

低能量激光通过激活ROS/ERK通路促进张力诱导下MC3T3-E1成骨分化的机制研究

李杨¹, 董世涛¹, 周佳星¹, 王坤², 王首力¹

(1.承德市口腔医院口腔科 河北 承德 067000; 2.献县中医医院口腔科 河北 沧州 061300)

[摘要]目的: 探究低能量激光治疗 (Low-Level Laser Therapy, LLLT) 对张力诱导的MC3T3-E1成骨分化功能及机制的影响。方法: MC3T3-E1分为对照组 (CON, 无特殊处理)、张力组 (Stress组, 加力处理)、激光组 (LLLT组, 8 J/cm²能量照射, 隔天照射1次, 每次照射20 s, 共照射3次)、联合组 (Stress+LLLT组, 加力处理后2 h再进行激光处理)。通过ALP+茜素红染色 (Alizarin Red Staining, ARS) 检测各组细胞的成骨分化指标。通过qRT-PCR和Western blotting法检测Runx2、OCN的表达水平。利用荧光显微镜观察ROS和Western blotting检测ERK的变化。结果: Stress和LLLT单独处理均能表现出对ALP和ARS染色的促进作用, 并提高Runx2和OCN的表达水平, 而联合处理效果更为显著。Stress和LLLT单独处理均能显著增加ROS和p-ERK的表达, 而联合处理效果更为显著。结论: LLLT能够激活ROS/ERK通路, 从而促进张力诱导下MC3T3-E1的成骨分化。

[关键词]低能量激光治疗; 活性氧; 张力诱导; 成骨分化; 信号通路; 活性氧分子 (ROS); ERK

[中图分类号]R783.1 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455 (2026) 01-0014-05

Mechanism of Low Energy Laser to Promote Stress-induced MC3T3-E1 Osteogenesis Through Activation of ROS/ERK Pathway

LI Yang¹, DONG Shitao¹, ZHOU Jiaying¹, WANG Kun², WANG Shouli¹

(1. Department of Dermatology, Chengde City Stomatological Hospital, Chengde 067000, Hebei, China; 2. Department of Dermatology, Xianxian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Cangzhou 061300, Hebei, China)

Abstracts: Objective This study aimed to investigate the effect of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on the function of stress-induced osteogenic differentiation of mouse Embryonic Osteoblasts Cells (MC3T3-E1) and to study the mechanism of action in depth. **Methods** We divided MC3T3-E1 into control group (CON, no special treatment), stress group (Stress group, subjected to force treatment), laser group (LLLT group, 8 J/cm² energy irradiation, irradiated once every other day, each irradiation for 20 s, irradiated for a total of 3 times), and combined group (Stress+LLLT group, laser treatment was performed 2 h after tension treatment). The osteogenic indexes of the cells in each group were detected by alkaline phosphatase (ALP) and Alizarin Red S (ARS) staining. The expression levels of Runt-related transcription factor 2 (Runx2), ALP, and osteocalcin (OCN) were detected by qRT-PCR and western blotting. Reactive oxygen species (ROS) and western blotting were utilized to detect changes in the extracellular regulated protein kinases (ERK) pathway. **Results** The results of ALP and ARS staining showed that both Stress and LLLT treatments alone significantly increased the expression of ALP and ARS, while the combined treatment of the two had a more significant effect. Expression of osteogenesis-related genes and proteins showed that both Stress and LLLT treatment alone increased the expression levels of Runx2 and OCN. In contrast, the combined treatment had a more significant effect. The fluorescence staining and phosphorylation level of ERK showed that both Stress and LLLT treatments alone significantly increased the expression levels of ROS and p-ERK, while the combined treatment had a more significant effect. **Conclusion** This study concludes that LLLT can activate the ROS/ERK pathway, thereby promoting the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 under tension induction. This finding provides an experimental basis for a deeper understanding of the mechanism of LLLT in osteoblastic activity, which has potential application value.

Key words: low energy laser therapy; reactive oxygen species; stress-induced; osteogenic differentiation; signaling pathway; reactive oxygen species (ROS); ERK

基金项目: 承德市科技计划项目 (编号: 202204A004)

通信作者: 董世涛, 副院长、主任医师; 研究方向为口腔正畸、牙周病的治疗。E-mail: Love_china08@163.com

第一作者: 李杨, 主治医师; 研究方向为口腔正畸、牙周病的治疗。E-mail: cdkqyly@126.com

口腔正畸是一种通过施加外力使牙齿移动的治疗方法, 常见于解决错殆畸形等口腔临床问题^[1]。然而, 传统的正畸治疗因骨改建速度较慢, 通常需要漫长的治疗时间和多次就诊, 给患者带来不便。因此, 寻找能够加速正畸过程、缩短治疗时间的方法对于提高患者的治疗体验和临床效果具有重要的意义。

低能量激光治疗 (Low-level Laser Therapy, LLLT) 作为一种非侵入性的生物刺激方法, 已被广泛应用于促进成骨和组织修复过程中^[2-3]。多项研究已经证明了LLLT在骨改建和修复方面的潜力^[4]。这一机制在Medalha CC、Basso FG和Manzano-Moreno FJ等的研究中得到验证, 他们发现LLLT能够增加成骨细胞的蛋白质合成^[5]和碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 活性^[6-7], 从而促进骨基质的沉积和成骨过程。先前的研究表明, 活性氧分子 (Reactive Oxygen Species, ROS) 和ERK在骨细胞的成骨分化过程中起着重要的调节作用^[8]。ROS是一种在适量产生的情况下可以促进成骨细胞分化和功能的活性分子, 从而推动骨基质的合成^[9]。ERK是一条重要的细胞信号通路, 参与了多种生物学过程, 包括骨细胞的增殖、分化和骨基质合成^[10]。然而, 目前尚未有研究明确LLLT是否通过调控ROS和ERK的磷酸化来影响成骨细胞的成骨分化过程。

基于此, 本研究假设结合LLLT治疗与正畸过程可能为加速正畸治疗、缩短治疗时间和减少患者就诊次数提供新的可能性。为了验证这一设想, 本研究旨在深入探讨LLLT和正畸力在正畸过程中对成骨细胞的影响, 并进一步研究其潜在的分子机制。通过这一研究, 期望为口腔正畸领域引入LLLT治疗提供实证支持, 为患者提供更为便捷和高效的治疗选择。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和材料

1.1.1 细胞株: 本研究采用小鼠胚胎成骨前体细胞MC3T3-E1 (亚克隆14), 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 (上海, 中国)。细胞在含10%胎牛血清 (FBS, Gibco, 美国)、1%青霉素-链霉素 (HyClone, 美国) 的 α -MEM培养基 (Gibco, 美国) 中培养, 置于37℃、5% CO₂恒温培养箱 (Thermo Fisher, 美国) 中, 每2~3 d换液一次, 取对数生长期细胞用于实验。

1.1.2 主要试剂: 成骨诱导培养基 [α -MEM基础培养基中加入10 mM β -甘油磷酸钠 (Sigma, 美国)、50 μ g/ml 抗坏血酸 (Sigma, 美国) 和100 nM地塞米松 (Sigma, 美国)]。ALP染色试剂盒 (C3250S) 与茜素红S染色试剂盒 (C0148S) 购自碧云天生物技术公司 (中国)。ROS荧光探针DCFH-DA (碧云天生物技术公司, 中国)。RNA提取试剂盒 (EZB-RN001, EZBioscience, 中国)。逆转录试剂盒与qPCR试剂盒 (赛维尔生物, 中国)。RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒 (Beyotime, 中国)。ERK、p-ERK、

Runx2、OCN一抗 (CST, 美国), HRP标记二抗 (中杉金桥, 中国)。

1.1.3 主要仪器: 低能量激光治疗仪 (武汉光盾科技, 型号GD-D808), 波长808 nm, 功率密度100 mW/cm², 照射剂量8 J/cm²。FLEXCELL FX-5000T张力加载系统 (Flexcell Int., 美国), 配BioFlex[®] 6孔培养板。荧光显微镜: ZEISS Axio Observer 5 (德国)。qPCR仪: CFX96 Touch (Bio-Rad, 美国)。凝胶成像系统: ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, 美国)。

1.2 细胞分组和处理方式: 本研究设置未做处理的MC3T3-E1为对照组 (Con); 为了更好地模拟在正畸过程中成骨细胞张力状态, 使用 (FLEXCELL FX5K Tension) 仪器^[11]对MC3T3-E1细胞施加了张力, 设置为张力组 (Stress组), 处理方法, 将细胞接种在特殊的板子上 (FLEXCELL[®] 6-well BioFlex[®] Plates) 放在张力器上处理2 min^[12]; 单独低能量激光处理为激光组 (LLLT组), 处理方式: 接种在板子上的细胞通过LLLT照射30 s; 在联合张力和激光照射处理为联合组 (Stress+LLLT组), 处理方式张力处理结束再激光照射30 s。本研究细胞实验均设置3个副孔, 重复3次。

1.3 ALP染色: 将MC3T3-E1细胞接种在24孔板中, 按照上述分组, 并进行成骨诱导。诱导7 d后, 去除培养基, PBS洗涤3遍, 加入适当多聚甲醛固定30 min后, 用适当PBS洗涤3~5次, 每次3~5 min。最后一次洗涤完毕后, 去除洗涤液, 加入适量ALP染色工作液 (碧云天碱性磷酸酶C3250S), 确保能充分覆盖样品。室温避光孵育5~30 min或更长时间 (可长达24 h), 直至显色至预期深浅。去除ALP染色工作液, 用PBS洗涤1~2次即可终止显色反应。显微镜下拍照记录。

1.4 茜素红染色 (ARS): 将MC3T3-E1细胞接种在24孔板中, 按照上述分组, 并进行成骨诱导。诱导21 d后, 去除培养基, PBS洗涤3遍, 加入适当多聚甲醛固定30 min后, 用适当PBS洗涤3~5次, 每次3~5 min。最后一次洗涤完毕后, 去除洗涤液, 加入适量ARS工作液 [成骨细胞矿化结节染色试剂盒 (茜素红S法) C0148S], 确保能充分覆盖样品。室温避光孵育30 min, 直至显色至预期深浅。去除ARS工作液, 用PBS洗涤1~2次即可终止显色反应。显微镜下拍照记录。

1.5 实时荧光定量聚合酶链式反应: 将MC3T3-E1细胞接种在6孔板中, 按照上述分组, 并进行处理24 h。去除培养基, PBS洗涤3遍, 使用RNA提取试剂盒提取总RNA, 并逆转录为cDNA, 并进行实时荧光PCR, 对数据进行分析。

1.6 活性氧: 将MC3T3-E1细胞接种在6孔板中, 按照上述分组, 并进行处理24 h。去除培养基, PBS洗涤3遍, 使用ROS荧光染料 (碧云天1:1000) 染30 min, 除净染液后, 无血清DMEM洗涤3遍, 每边3 min, 在荧光显微镜 (ZEISS Axio Observer) 下观察并拍照记录。

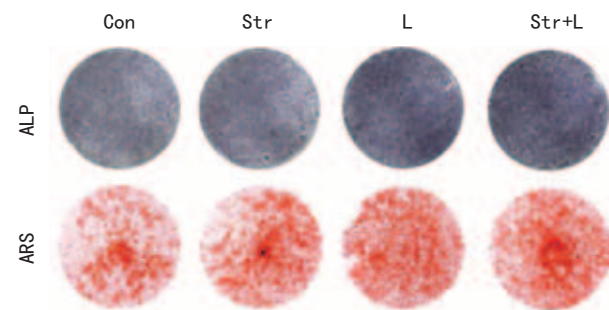
1.7 蛋白免疫印记: 将MC3T3-E1细胞接种在6孔板中, 按照上述分组, 并进行成骨诱导。诱导14 d后, 去除培养基, PBS洗涤3遍, 对样品进行蛋白质提取, 并使用BCA做蛋白质

定量分析,使用跑胶,转膜,封闭,敷一抗4℃过夜, TBST洗涤,二抗常温1 h, TBST洗涤,进行显影。

1.8 统计学分析:采用GraphPad Prism 8软件对数据进行单因素方差分析和 t 检验。检验水平为 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALP和ARS染色:结果显示, Stress和LLLT单独处理均表现出对ALP和ARS的促进作用,表明机械拉伸力和低能量激光照射均能够促使骨细胞分化。LLLT和Stress联合处理呈现更显著的促进效果, ALP和ARS的表达水平相较于单独处理组显著增加。这一发现强调了LLLT和Stress在促进骨细胞分化和成熟方面的协同作用。见图1。



注: Con. 未处理组; Str. 张力组; L. 激光组; Str+L. 张力加激光组

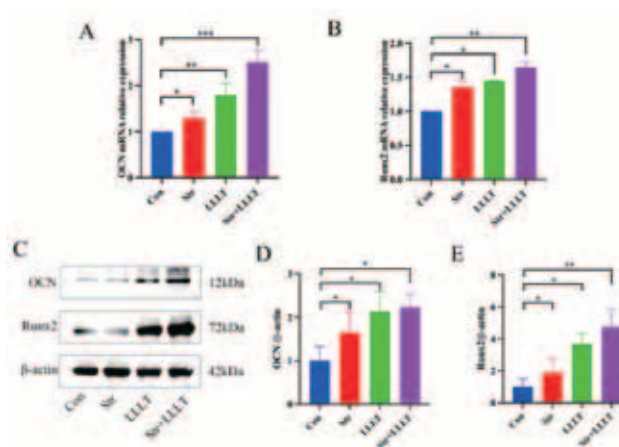
图1 不同处理对MC3T3-E1的成骨分化影响

2.2 qRT-PCR和Western blotting结果:结果显示, LLLT单独处理能够促进OCN和Runx2的蛋白表达,证明低能量激光照射对这些关键的骨细胞分化和成熟标志物具有促进作用。Stress单独处理同样能够促进这些蛋白的表达,进一步印证了机械拉伸力在骨细胞分化中的关键作用。LLLT和Stress的联合处理呈现更为显著的促进效果, OCN和Runx2的表达水平相较于单独处理组显著增加。见图2。

2.3 ROS表达和ERK的磷酸化水平:结果显示, LLLT和Stress单独处理均能够促进ROS的表达,并增强ERK的磷酸化水平。联合处理呈现更强的效果,可能是由于LLLT和Stress的协同作用导致更高水平的ROS生成和ERK的激活。见图3。

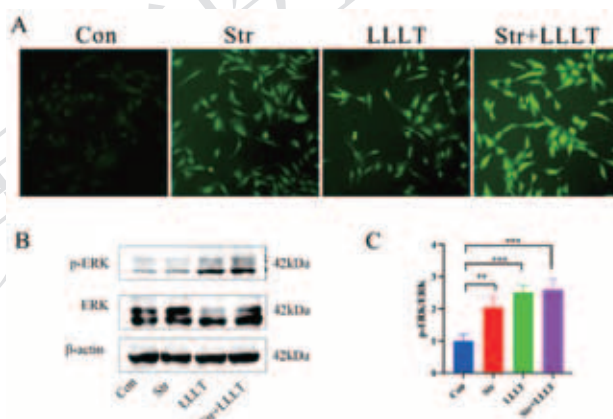
3 讨论

正畸作为一种通过外力引导牙齿移动的治疗过程,涉及骨结构的改建^[13]。然而,由于成骨过程的时间较长,导致正畸周期相对较长且患者需要频繁复诊,这给患者和医生都带来了一定的不便。针对这一问题,近年来新型的治疗方法——低能量激光照射逐渐引起了关注^[14]。低能量激光照射被认为是一种无伤害的治疗手段,在成骨和骨修复领域有着潜在的应用前景^[4,15-16]。然而,目前对于低能量激光在促进成骨过程中的作用缺乏大量的实验验证,同时该



注: A. 不同处理对OCN mRNA表达的定量分析; B. 不同处理对Runx2 mRNA表达的定量分析; C. 不同处理对OCN和Runx2蛋白表达的影响; D. 不同处理对OCN蛋白表达的定量分析; E. 不同处理对Runx2蛋白表达的定量分析。Con. 未处理组; Str. 张力组; L. 激光组; Str+L. 张力加激光组。 $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$

图2 不同处理对MC3T3-E1的成骨基因和蛋白的影响



注: A. 不同处理对ROS表达影响; B. 不同处理对p-ERK和ERK蛋白表达的影响; C. 不同处理对p-ERK/ERK蛋白表达的定量分析。Con. 未处理组; Str. 张力组; L. 激光组; Str+L. 张力加激光组。 $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$

图3 不同处理对MC3T3-E1的ROS和ERK信号通路的影响

治疗方法促进成骨分化的具体机制尚未完全明确。本文将着重探讨正畸治疗中存在的周期较长和复诊次数较多的问题,以及低能量激光照射作为一种潜在的改进手段的可行性,同时强调尚待解决的实验验证和机制研究方面的问题。

既往的研究已经明确指出LLLT对成骨分化具有促进作用^[17]。在本研究中,通过ALP和茜素红染色的结果观察到, Stress和LLLT分别能够有效促进成骨过程,而LLLT与Stress联合处理后ALP和茜素红染色结果效果最好,凸显出更为显著的成骨效果。这与以往学者们的研究结果相一致^[18-19],加强了LLLT在促进成骨方面的可靠性。进一步观察成骨相关基因和蛋白的表达,特别是Runx2和OCN的结果,也进一步支持了LLLT联合Stress对成骨的促进作用。研究发现, LLLT

与Stress的联合处理导致了这些成骨相关基因和蛋白的显著上调,表明在这种联合作用下,促进成骨的效果更为显著。这一发现与其他研究者的结果相符^[20-21],进一步强调了LLLT在应对Stress引起的骨改建过程中的积极作用。综合而言,本研究结果与现有文献相一致,支持了LLLT在促进成骨方面的有效性。尤其是LLLT与Stress联合处理的组别表现出协同效应,提高了成骨相关基因和蛋白的表达水平。这一发现对于探索新型正畸治疗手段,尤其是结合激光照射和应对应力的方法具有积极的指导意义。然而,尽管本研究结果具有启发性,仍然需要更多的深入研究来进一步揭示LLLT与Stress联合作用的确切机制,并确保这一治疗方法的安全性和可行性。

本研究已经明确了LLLT对成骨的促进作用,为了更深入地探究LLLT促进成骨的机制,对LLLT可能的促进成骨作用进行了详细研究。以往的研究已经指出,LLLT能够促进细胞内ROS的生成,而ROS作为细胞内的第二信使,对细胞的生命活动起到调控作用^[22]。先前的研究表明,ROS的升高可以促进成骨细胞的增殖和成骨变化,这与本研究结果相一致。进一步分析显示,ROS还能够激活ERK信号通路,导致ERK的磷酸化水平的增加^[23]。在先前的研究中,有关ERK激活的成果表明,ERK的活化有助于促进干细胞向成骨方向分化^[24]。实验中LLLT的作用被证实能够激活ROS-ERK信号通路,从而促进成骨分化的进行。这些结果揭示了LLLT和Stress对细胞氧化应激和信号通路的调控作用,强调了它们在细胞信号传导中的关键角色。这一系列生物学意义的发现为深入理解LLLT和Stress在成骨细胞活性中的协同作用提供了有力的实验证据。然而,应当注意的是,成骨过程是一个变化莫测、受多种基因调控的复杂过程。虽然本研究结果揭示了LLLT通过ROS/ERK信号通路的作用机制,但成骨过程中其他基因的调控作用可能还需要更深层次的研究予以阐明。因此,虽然本研究为LLLT促进成骨的机制提供了一些见解,但仍需更进一步的深入研究来全面了解LLLT在成骨过程中的作用机制。这包括对其他可能参与的信号通路和关键基因的研究,以及在体内模型中验证LLLT的效果和安全性。这一系列深层次的研究将有助于揭示LLLT在正畸治疗中的潜在机制,为其在临床应用中提供更为可靠的理论基础。

本研究通过对Stress、LLLT、Stress+LLLT三组进行实验,分别考察它们对成骨细胞相关骨改建因子表达的影响。实验结果显示,在LLLT和Stress+LLLT处理下,ALP和茜素红染色的表现均较为显著,同时Runx2和OPN的表达水平也呈现出明显的上升趋势,表明激光照射能够促进成骨分化的过程。值得注意的是,在应用LLLT的过程中,ROS和ERK的磷酸化水平显著增加,这表明LLLT可能通过促进ROS生成并激活ERK信号通路,从而促进成骨的发生。然而,值得关注的是,虽然实验结果明确指出LLLT对成骨分化有促进作用,但是关于LLLT在正畸过程中的具体机制,尤其

是在体内试验方面的验证仍然存在一定的缺失。本研究在阐述LLLT对成骨分化的促进作用时,强调了ROS/ERK信号通路的可能作用,但这一机制的确切性和在整个正畸过程中的作用机制尚未得到充分的验证。因此,为了更全面地理解LLLT在正畸过程中的作用机制,未来研究需要进一步进行体内实验,以验证当前实验结果的可靠性,并深入解析LLLT对成骨分化的具体影响机制。

综上,LLLT能够通过激活ROS/ERK通路来促进拉力诱导下MC3T3-E1成骨分化。这一发现揭示了LLLT对于骨细胞活性的调控机制,为深入理解LLLT在骨骼生物学中的作用提供了重要的实验依据。此外,本研究结果还具有潜在的应用价值,为开发新型的正畸治疗策略和临床应用提供了理论基础。LLLT作为一种无创且有效的正畸治疗方法,有望成为辅助正畸过程的一种新的治疗手段。

[参考文献]

- [1]李欣. 口腔正畸结合修复治疗错合伴牙列缺损患者的优势探讨[J]. 系统医学,2022,7(10):171-174.
- [2] Wu J Y, Chen C H, Yeh L Y, et al. Low-level laser therapy enhances osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via cAMP/PKA/CREB pathway[J]. *Lasers Med Sci*, 2022, 37(3): 1231-1239.
- [3] Fernandes M R U, Suzuki S S, Suzuki H, et al. Photobiomodulation modulates cytokine expression and accelerates orthodontic tooth movement: an in vitro and in vivo study[J]. *J Biophotonics*, 2021,14(8):e202100123.
- [4]常维维, 马文盛. 低能量激光治疗促进正畸牙齿移动的研究进展[J]. *应用激光*,2021,41(5):1143-1149.
- [5]Medalha C C, Santos A L, Veronez Sde O, et al. Low level laser therapy accelerates bone healing in spinal cord injured rats[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2016,159:179-185.
- [6]Basso F G, Turrioni A P, Soares D G, et al. Low-level laser therapy mitigates zoledronic acid-induced osteoblast dysfunction: implications for medication-related osteonecrosis of the jaw[J]. *Support Care Cancer*, 2022,30(5):4123-4132.
- [7]Manzano-Moreno F J, Medina-Huertas R, Ramos-Torrecillas J, et al. Low-level diode laser therapy modulates BMP-2/TGF- β_1 signaling in osteoblasts: implications for early bone differentiation[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2021,49(8):678-685.
- [8]Chen J, Yao Y, Wang Y, et al. Autophagy triggered by the ROS/ERK signaling pathway protects mouse embryonic palatal cells from apoptosis induced by nicotine[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022,29(54):81909-81922.
- [9]Chen M, Wang D, Li M, et al. Nanocatalytic biofunctional MOF coating on titanium implants promotes osteoporotic bone regeneration through cooperative pro-osteoblastogenesis MSC reprogramming[J]. *ACS Nano*, 2022,16(9):15397-15412.
- [10]Zeng W, Yan Y, Zhang F, et al. Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation[J]. *Protein Cell*, 2013,4(7):539-547.