphology, 2015, 48(2): 61-8.
- [6] 杜静珂, 于志锋. 机体衰老对骨细胞力学响应的影响[J]. 医用生物力学, 2019, 34(03): 333-338.
- [7] 高瑞, 辜洁, 康迪斯, 等. 高糖对成骨细胞MC3T3-E1凋亡和氧化应激的影响[J]. 局解手术学杂志, 2019, 28(05): 348-352.
- [8] Wenqing L, Xudong W, Yongqiang D, et al. Mechanical stimuli-mediated modulation of bone cell function-implications for bone remodeling and angiogenesis [J]. Cell and tissue research, 2021, 386(3): 445-454.
- [9] 徐又佳, 林华, 夏维波. 重视机械负荷对骨细胞功能的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2023, 16(02): 93-101.
- [10] 张晓音, 吴旻, 李雨萌, 等. 脂多糖的效应及其机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2015, 36(12): 133-136.
- [11] 秦伟雄, 袁子健, 谢山周, 等. 茶多酚对脂多糖刺激下成骨细胞增殖分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(35): 5665-5669.
- [12] 赵强, 肖波, 陈天逸, 等. 积雪草苷对脂多糖诱导的成骨细胞

- 增殖和分化的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2024,32(07):24-28+33.
- [13]杨焕.骨细胞力学响应RNA的筛选及成骨分化相关的生物信息学分析[D].桂林医学院,2022.
- [14]唐占英,褚立希,胡志俊.力学刺激对膝关节炎软骨细胞作用的分子生物学机制进展[J].河北医学,2019,25(02):332-335.
- [15]Jun M, Zhu W, Jianquan Z, et al. Resveratrol Attenuates Lipopolysaccharides (LPS)-Induced Inhibition of Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells[J]. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 2018, 24: 2045-2052.
- [16]张倩璐,江婷,赵国军.脂多糖抑制成骨细胞分化作用研究[J].中国临床药理学杂志,2019,35(21):2743-2746.
- [17]Ke Y, Yuanyuan M, Xianxian L, 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[J]. Cell biology international, 2017, 41(1): 84-92.
- [18]Chun G, Sheng-Li W, Song-Tao X, et al. SP600125 reduces lipopolysaccharide-induced apoptosis and restores the early-stage differentiation of osteoblasts inhibited by LPS through the MAPK pathway in MC3T3-E1 cells[J]. International journal of molecular medicine, 2015, 35(5): 1427-34.
- [19]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,2016,32(03):220-223.
- [20]Sharma Kriti, Kumar Shiv, Prakash Ravi, Khanka Sonu,Mishra Tripti,Rathur Rajat... & Singh Divya. (2022). Chebulinic acid alleviates LPS-induced inflammatory bone loss by targeting the crosstalk between reactive oxygen species/NF κ B signaling in osteoblast cells. Free radical biology & medicine, 194(2023):99-113.doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.026.
- [21]李青,朱亦堃,焦玉睿.应激时多种调节因子对骨代谢及糖代谢的影响[J].新医学,2020,51(02):103-107.
- [22]刘奇奇,刘敏,杨健,等.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.
- [23]陈则强,李昊.芒果苷对脂多糖诱导小鼠成骨细胞凋亡的影响及机制研究[J].当代医学,2021,27(04):87-89.
- [24]XiangTao Z, Min S, Li Z, et al. The potential function of miR-135b-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway during osteoblast differentiation[J]. The Kaohsiung journal of medical sciences, 2020, 36(9): 673-681.
- [25]Yongyong Y, Liping W, Linhu G, et al. Osteocyte-Mediated Translation of Mechanical Stimuli to Cellular Signaling and Its Role in Bone and Non-bone-Related Clinical Complications[J]. Current osteoporosis reports, 2020, 18(1): 67-80.
- [26]Zhang H, Liu L, Jiang C, et al. MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts[J]. Innate Immunity, 2020, 26(4): 259-269.
- [27]Saura M, Tarin C, Zaragoza C. Recent Insights into the Implication of Nitric Oxide in Osteoblast Differentiation and Proliferation during Bone Development[J]. The Scientific World Journal, 2010, 10: 624-632.
- [28]Nakao Nobuhiko, Mori Izumi, Sunaga Junko, et al. Large magnitude of force leads to NO-mediated cell shrinkage in single osteocytes implying an initial apoptotic response[J]. Journal of Biomechanics, 2021, 117: 110245-110245.
- [29]McGarry JG, Klein-Nulend J, Prendergast PJ.The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts[J]. Biochemical and biophysical research communications,2005,330(1):341-348.
- [30]Park J, Fertala A, Tomlinson ER. Naproxen impairs load-induced bone formation, reduces bone toughness, and diminishes woven bone formation following stress fracture in mice[J]. Bone, 2019, 124: 22-32.
- [31]阴健,浩志超,廖爽,等.间歇性加载周期性压力增加骨细胞分泌一氧化氮和前列腺素E2[J].生物医学工程学杂志,2014,31(03):619-624.
- [32]Ziyi W, Yoshihito I, Takanori I, et al. Screening of key candidate genes and pathways for osteocytes involved in the differential response to different types of mechanical stimulation using a bioinformatics analysis[J]. Journal of bone and mineral metabolism, 2019, 37(4): 614-626.
- [33]Minjie L, Zhongyuan T, Chengfei Z, et al. Lipopolysaccharides Affect Compressed Periodontal Ligament Cells via Eph-ephrin Signaling[J]. Oral diseases, 2021, 28(6): 1662-1673.
- [34]Alaa A, Rhodanne L, Fahd A. High-Glucose Media Reduced the Viability and Induced Differential Pro-Inflammatory Cytokines in

- Human Periodontal Ligament Fibroblasts[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(4): 690.
- [35] Shinsuke A, Daigo Y, Shirou T, et al. Zoledronate and lipopolysaccharide suppress osteoblast differentiation through downregulating phosphorylation of Smad in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 2022, 34(4): 472-479.
- [36] 章家皓, 刘予豪, 周驰, 等. 氧化应激促进成骨细胞铁死亡介导激素性股骨头坏死的病理过程[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(20): 3202-3208.

