

香芹酚通过磷脂酰肌醇3-激酶途径诱导牙周炎 牙槽骨修复的机制研究

滕念 李兆勋 高甜甜 项艳蕊 周露露 高翔
东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030

[摘要] **目的** 本研究旨在探究香芹酚 (CV) 在调节牙周炎中牙槽骨修复作用的机制。**方法** 通过结扎第一磨牙并注射脂多糖 (LPS) 建立大鼠牙周炎模型 (P组), 并设立对照组 (C组)。治疗模型分别接受低剂量 (L组)、中剂量 (M组) 和高剂量 (H组) 的 CV 水凝胶。采用苏木精-伊红染色观察牙周组织的病理变化。采用免疫组织化学染色分析 I 型胶原 (COL1) 和 runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的表达。在体外实验中, 将大鼠成骨细胞分为 C、P、L、M、H、CV 和 CV+LY294002 (CV+LY) 组。通过 Western blot 分析检测牙龈组织及体外成骨细胞磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT)/糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 通路相关蛋白和成骨蛋白。采用定量逆转录聚合酶链反应测定炎症因子和成骨蛋白基因的表达。使用碱性磷酸酶 (ALP) 显色试剂盒和茜素红 S 染色试剂盒评估成骨能力。通过免疫荧光 (IF) 检测成骨细胞中 COL1 的表达情况。透射电子显微镜检测细胞凋亡情况。**结果** CV 水凝胶可缓解牙周症状, 上调 PI3K/AKT/GSK-3 β 通路相关蛋白和成骨蛋白的表达, 增加 ALP 表达和钙化结节数量。同时它降低了细胞凋亡和炎症因子的水平。LY294002 抑制 PI3K/AKT 通路, 并降低成骨蛋白表达、ALP 染色和钙化结节数量。**结论** CV 水凝胶通过激活 PI3K 通路并抑制炎症诱导的骨吸收, 促进牙槽骨成骨细胞的增殖和分化。本研究强调了 CV 在治疗牙周炎方面的潜力。

[关键词] 香芹酚; 牙周炎; 成骨细胞; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 脂多糖

[中图分类号] R781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2025.2025050



本文链接 开放科学标识码

Mechanism underlying carvacrol-induced alveolar bone repair via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in periodontal disease

Teng Nian, Li Zhaoxun, Gao Tiantian, Xiang Yanrui, Zhou Lulu, Gao Xiang

College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Supported by: "Excellent Youth" Project in Heilongjiang Province in 2023 (YQ2023C016)

Correspondence: Gao Xiang, E-mail: gam2006gx@neau.edu.com

[Abstract] **Objective** This study aims to explore the mechanism of carvacrol (CV) in regulating alveolar bone repair in periodontal disease. **Methods** A rat model of periodontal disease (P group) was created by ligating the first molar and injecting lipopolysaccharide (LPS). A control model (C group) was also created. The treatment models received low (L group), medium (M group), and high (H group) doses of CV hydrogel. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in periodontal tissues. Immunohistochemical staining was employed to analyze the expression of collagen type I (COL1) and Runt-related transcription factor 2 (Runx2). *In vitro*, the rat osteoblast cells were divided into C, P, L, M, H, CV and CV+LY294002 (CV+LY) groups. Western blot analysis detected the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) pathway-related and osteoblastic proteins. Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction was used to measure the expression of inflammatory factors and osteoblastic proteins.

[收稿日期] 2025-02-12

[基金项目] 2023年黑龙江省“优秀青年”项目 (YQ2023C016)

[第一作者] 滕念, 硕士, E-mail: 1557956913@qq.com

[通信作者] 高翔, 副教授, 博士, E-mail: gam2006gx@neau.edu.com

com

synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) pathway-related and osteoblastic proteins. Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction was used to measure the expression of inflammatory factors and osteoblastic proteins.

The alkaline phosphatase (ALP) colorimetric kit and alizarin red S staining kit were utilized to assess osteogenic ability. Immunofluorescence (IF) was used to detect COL1 expression in osteoblasts. Transmission electron microscopy was applied to detect cell apoptosis. **Results** CV hydrogel alleviated periodontal symptoms, upregulated PI3K/AKT/GSK-3 β pathway-related and osteoblastic proteins, and increased the expression of ALP and the number of calcified nodules. However, it decreased cell apoptosis and inflammatory factors. LY294002 inhibited the PI3K/AKT pathway and decreased osteoblastic protein expression, ALP coloration, and calcified nodule quantity. **Conclusion** CV hydrogel promotes the proliferation and differentiation of alveolar bone osteoblasts by activating the PI3K pathway and inhibiting inflammation-induced bone resorption. This study emphasizes the potential of CV for the treatment of periodontal diseases.

[Key words] carvacrol; periodontal disease; osteoblasts; phosphatidylinositol 3-kinase; lipopolysaccharide

牙周炎是一种常见的慢性炎症性疾病, 对人类的健康和和生活质量造成显著影响^[1]。其病理特征表现为牙齿支持组织的进行性破坏, 包括牙槽骨吸收、牙齿松动甚至脱落, 并可能引发全身性不良反应^[2-3]。香芹酚 (carvacrol, CV) 是一种从百里香和牛至中提取的单萜类化合物, 因其来源广泛、成本低廉且安全性较高而备受关注^[4]。研究^[5]表明, CV具有多种生物学特性, 如抗炎、抗菌、抗氧化及骨保护作用。前期研究^[6]发现, CV对牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 和具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 等牙周炎关键病原体表现出显著抑制作用, 并能有效减少牙槽骨吸收。这些特性使其成为治疗牙周炎的潜在候选药物。

尽管CV在牙周炎治疗中的潜力已被初步证实, 但其促进牙周组织修复的具体机制尚未完全阐明。特别是CV在调控成骨过程 (如成骨细胞增殖与分化) 中的作用仍需进一步研究。磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 信号通路在细胞生长、增殖、迁移、代谢及存活等方面发挥重要作用^[7], 其激活可促进成骨细胞增殖与分化^[8]。此外, 糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β) 作为该通路下游的关键靶点, 在成骨过程中亦起重要调节作用。

本研究旨在探讨CV通过抑制破骨细胞活性及增强成骨细胞功能促进牙槽骨修复的作用机制。为此, 本研究构建了大鼠牙周炎模型, 评估CV对牙周组织修复的影响及其潜在分子机制。旨在为牙周炎的临床治疗提供更为有效的策略。

1 材料和方法

1.1 主要药物和试剂

CV (99%纯度) (南京百慕达生物技术有限公

司); 泊洛沙姆407 (F127)、泊洛沙姆188 (F68)、羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC) (Sigma-Aldrich公司, 美国); 大鼠成骨细胞ROS17/2.8 (北京北纳生物公司); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (北京索莱宝科技有限公司); 佛罗里达压力敏感电子牙周探针 (佛罗里达探针公司, 美国); CCK-8试剂 (MCE公司, 美国); 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色试剂盒、成骨细胞矿化结节染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); LY294002 (Ab-Mole公司, 美国); 高糖DMEM培养基 (大连美仑生物技术有限公司); 胰蛋白酶、青霉素-链霉素 (Gibco公司, 美国); 一抗 (沈阳万类生物技术有限公司); 二抗 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 定量聚合酶链反应引物 (上海生工生物工程有限公司)。

1.2 动物获取及牙周炎模型建立

本研究的方案已获得东北农业大学兽医审查委员会的批准。

使用4周龄、体重在180~200 g的雄性SD大鼠。除对照组 (C组) 外, 所有大鼠均在麻醉状态下禁食并称重。将它们仰卧固定在实验台上。使用牙周探针在双侧上颌第一磨牙周围创建人工牙周袋。随后, 用直径0.2 mm的正畸丝结扎双侧上颌第一磨牙的颈部, 确保正畸丝完全埋入牙龈中。然后向牙周袋内注射20 μ L LPS, 通过结扎法诱导牙周炎^[9]。结扎持续4周。牙龈红肿、探诊出血和牙周袋的出现表明模型建立成功^[10]。最后一次药物干预后, 检测大鼠的牙周指标, 包括牙龈出血指数 (sulcus bleeding index, SBI) 和探诊深度 (pocket depth, PD), 并邀请东北农业大学动物医学院外科实验室和教学动物医院的5位有经验的临床教师检测指标和评估。

1.3 体内试验分组和药物治疗

将32只成功诱导牙周炎的大鼠模型随机分为

4组(每组8只),具体如下。1)牙周炎组(P组):无额外治疗;2)低剂量CV水凝胶组(L组):注射2.5 μL/mL CV水凝胶;3)中剂量CV水凝胶组(M组):注射5 μL/mL CV水凝胶;4)高剂量CV水凝胶组(H组):注射10 μL/mL CV水凝胶。另设对照组(C组),不做任何处理,饲养条件与其他组一致。

将F127、F68和HPMC分别溶解在去离子水中,制备浓度为30%、10%和2.5%的溶液。按F127:F68:HPMC=7:1:1.5的体积比将3种试剂充分混合,获得空白水凝胶^[11]。随后,向空白水凝胶中加入不同体积的CV,制备3种剂量的CV水凝胶。本研究组前期研究^[6]已证实水凝胶的给药方法和性能是有效的药物递送方式,且注射方法对骨骼无显著损伤。考虑到动物福利,选择去掉牙周炎注射空白水凝胶组,以减少实验鼠的数量。

结扎4周后,去除正畸丝。对于除C组外的所有组,每周2次向牙周袋内注射50 μL相应药物,持续4周。每周2次测量SBI和PD。SBI评分标准^[12]为4级,具体如下。1)0分:无出血;2)1分:探诊后出现点状出血;3)2分:探诊后出现线性出血;4)3分:探诊后出现血溢出龈沟或自发性出血。使用佛罗里达压力敏感电子牙周探针进行牙周探诊,记录牙齿颊侧和腭侧的近中、中央、远中6个位点的PD值^[13]。

1.4 微计算机断层扫描(Micro-CT)扫描

从每组中随机选择4只大鼠,取其上颌牙槽骨样本在4%多聚甲醛固定液中固定,然后进行Micro-CT扫描。扫描参数设置为:管电流200 μA,电压85 kV,全物体扫描,扫描分辨率10.153 741 μm,曝光时间384 ms,扫描角度180°。本实验的样本提交给上海交通大学的权威检测机构进行分析。

1.5 组织学检查

分离上颌组织,固定、脱钙和包埋,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色检测I型胶原(collagen type I, COL1)与runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)。在显微镜下观察组织,并收集和分析图像^[14]。

1.6 Western blot分析

牙龈组织被研磨并用放射免疫沉淀分析缓冲液(含1%苯甲基磺酰氟和1%磷酸酶抑制剂)处理。在4℃条件下以12 000 r/min离心10 min。收集上清液,使用二喹啉甲酸法测定蛋白质浓度。

蛋白质与上样缓冲液和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)混合后变性,在100℃加热10 min,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)分离,并转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。用5%脱脂牛奶封闭2 h后,将膜在4℃条件下与一抗孵育过夜,然后在室温(25℃)下与二抗孵育2 h。电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)试剂使蛋白条带可视化,并使用化学发光成像系统成像。Western blot检测指标:p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-GSK-3β、GSK-3β、β-catenin和成骨相关蛋白,后者包括骨桥蛋白(osteonectin, OPN)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、COL1和Runx2。结果以β-actin为内参进行标准化。

1.7 定量逆转录聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析
使用TRIzol试剂提取总RNA,微量分光光度计测定浓度后定浓,并逆转录成cDNA。采用qRT-PCR测定大鼠牙龈组织中COL1、OPN、Runx2、OPG、ALP、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1β、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的mRNA相对表达量,以β-actin作为内参。每个样本重复6次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。qRT-PCR所需引物序列见表1。

1.8 CCK-8筛选细胞实验给药浓度

大鼠成骨细胞以密度为每毫升 5×10^3 个接种于96孔板中(每孔100 μL),在37℃、5%CO₂条件下培养24 h。然后,用含有不同浓度(0、50、100、150、200、250和300 μmol/L) CV的培养基替换原培养基。24 h后,移除原培养基,加入含有CCK-8试剂(1:10稀释)的新鲜培养基(每孔110 μL)。在37℃、5%CO₂条件下培养2 h,使用酶联免疫吸附测定仪在450 nm处测量光密度(optical density, OD)值。

1.9 细胞培养分组和体外试验

大鼠成骨细胞ROS17/2.8在高糖DMEM培养基中培养,培养基中添加10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青-链霉素。

1.9.1 细胞梯度给药实验

实验分组情况如下。C组:纯培养基;P组:1 μg/mL LPS; L组:1 μg/mL LPS+50 μmol/L CV; M组:1 μg/mL LPS+100 μmol/L CV; H组:1 μg/mL LPS+150 μmol/L CV。

表 1 qRT-PCR引物序列
Tab 1 qRT-PCR primer sequences

NCBI Reference Sequence	基因	引物 (5'-3')	长度/bp
XM_006253120.5	ALP	F: TGCACGACAATCGGGATGAA R: TAGTAACCGGAGCCCTCACA	20/20
NM_053304.1	COL1	F: GGTCTTGGTGGTTTTGTATTCG R: AACAGTCGCTTACCTACAGC	22/21
XM_017596552.3	Runx2	F: TGGCCGGGAATGATGAGAAC R: GCTCCGGCCTACAAATCTCA	20/20
XM_063272870.1	OPN	F: CCAGCCAAGGACCAACTACA R: AGTGTTTGTCTGTAATGCGCC	20/20
NM_031512.2	IL-1 β	F: GCTTCCTTGTGCAAGTGTC R: TGGACAGCCCAAGTCAAGG	19/19
NM_012589.2	IL-6	F: GTTTCTCTCCGAAGAGACTTC R: TGTGGGTGGTATCCTCTGTG	22/20
XM_063287055.1	COX-2	F: CGCAAATACTGCAGCCCTAC R: GGATGTCTTGTTCGTCTGCC	20/20
NM_012675.3	TNF- α	F: GGGTGATCGGTCCCAACAAG R: GCTTGGTGGTTTGTCTACGA	20/19
NM_031144.3	β -actin	F: CTATCGCAATGAGCGGTTCC R: GCACTGTGTTGGCATAGAGGTC	21/22

1.9.2 加入PI3K通路抑制剂LY294002验证CV的作用分子机制

实验分组情况如下。C组: 纯培养基; P组: 1 μ g/mL LPS; CV组: 1 μ g/mL LPS+150 μ mol/L CV; CV+LY组: 1 μ g/mL LPS+150 μ mol/L CV+10 μ mol/L LY294002。

1.10 ALP和茜素红S染色

细胞以密度为每孔 1×10^5 个接种于6孔板中。等待细胞长至80%密度后, 将原有培养基替换为成骨培养基。7 d后进行ALP染色^[15]。对于茜素红S染色, 细胞培养28 d后按照说明书进行染色。

1.11 qRT-PCR和Western blot分析

qRT-PCR和Western blot的方法和指标与体内试验一致。

1.12 透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察

将对数生长期的细胞接种于培养瓶中, 培养24 h后分为C、P、CV和CV+LY组。用胰酶消化细胞, 收集并用PBS洗3次。然后, 用2%戊二醛固定, 用1%四氧化锇后固定, 并包埋于Spurr树脂中。最后, 将细胞切片并在TEM下观察。

1.13 免疫荧光 (immunofluorescence, IF)

细胞以密度为每孔 1×10^3 个细胞接种于24孔板中, 培养12 h后分为C、P、CV和CV+LY组。细胞固定后, 在室温封闭2 h, 4 $^{\circ}$ C条件下与COL1抗

体 (1:200稀释) 孵育过夜。PBS洗涤2次后, 室温避光条件下与荧光二抗孵育2 h, 再用PBS洗涤3次, DAPI染色。荧光显微镜下观察。

1.14 统计分析

采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析和绘图。数据以均值 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析分析组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体内试验结果

2.1.1 牙周指数检测结果

与C组相比, P组的SBI ($P < 0.01$) 和PD ($P < 0.01$) 显著增加, L组的SBI ($P < 0.05$) 和PD ($P < 0.01$) 显著增加, M组的PD显著增加 ($P < 0.05$)。与P组相比, H组的SBI ($P < 0.05$) 和PD ($P < 0.01$) 显著降低。L组、M组、H组之间SBI与PD差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (表2)。

2.1.2 Micro-CT结果

与C组相比, P组大鼠的牙槽骨吸收增加, 特别是在第一和第二磨牙根部的暴露区域。P组大鼠上颌牙槽骨感兴趣区域的骨矿物质密度 (bone mineral density, BMD)、骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁数量 (trabecular number, Tb.N) 和骨小梁厚度 (trabecular thick-

ness, Tb.Th) 均显著低于C组 ($P<0.01$)。相反, P组的骨表面积/骨体积 (bone surface/bone volume ratio, BS/BV) 和骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb.Sp) 较高 ($P<0.01$)。因此, 牙周炎模型成功建立。与P组相比, H组大鼠BMD、BV/TV、Tb.N和Tb.Th显著增加 ($P<0.01$), 而BS/BV和Tb.Sp显著降低。与M组相比, H组大鼠BMD、BV/TV、Tb.Th均显著增加 ($P<0.01$), BS/BV ($P<0.01$) 和Tb.Sp ($P<0.05$) 显著降低 (图1)。

2.1.3 HE染色结果

HE染色后牙周组织组织学检查结果见图2。C组大鼠的牙槽骨相对完整, 无明显牙龈组织损伤迹象。相比之下, P组的大鼠出现牙龈乳头丧失、炎性细胞浸润和牙槽骨吸收, 牙槽嵴高度降低。与P组相比, H组的牙槽嵴高度有所增加 (图2)。

表 2 SBI和PD的结果

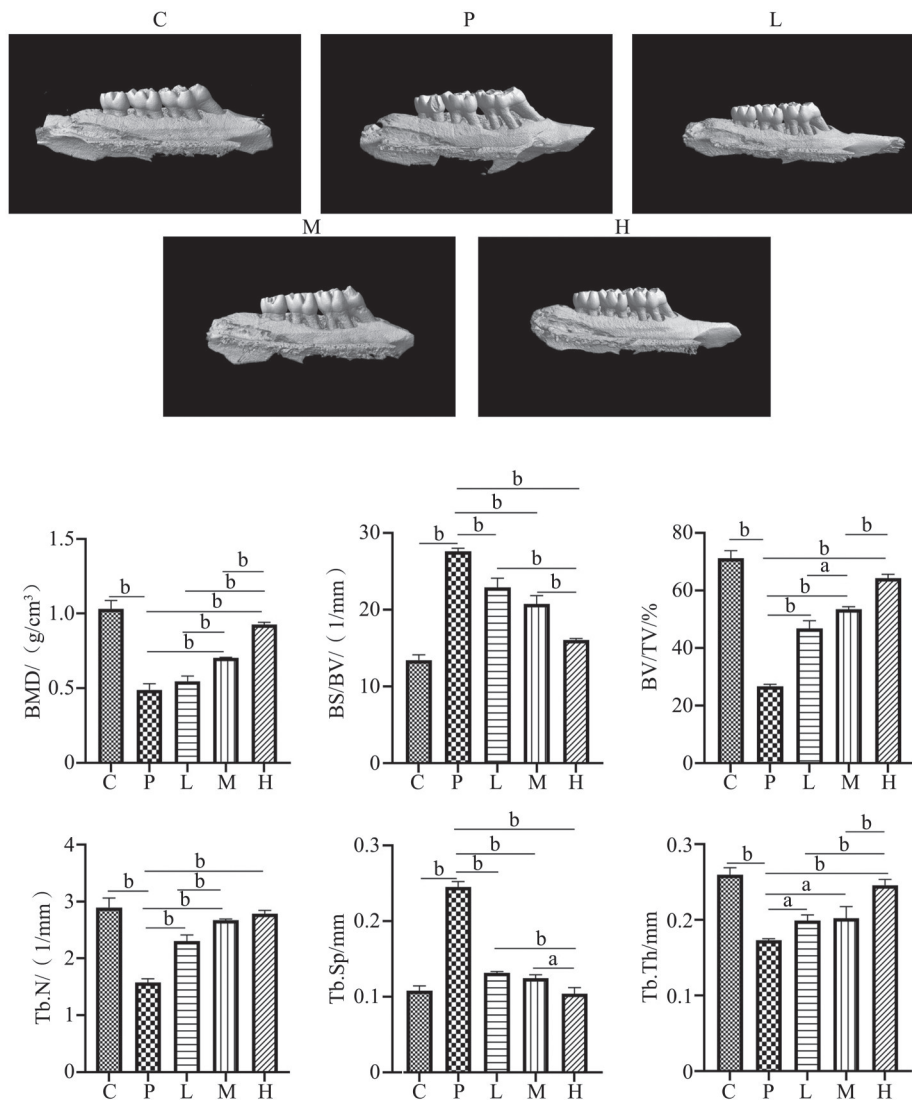
Tab 2 The results of the SBI and PD $n=8, \bar{x}\pm s$

组别	SBI	PD/mm
C	0.60±0.52	0.21±0.05
P	2.80±0.42 ^A	0.90±0.17 ^A
L	2.22±0.44 ^a	0.76±0.13 ^A
M	1.91±0.54	0.69±0.15 ^a
H	1.20±0.63 ^b	0.41±0.15 ^B

注: 在同列中, A/a表示与C组相比差异有统计学意义, B/b表示与P组相比差异有统计学意义; 小写字母表示 $P<0.05$, 大写字母表示 $P<0.01$ 。

2.1.4 IHC染色结果

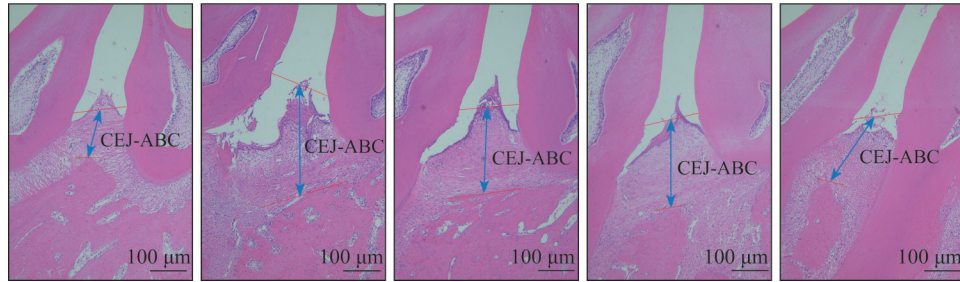
与C组相比, P组的大鼠的COL1 ($P<0.01$) 和Runx2 ($P<0.01$) 蛋白水平显著降低。H组的蛋白表达水平高于P组 ($P<0.01$) (图3、表3)。



上: 牙槽骨 Micro-CT; 下: 牙槽骨微结构。a为 $P<0.05$, b为 $P<0.01$ 。

图 1 各组牙槽骨 Micro-CT 结果

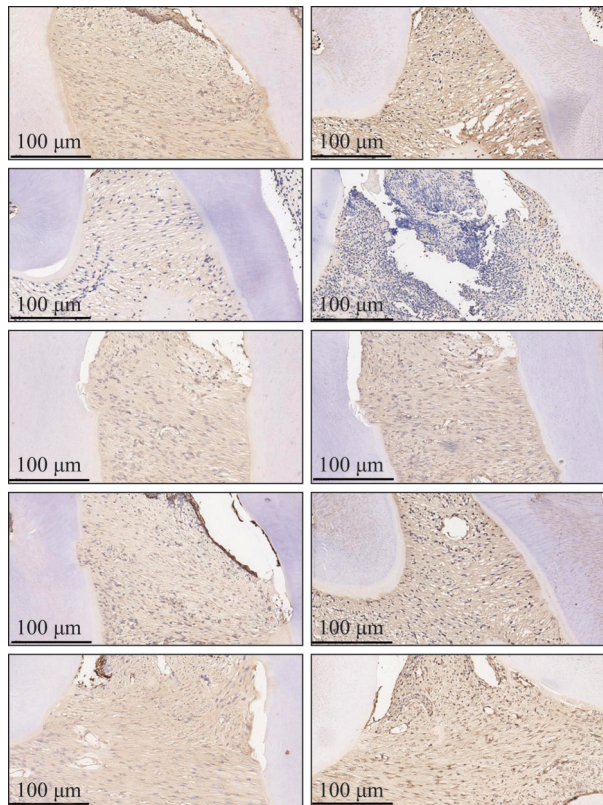
Fig 1 Micro-CT results of alveolar bone in each group



从左到右依次为C、P、L、M、H组。CEJ: 釉牙骨质界; ABC: 牙槽嵴顶; CEJ-ABC距离能够反映出牙槽骨的吸收情况。

图2 各组牙周组织HE染色结果

Fig 2 HE staining results of periodontal tissue in each group



由上至下依次为C、P、L、M、H组; 左: COL1; 右: Runx2。

图3 各组牙周组织IHC染色结果

Fig 3 IHC staining results of periodontal tissue in each group

表3 免疫组化定量分析结果

Tab 3 Quantitative IHC analysis results

组别	%, n=3, $\bar{x}\pm s$	
	COL1	Runx2
C	95.30±4.45 ^b	96.35±2.35 ^b
P	11.81±4.48	17.98±2.03
L	34.14±7.61	73.61±8.21
M	63.76±2.64	89.32±7.70
H	72.17±5.27 ^b	96.34±3.67 ^b

注: b为与P组相比, $P<0.01$ 。

2.1.5 Western blot结果

与C组相比, P组大鼠的通路蛋白p-PI3K/PI-

3K、p-AKT/AKT、p-GSK-3β/GSK-3β、β-catenin均显著降低 ($P<0.01$), 成骨相关蛋白OPN ($P<0.01$)、OPG ($P<0.01$)、COL1 ($P<0.05$)和Runx2 ($P<0.01$)的相对表达量也都有不同程度的降低。L组大鼠Runx2相较于P组表达显著增加 ($P<0.01$), 其余指标与P组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与P组相比, M组与H组通路蛋白p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-GSK-3β/GSK-3β、β-catenin均显著增加 ($P<0.01$), M组Runx2 ($P<0.01$)、OPN ($P<0.05$)表达量有不同程度的增加, 其余成骨相关蛋白间差异无统计学意义 ($P>0.05$), H组OPN ($P<0.01$)、OPG ($P<0.01$)、COL1 ($P<0.01$)和Runx2 ($P<0.01$)表达量显著增加 (图4)。

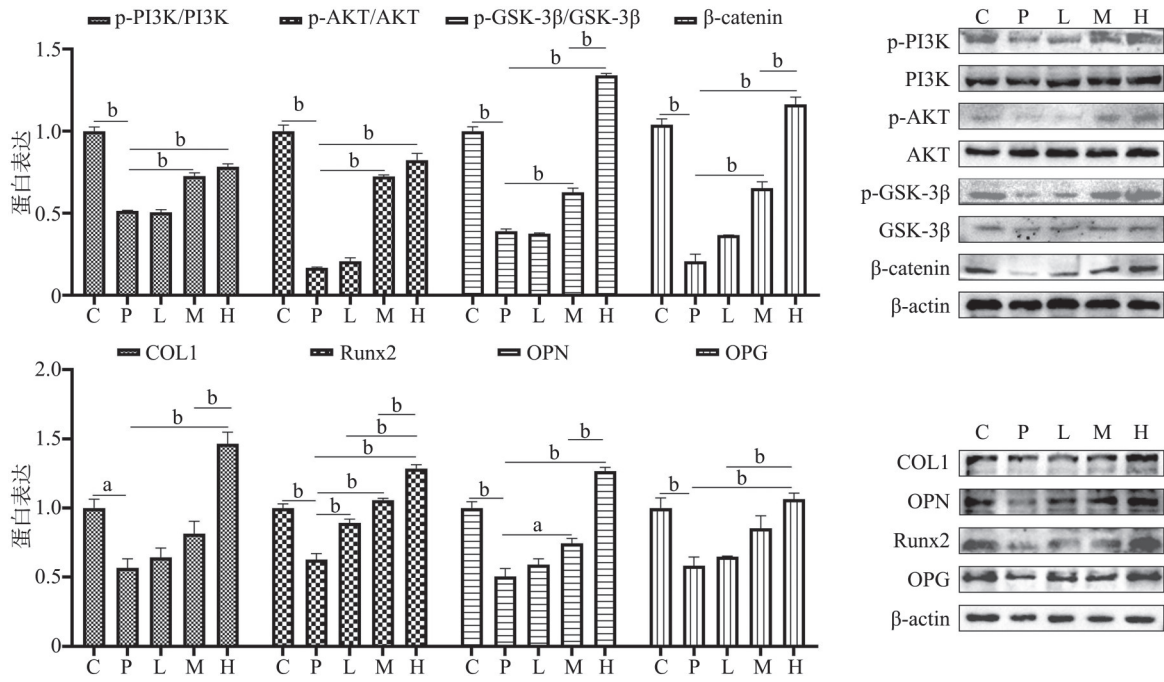
2.1.6 qRT-PCR结果

2.1.6.1 成骨相关基因表达情况

与C组相比, P组的成骨相关基因表达降低, 包括COL1 ($P<0.01$)、OPN ($P<0.01$)、Runx2 ($P<0.05$)和ALP ($P<0.01$)。与P组相比, L组ALP相对表达量增加 ($P<0.05$), 其余成骨相关基因间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。M组相较于P组ALP ($P<0.05$)、Runx2 ($P<0.05$)、COL1 ($P<0.01$)基因表达显著增加, OPN差异无统计学意义 ($P>0.05$)。H组相较于P组COL1 ($P<0.01$)、OPN ($P<0.01$)、Runx2 ($P<0.01$)和ALP ($P<0.01$)基因表达显著增加 (图5)。

2.1.6.2 炎症因子基因表达情况

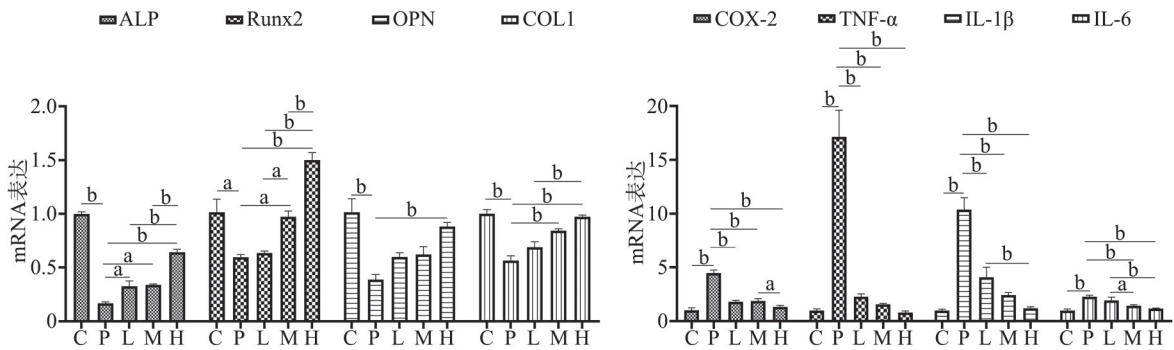
与C组相比, P组COX-2、TNF-α、IL-1β、IL-6基因表达均显著增加 ($P<0.01$)。相较于P组, L组COX-2、TNF-α、IL-1β基因表达显著降低 ($P<0.01$), IL-6差异无统计学意义 ($P>0.05$)。M组与H组相较于P组COX-2 ($P<0.01$)、TNF-α ($P<0.01$)、IL-1β ($P<0.01$)、IL-6 ($P<0.01$)基因表达均有不同程度的降低 (图5)。



上：通路蛋白表达情况及蛋白条带图；下：成骨相关蛋白表达情况及蛋白条带图。a为P<0.05, b为P<0.01。

图 4 各组牙龈组织 Western blot 结果

Fig 4 Western blot results of gingival tissue in each group



左：成骨相关基因表达情况；右：炎症因子基因表达情况。a为P<0.05, b为P<0.01。

图 5 各组牙龈组织相关基因表达情况

Fig 5 Expression of relevant genes to gingival tissue in each group

2.2 细胞实验结果

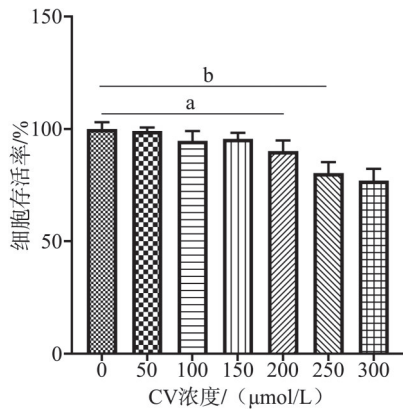
2.2.1 CV对成骨细胞活力的影响

使用CCK-8试验评估CV的细胞毒性。50、100和150 μmol/L CV存在时，细胞活力均在90%以上。相反，浓度≥200 μmol/L时，细胞活力降低至90%以下。因此，后续实验使用50、100和150 μmol/L的CV(图6)。

2.2.2 Western blot结果

与C组相比，P组的通路蛋白如p-PI3K/PI3K (P<0.01)、p-AKT/AKT (P<0.05)、p-GSK-3β/GSK-3β (P<0.05)、β-catenin (P<0.05)均显著降低，成骨相关蛋白OPN (P<0.01)、OPG (P<0.01)、COL1 (P<0.01)和Runx2 (P<0.01)的表

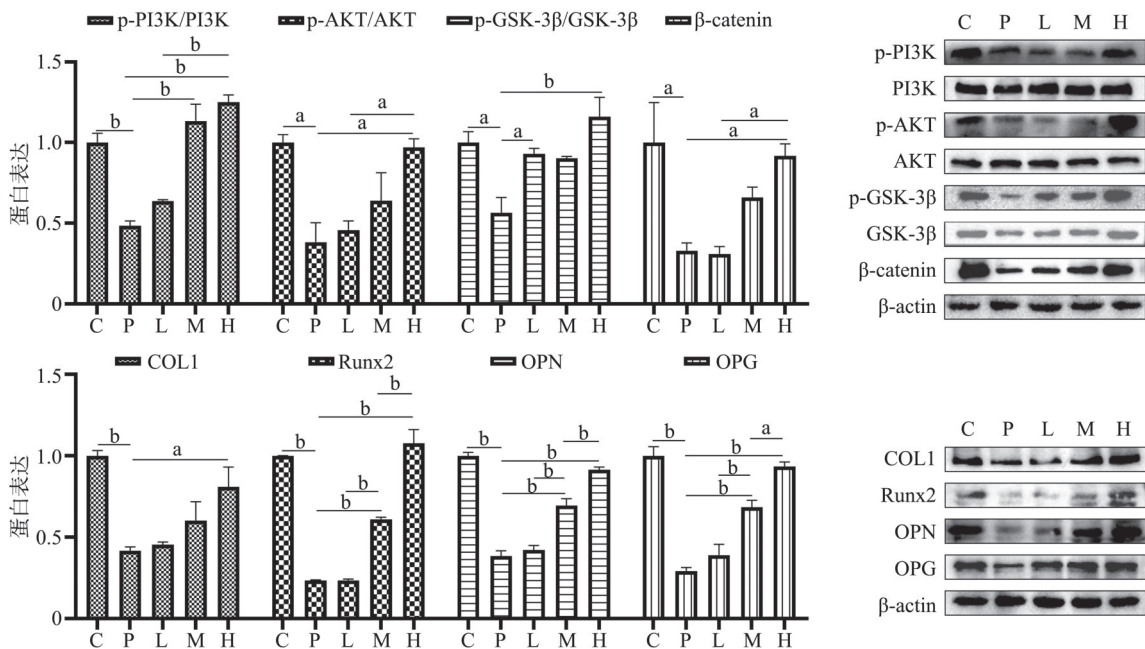
达均降低。与P组相比，L组p-GSK-3β/GSK-3β (P<0.05)蛋白表达升高，其余通路蛋白和成骨相关蛋白表达差异均无统计学意义 (P>0.05)。与P组相比，M组p-PI3K/PI3K (P<0.01)蛋白表达显著增加，其余通路蛋白差异无统计学意义 (P>0.05)，成骨相关蛋白OPN (P<0.01)、OPG (P<0.01)、Runx2 (P<0.01)表达显著增加，COL1差异无统计学意义 (P>0.05)。与P组相比，H组的p-PI3K/PI3K (P<0.01)、p-AKT/AKT (P<0.05)、p-GSK-3β/GSK-3β (P<0.01)、β-catenin (P<0.05)及成骨相关蛋白如OPN (P<0.01)、OPG (P<0.01)、COL1 (P<0.05)和Runx2 (P<0.01)的表达均显著增加(图7)。



a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$ 。

图6 CV的CCK-8实验结果

Fig 6 CV CCK-8 experiment results



上: 通路蛋白表达情况; 下: 成骨相关蛋白表达情况。a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$ 。

图7 细胞 Western blot 结果

Fig 7 Western blot results of cells

与CV组相比, CV+LY组的ALP ($P < 0.01$)、OPN ($P < 0.01$)、COL1 ($P < 0.01$) 和 Runx2 ($P < 0.01$) 基因表达显著降低 (图10)。

2.2.4 CV对大鼠成骨细胞分化的影响

高剂量 (150 μmol/L) CV增加了ALP含量并促进了矿化结节的形成。CV+LY组ALP染色和矿化结节数量均显著低于CV组 (图11)。

2.2.5 IF结果

C组的荧光强度显著高于P组 ($P < 0.01$), CV组的荧光强度显著高于CV+LY组 ($P < 0.01$) (图12)。

2.2.6 TEM结果

TEM结果显示, P组细胞存在凋亡小体和大

与CV组相比, CV+LY组的p-AKT/AKT ($P < 0.01$)、p-GSK-3β/GSK-3β ($P < 0.01$)、β-catenin ($P < 0.05$) 及成骨相关蛋白OPN ($P < 0.05$)、OPG ($P < 0.05$)、COL1 ($P < 0.01$) 和 Runx2 ($P < 0.05$) 的表达均降低 (图8)。

2.2.3 qRT-PCR结果

与C组相比, P组的成骨相关基因表达降低, 包括COL1 ($P < 0.01$)、OPN ($P < 0.01$)、Runx2 ($P < 0.01$) 和ALP ($P < 0.01$)。M组相较于P组COL1 ($P < 0.05$) 基因表达显著增加, 其余基因间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。H组相较于P组COL1 ($P < 0.05$)、OPN ($P < 0.05$)、Runx2 ($P < 0.01$) 和ALP ($P < 0.05$) 基因表达显著增加 (图9)。

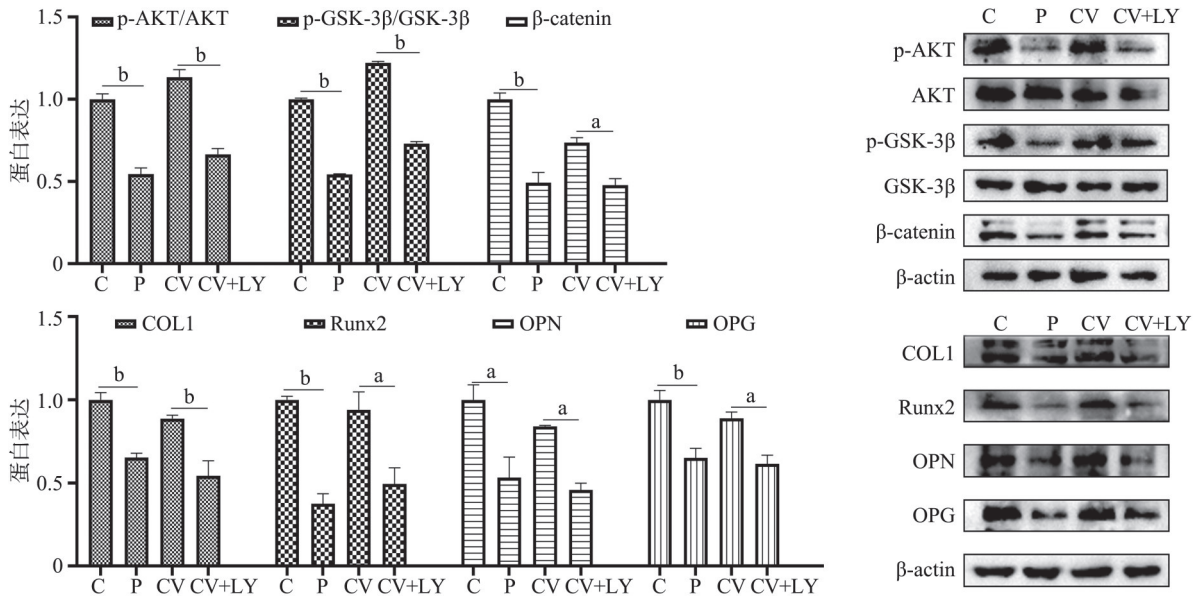
量胞质内空泡, CV+LY组细胞有凋亡小体出现, 而C组和CV组细胞没有发现明显的凋亡小体产生 (图13)。

3 讨论

牙周炎是最常见的炎症性疾病之一, 其特征为骨和附着组织的破坏^[6]。它可导致牙龈炎症、牙龈萎缩、骨质松动及骨和牙齿的丢失^[7]。传统治疗主要依赖抗生素, 如甲硝唑, 这些抗生素在抑制牙周炎病原菌生长和控制炎症方面起着关键作用^[8]。然而, 医学研究的进步和治疗理念的演变表明, 仅仅抑制细菌生长和控制炎症不足以全

面恢复受牙周炎损伤的牙周组织的健康。牙周再生治疗通过诱导成骨细胞的增殖和分化，恢复牙周组织的功能和形态。此外，过度依赖抗生素治疗可能导致药物耐药性^[19]。治疗牙周炎最理想的

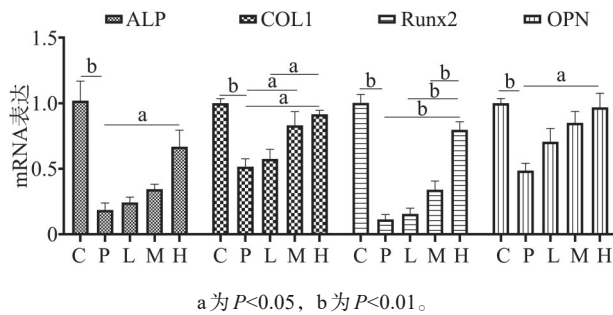
方法是抑制牙周炎致病菌的同时修复牙槽骨。在这种治疗需求下，具有抗菌、抗氧化和成骨特性的CV^[20]可以成为未来牙周炎治疗的一个新方向。



上：通路蛋白表达情况；下：成骨相关蛋白表达情况。a为P<0.05, b为P<0.01。

图 8 加入抑制剂后细胞的 Western blot 结果

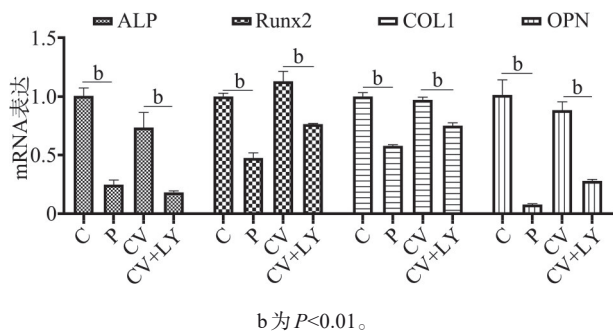
Fig 8 Western blot results of cells after adding inhibitors



a为P<0.05, b为P<0.01。

图 9 细胞成骨相关基因表达情况

Fig 9 Expression status of relevant genes in cellular experiments



b为P<0.01。

图 10 加入抑制剂后细胞成骨相关基因表达情况

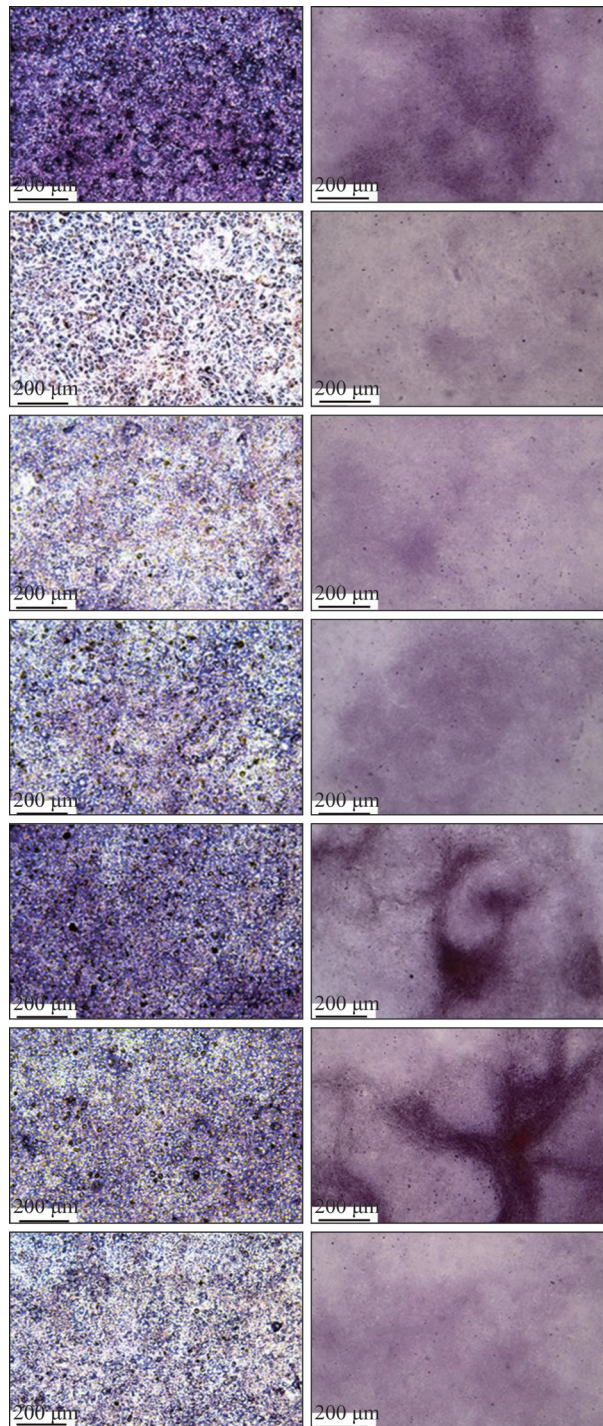
Fig 10 Expression profiles of osteogenesis-related genes in cells following inhibitor treatment

CV是精油中的一种天然成分，因其抗菌、抗氧化、抗炎、抗凋亡和骨保护作用而得到广泛研

究^[21]。CV对牙周炎病原菌表现出优异的抗菌活性。同时，CV来源广泛、价格低廉，安全性较高，具有极大的研究前景。基于这些先前的研究，本研究探讨了CV在调节受牙周炎影响的牙槽骨成骨细胞中的作用，并探索了其在牙周治疗中的潜在应用。

在本研究中，通过结扎和LPS成功在P组诱导了牙周炎，导致牙槽骨丧失。局部施用不同浓度的CV水凝胶4周后，牙周炎症状得到改善，H组相比P组显示出显著的牙槽骨修复。因此，局部应用CV水凝胶可有效治疗大鼠的牙周炎，并能修复牙槽骨。本研究证实CV能促进成骨蛋白的表达。因此，基于本课题组前期的实验结果，CV可能通过双重机制（抑制破骨细胞分化和促进成骨细胞分化）发挥骨修复和再生作用。

PI3K/AKT信号通路促进细胞存活并减少凋亡。该通路在促进骨重塑和发育方面起着核心作用。PI3K/AKT信号通路在细胞增殖、分化和凋亡等过程中发挥着关键作用。在成骨细胞的研究中，该通路也被发现与成骨分化密切相关^[22]。因此，如果CV能调节这一通路，它就有可能促进成骨细胞的成骨分化。Xie等^[23]证实CV能增强AKT的磷酸化。



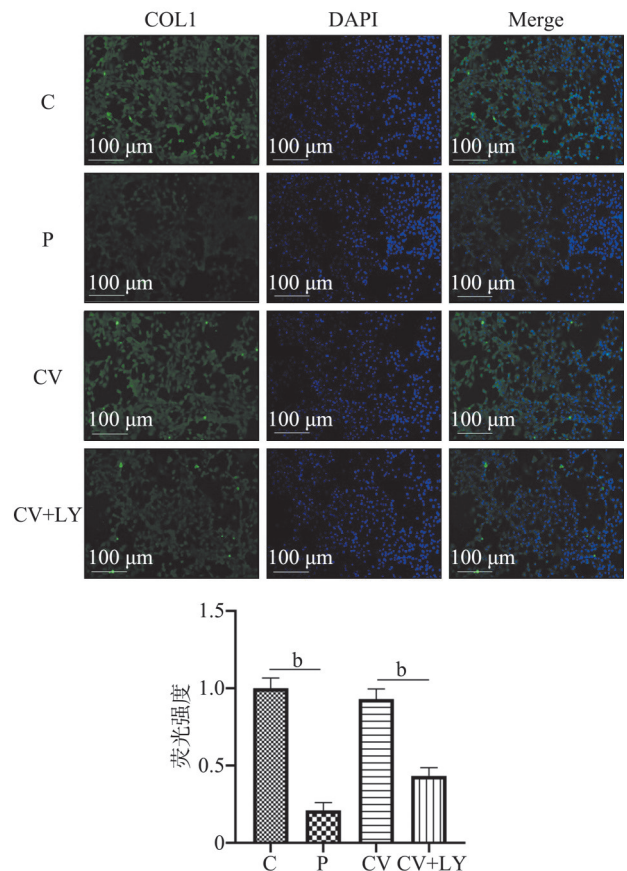
由上至下依次为 C、P、L、M、H、CV、CV+LY 组。左：ALP 染色；右：茜素红 S 染色。

图 11 细胞 ALP 染色和钙化结节染色结果

Fig 11 Results of cellular ALP staining and calcification nodule staining

在本研究中，LPS 干预后 PI3K/AKT 通路的磷酸化水平降低；在经过 CV 治疗后该通路磷酸化水平升高。Wnt/ β -catenin 经典信号通路与成骨相关， β -catenin 是该通路中的关键蛋白，可被 GSK-3 β 降解^[24]。PI3K/AKT 通路的磷酸化会使 GSK-3 β 磷酸

化，从而防止 β -catenin 降解，促进其在核内积累，进而促进骨修复和再生。OPG 是一种骨保护因子，能抑制破骨细胞途径中受体的结合，从而减少成骨细胞凋亡并促进其增殖^[25]。在使用 LY294002 阻断 PI3K/AKT 通路后，CV 的治疗效果受到部分抑制。与 CV 组相比，CV+LY 组的 OPG、COL1、OPN 和 Runx2 的表达降低，因此减弱了对破骨细胞的抑制。同时 TEM 下比较 CV 与 CV+LY 组发现，阻断 PI3K 信号通路促进了成骨细胞凋亡。



上：免疫荧光检测结果；下：免疫荧光量化结果。b 为 $P < 0.01$ 。

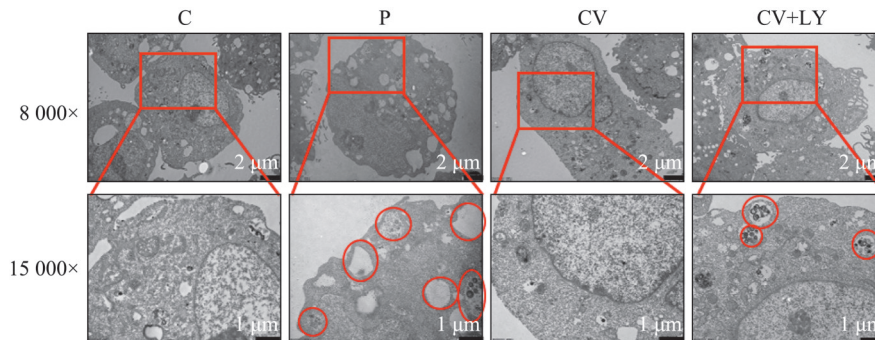
图 12 细胞 COL1 免疫荧光结果

Fig 12 COL1 immunofluorescence results of cells

Western blot 分析显示，CV+LY 组中 p-AKT、 β -catenin 和成骨相关蛋白的相对表达量显著低于治疗组。成骨细胞在分化后期分泌钙，形成钙化结节^[26]。钙化结节的数量可用于评估成骨能力。ALP 是成骨细胞的标志物，有助于评估成骨能力^[27]。ALP 表达是骨形成的早期指标，参与并在成骨细胞矿化过程的早期阶段发挥作用^[28]。因此，使用 ALP 和茜素红 S 染色试剂盒，对不同药物浓度刺激的成骨细胞进行染色。茜素红 S 染色可以检测到成熟成骨细胞分泌的钙化结节，验证其成骨能力。

在CV+LY组中，ALP染色强度低于治疗组。茜素红S染色显示的钙化结节较少。在实验中，当使用LY294002阻断PI3K/AKT/GSK-3 β 通路时，CV的成骨能力受到显著抑制。这表明CV的成骨作用与

调节PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路有关。牙槽骨修复是一个复杂的生物学过程，涉及成骨细胞的增殖和分化。由于CV能促进成骨细胞的成骨分化，因此它有可能在牙槽骨修复中发挥积极作用。



红圈表示凋亡小体与胞质内空泡。

图 13 TEM结果

Fig 13 Results of TEM

体内和体外结果均表明，CV水凝胶有效减轻了与牙周炎相关的炎症反应。H组相较于其他组，表现出更优的牙槽骨修复效果。CV促进大鼠成骨细胞的成骨分化；H组中PI3K/AKT通路的表达与C组没有显著性差异。加入LY294002后，CV+LY组炎症因子的mRNA水平高于治疗组。本研究采用了体内和体外共同验证的方法，但体外实验不能完全模拟体内的状态，因此可能存在一些局限性。

综上所述，CV能够对牙槽骨起到修复作用，促进成骨细胞的增殖和分化，此外，它还能减少成骨细胞凋亡和降低炎症因子的表达，这些作用可能与香芹酚激活PI3K/AKT/GSK-3 β 通路有关。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

- [1] Sanchez P, Everett B, Salamonson Y, et al. The oral health status, behaviours and knowledge of patients with cardiovascular disease in Sydney Australia: a cross-sectional survey[J]. BMC Oral Health, 2019, 19(1): 12.
- [2] Lazureanu PC, Popescu FG, Stef L, et al. The influence of periodontal disease on oral health quality of life in patients with cardiovascular disease: a cross-sectional observational single-center study[J]. Medicina (Kaunas), 2022, 58(5): 584.
- [3] Tagger-Green N, Refael A, Szmukler-Moncler S, et al. The association of systemic condition and medications on alveolar bone loss and tooth attrition[J]. Quintessence Int, 2024, 55(8): 616-628.
- [4] Zhang L, Song R, Shi Z, et al. Carvacrol effectively inhibits *Pseudomonas tolaasii* in vitro and induces resistance to brown blotch disease in postharvest agaricus bisporus[J]. Foods, 2024, 13(22): 3689.
- [5] Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2015, 55(3): 304-318.
- [6] 周露露, 滕念, 高甜甜, 等. 香芹酚水凝胶对牙周炎大鼠牙槽骨保护作用研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2024, 42(5): 593-608.
- [7] Zhou LL, Teng N, Gao TT, et al. Protective effect of carvacrol hydrogel on the alveolar bone in rats with periodontitis[J]. West China J Stomatol, 2024, 42(5): 593-608.
- [8] Louro AF, Paiva MA, Oliveira MR, et al. Bioactivity and miRNome profiling of native extracellular vesicles in human induced pluripotent stem cell-cardiomyocyte differentiation[J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(15): e2104296.
- [9] Tong W, Li J, Feng X, et al. Kaiso regulates osteoblast differentiation and mineralization via the Itga10/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(4): 41.
- [9] 叶莲妹, 齐雪. 柚皮素调节cGAS/STING信号通路对牙周炎大鼠的治疗作用[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(8): 1954-1960.
- Ye LM, Qi X. Effect of naringenin on periodontitis rats by regulating cGAS/STING signaling pathway[J]. Drugs

- Clin, 2024, 39(8): 1954-1960.
- [10] 苏娟娟, 朱永翠, 张文玲. 连翘苷对牙周炎大鼠 p38 MAPK/c-Fos 信号通路及破骨细胞活化的影响[J]. 口腔医学研究, 2021, 37(1): 33-38.
- Su JJ, Zhu YC, Zhang WL. Effects of Phillyrin on p38 MAPK/c-Fos signal pathway and osteoclast activation in periodontitis rats[J]. J Oral Sci Res, 2021, 37(1): 33-38.
- [11] 黄永娜, 宣德春, 梁荣, 等. 一种注射用温敏型水凝胶的制备及特征分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(4): 120-124.
- Huang YN, Xuan DC, Liang R, et al. Preparation and characteristics analysis of a temperature-sensitive hydrogel for injection[J]. Jiangsu Agric Sci, 2021, 49(4): 120-124.
- [12] 武扬, 李丽. 阿托伐他汀对牙周炎大鼠的影响及可能机制[J]. 长春中医药大学学报, 2023, 39(10): 1101-1105.
- Wu Y, Li L. Effects and possible mechanisms of atorvastatin in the treatment of periodontitis rats[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2023, 39(10): 1101-1105.
- [13] 马涛, 时婧, 徐彬. 清浊曲比亲艾拉蜜膏对大鼠牙周炎进展及血清炎症细胞因子表达的影响研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2023, 23(3): 308-311, 316.
- Ma T, Shi J, Xu B. Progress of Qingzhuo Qubiqin Ailami paste on periodontitis and its effects on expression of serum inflammatory cytokines in rats[J]. Eval Anal Drug-Use Hosp Chin, 2023, 23(3): 308-311, 316.
- [14] Liu C, Chen Y, Bai H, et al. Characterization and application of in situ curcumin/ZNP hydrogels for periodontitis treatment[J]. BMC Oral Health, 2024, 24(1): 395.
- [15] Xiong Y, Zhao B, Zhang W, et al. Curcumin promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through the PI3K/AKT/Nrf2 signaling pathway[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020, 23(7): 954-960.
- [16] Zhang Z, Zheng Y, Bian X, et al. Identification of key genes and pathways associated with oxidative stress in periodontitis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 9728172.
- [17] Fu L, Ling C, Jin Z, et al. Photoacoustic imaging of posterior periodontal pocket using a commercial hockey-stick transducer[J]. J Biomed Opt, 2022, 27(5): 056005.
- [18] 唐彩金, 曾启新, 方梅飞, 等. 消退素 D1 治疗实验性大鼠牙周炎的研究[J]. 口腔医学研究, 2017, 33(12): 1270-1273.
- Tang CJ, Zeng QX, Fang MF, et al. Curative effect of endogenous Resolvin D1 on periodontitis in rats[J]. J Oral Sci Res, 2017, 33(12): 1270-1273.
- [19] Wang L, Wu F, Song Y, et al. Erythropoietin induces the osteogenesis of periodontal mesenchymal stem cells from healthy and periodontitis sources via activation of the p38 MAPK pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(2): 829-835.
- [20] Cicalău GIP, Babes PA, Calniceanu H, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of carvacrol and magnolol, in periodontal disease and diabetes mellitus[J]. Molecules, 2021, 26(22): 6899.
- [21] Eriten B, Kucukler S, Gur C, et al. Protective effects of Carvacrol on mercuric chloride-induced lung toxicity through modulating oxidative stress, apoptosis, inflammation, and autophagy[J]. Environ Toxicol, 2024, 39(12): 5227-5237.
- [22] Wang J, Chen T, Li X, et al. A study on the anti-osteoporosis mechanism of isopsoralen based on network pharmacology and molecular experiments[J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 304.
- [23] Xie Y, Kim HI, Yang Q, et al. TRPV3 regulates Breast Cancer Cell Proliferation and Apoptosis by EGFR/AKT pathway[J]. J Cancer, 2024, 15(10): 2891-2899.
- [24] Sun K, Yu M, Wang J, et al. A Wnt10a-Notch signaling axis controls Hertwig's epithelial root sheath cell behaviors during root furcation patterning[J]. Int J Oral Sci, 2024, 16(1): 25.
- [25] Wan M, Shi X, Feng X, et al. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteopontin gene expression[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 10119-10125.
- [26] Liu C, Zhu R, Liu H, et al. Aqueous extract of mori folium exerts bone protective effect through regulation of calcium and redox homeostasis via PTH/VDR/CaBP and AGEs/RAGE/Nox4/NF-κB signaling in diabetic rats [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1239.
- [27] Pisanti P, Yeatts AB, Cardea S, et al. Tubular perfusion system culture of human mesenchymal stem cells on poly-L-lactic acid scaffolds produced using a supercritical carbon dioxide-assisted process[J]. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(10): 2563-2572.
- [28] Darjanki CM, Prahasanti C, Fitria AE, et al. RUNX2 and ALP expression in osteoblast cells exposed by PM-MA-HAp combination: an *in vitro* study[J]. J Oral Biol Craniofac Res, 2023, 13(2): 277-282.