

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.11.009

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250805.1737.011\(2025-08-06\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.r.20250805.1737.011(2025-08-06))应力刺激下 YAP 调控牙周组织破骨细胞分化的
分子机制研究^{*}薛丽丽¹, 陈 帅², 闫 冰^{2△}

(1. 厦门大学附属第一医院口腔科, 厦门 361001; 2. 口腔疾病防治全国重点实验室/国家口腔医学中心/国家口腔疾病临床医学研究中心/四川大学华西口腔医院头颈肿瘤外科, 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨 Yes 相关蛋白(YAP)在牙周炎伴咬合创伤加重骨吸收中的作用及其分子机制, 评估靶向抑制 YAP 对牙槽骨破坏的干预效果。**方法** 通过体外机械应力加载联合脂多糖(LPS)刺激破骨细胞, 模拟体外咬合应力与炎症协同作用, 并建立牙周炎伴咬合创伤小鼠模型。利用流式细胞术、Western blot、qPCR 及免疫荧光染色等技术, 分析细胞和动物模型中 YAP 的去磷酸化与核转位情况, 并探讨 YAP 对 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)/核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)通路的调控作用。通过应用 YAP 抑制剂 XAV939 干预该通路, 评估其对破骨细胞活化及骨吸收的影响。**结果** 体外机械应力与 LPS 协同刺激明显降低破骨细胞 YAP 磷酸化水平, 促进 YAP 核转位, 激活 JNK-RANKL 通路。动物模型中, 牙周炎伴咬合创伤组 YAP、JNK、RANKL 表达水平明显高于牙周炎组($P < 0.001$)。XAV939 干预可逆转 YAP 核转位, 抑制 JNK 磷酸化及 RANKL 表达水平($P < 0.01$), 减少破骨细胞数量。**结论** YAP 作为力学-炎症信号交互的枢纽分子, 通过激活 JNK/RANKL 通路加剧破骨细胞分化及骨吸收; 靶向抑制 YAP 可有效阻断该病理进程, 为牙周炎伴咬合创伤的精准治疗提供新思路。

[关键词] YAP; Hippo 信号通路; 咬合创伤; 牙周炎; 破骨细胞**[中图法分类号]** R784**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2025)11-2528-10The molecular mechanism of YAP in regulating osteoclast differentiation in
periodontal tissue under mechanical stress^{*}XUE Lili¹, CHEN Shuai², YAN Bing^{2△}

(1. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361001, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases/National Center for Stomatology/National Clinical Research Center for Oral Diseases/Department of Head and Neck Oncology Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Yes-associated protein (YAP) in bone resorption exacerbated by occlusal trauma during periodontitis and its molecular mechanisms, and to evaluate the interventional effect of YAP inhibition on alveolar bone destruction. **Methods** Osteoclasts were stimulated by in vitro mechanical loading combined with lipopolysaccharide (LPS) to simulate the in vitro synergistic effect of occlusal stress and inflammation. A murine periodontitis model with occlusal trauma was established. Flow cytometry, Western blot, qPCR, and immunofluorescence staining were employed to analyze YAP dephosphorylation and nuclear translocation in cellular and animal models, and to investigate YAP's regulatory effect on the c-Jun N-terminal kinase (JNK)/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) pathway. The YAP inhibitor XAV939 was administered to evaluate its impact on osteoclast activation and bone resorption through pathway intervention. **Results** In vitro, combined mechanical stress and LPS stimulation significantly reduced YAP phosphorylation in osteoclasts, promoted YAP nuclear translocation, and activated the JNK-RANKL pathway. In vivo, the periodontitis with occlusal trauma group exhibited markedly elevated expression of YAP, JNK, and RANKL compared to the periodontitis-alone group ($P < 0.001$). XAV939 intervention reversed YAP nuclear translocation, suppressed JNK phosphorylation and RANKL expression ($P < 0.01$), and

^{*} 基金项目: 福建省自然科学基金项目(2021J05288)。 [△] 通信作者, E-mail: yanbing_west@163.com。

reduced osteoclast numbers. **Conclusion** YAP acts as a central hub integrating mechanical and inflammatory signals, exacerbating osteoclast differentiation and bone resorption via activation of the JNK-RANKL axis. Targeted inhibition of YAP effectively blocks this pathological cascade, offering a new approach for the precise treatment of periodontitis complicated by occlusal trauma.

[**Key words**] YAP; hippo signaling pathway; occlusal trauma; periodontitis; osteoclasts

牙周炎是全球范围内最常见的慢性炎症性疾病之一,其患病率随年龄增长明显上升,全球患病率达 11%,是成年人牙齿缺失的首要原因^[1]。该病以牙周支持组织被进行性破坏为特征,临床表现为牙龈出血、牙周袋形成、牙槽骨吸收及牙齿松动,严重影响患者咀嚼功能、营养摄入及生活质量^[2-3]。菌斑生物膜是牙周炎发生的始动因子,然而,局部生物力学因素(如异常咬合力)可通过协同炎症反应明显加速牙周组织受破坏的进程^[4-6]。临床观察表明,伴有咬合创伤的牙周炎患者牙槽骨吸收速率较单纯牙周炎患者提高 2~3 倍,且对常规治疗反应不佳,提示机械应力与炎症信号的交互作用在疾病进展中至关重要。

咬合创伤通过异常咬合力施加持续性机械应力,导致细胞外基质变形与细胞骨架重构,进而激活细胞内力学信号通路。研究表明,牙周膜成纤维细胞在机械应力刺激下可释放前列腺素 E₂、基质金属蛋白酶及核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)等因子,直接或间接促进破骨细胞分化^[7-10]。然而,机械应力信号如何与炎症信号协同调控破骨细胞活化,其机制尚未完全阐明。

近年来,机械敏感转录共激活因子 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)的生物学功能广受关注。YAP 作为 Hippo 通路的核心效应分子,经去磷酸化后可发生核转位,并与 TEA 结构域转录因子(TEA domain transcription factor, TEAD)结合,调控细胞增殖、凋亡及分化等相关基因表达^[11-14]。研究显示,YAP 在血管内皮细胞中能通过整合素/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路感知血流剪切力^[15-16];在骨组织中,YAP/转录共激活因子与 PDZ 结合基序(transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ)通路在调控成骨细胞活性以维持骨稳态中发挥重要作用^[17-18]。本团队前期研究发现,伴咬合创伤的牙周炎患者牙周组织中 YAP 去磷酸化水平明显升高,且 YAP 磷酸化与 JNK 磷酸化及 RANKL 表达水平呈正相关^[19],提示 YAP 可能是力学-炎症信号交叉传递信息的枢纽分子。

JNK 作为应激与炎症信号通路中的关键分子,可被 RANKL 激活进而促进破骨细胞分化并抑制凋亡^[19-20]。机械应力亦可明显提升牙周膜细胞 JNK 磷酸化水平,并与破骨细胞分化标志物表达相关^[21]。然而,YAP 是否通过调控 JNK/RANKL 通路介导应力对破骨细胞的协同活化,尚缺乏系统证据;靶向 YAP

能否逆转咬合创伤加重的骨破坏,亦有待阐明。基于此,本研究通过构建体外机械应力加载联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)模型及牙周炎伴咬合创伤小鼠模型,系统探讨:(1)机械应力与炎症刺激如何协同调控 YAP 去磷酸化及核转位;(2)YAP 是否通过激活 JNK/RANKL 通路促进破骨细胞分化;(3)YAP 抑制剂 XAV939 能否逆转咬合创伤协同牙周炎的骨吸收效应。本研究将揭示 YAP 在力学-炎症信号交互调控中的分子机制,为开发靶向 YAP 的牙周炎治疗策略提供实验依据,对改善相关患者的临床预后具有重要转化价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

42 只雄性健康 BALB/c 小鼠,4~6 周龄,体重(20 $\pm$ 4)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010。小鼠单核/巨噬细胞系 RAW264.7(货号 CL-0490)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。本研究已通过厦门大学附属第一医院实验动物管理与伦理委员会批准,动物实验过程遵照我国实验动物相关法律法规条例要求进行。

1.1.2 试剂与药品

HT(货号 BES21661BO)购自上海博尔森生物科技有限公司;HE 染色试剂盒(货号 MB9898-2)、中性树胶(货号 MB9899)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号 MA0082-2)、10%聚丙烯酰胺凝胶超快速制备试剂盒(货号 MA0382)、预染彩虹蛋白 marker(货号 MA0342)、青霉素/链霉素溶液(货号 MA0110)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(货号 MA0233)、DMEM 基础培养基(货号 MA0212)、PBS(货号 MA0015)购自大连美仑生物技术有限公司;NovoStar[®] SYBR qPCR SuperMix Plus(货号 E096-01B)购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;胎牛血清(货号 AUS-01S-02)购自长沙赛尔博克斯生物科技有限公司;YAP 抑制剂 XAV939(货号 T6779)购自上海陶术生物科技有限公司。YAP 一抗(1:1 000 稀释,货号 14074)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;磷酸化 YAP(p-YAP)一抗购自美国 Abcam 公司(1:1 000 稀释,货号 ab76252);JNK 一抗(1:1 000 稀释,66210-1-Ig)、RANKL 一抗(1:1 000 稀释,货号 23406-1-AP)购自安诺伦(北京)生物科技有限公司; β -actin 一抗(1:1 000 稀释,货号 1308114360)购自上海谱振生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish

peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG(1 : 5 000 稀释) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

1.1.3 设备与软件

小动物麻醉机购自上海玉研科学仪器有限公司, K3 酶标仪购自广东丹利科技有限公司, 低温高速离心机购自美国 Beckman 公司, 数显恒温水浴锅购自上海邦西仪器科技有限公司, 轨道式摇床购自杭州米欧仪器有限公司, Western blot 实验中特定蛋白条带的显影仪购自杭州易博特科技有限公司, 磁力搅拌器购自上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司, qPCR 仪购自美国 ABI 公司, 蛋白垂直电泳仪、PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司, CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 生物显微镜、荧光倒置显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

细胞实验分为两部分, 实验 1: 细胞分为正常对照组($n=3$)、应力刺激组($n=3$)、LPS 刺激组($n=3$)及应力+LPS 刺激组($n=3$); 实验 2: 细胞分为正常对照组($n=3$)、应力+LPS 刺激组($n=3$)及应力+LPS+XAV939 组(YAP 抑制剂干预, $n=3$)。动物实验选取 30 只 BALB/c 小鼠, 随机分为正常对照组($n=6$)、牙周炎组($n=6$)、咬合创伤组($n=6$)、牙周炎伴咬合创伤组($n=6$)及牙周炎伴咬合创伤+XAV939 组($n=6$)。

1.2.2 细胞培养与传代

细胞培养: 细胞用完全培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素溶液)培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

细胞换液: 吸弃培养液, 加入 PBS 润洗, 加入新鲜的完全培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

细胞传代: 待细胞生长达到 80% 汇合度时进行细胞传代, 吸弃培养液, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶消化, 用完全培养基终止消化后收集细胞悬液, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 用新鲜的完全培养基重悬细胞沉淀, 按所需比例进行传代, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.3 细胞干预

取对数生长期的细胞, 用胰蛋白酶消化, 1 000 r/min 离心 3 min 后, 弃上清液, 用新鲜的完全培养基调整细胞密度为 1×10^4 /mL, 接种于 6 孔板, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中。正常对照组: 不做任何处理。应力刺激组: 使用四点弯曲体外细胞力学加载装置进行处理, 将培养有单层小鼠破骨细胞的细胞加力板置于力学加载装置内, 冲压头垂直向下压迫细胞, 使处于上、下压头之间的细胞加力板弯曲变形, 其上、下表面积发生改变, 细胞加力板上表面受到压缩, 使附着于上表面的细胞发生形变, 受到压应力,

反之, 则受到张应力, 使用频率 0.5 Hz, 细胞加力板变形量 2 500 ustrain。LPS 刺激组: 细胞加入 1 μ g/mL 的 LPS 处理 24 h。应力+LPS 刺激组: 将 LPS 刺激 24 h 的破骨细胞采用力学加载装置进行压迫, 使用频率 0.5 Hz, 细胞加力板变形量 2 500 ustrain。应力+LPS+YAP 抑制剂组: 破骨细胞中加入 1 μ g/mL 的 LPS 及 XAV939(YAP 蛋白抑制剂)处理 24 h, 使用频率 0.5 Hz, 细胞加力板变形量 2 500 ustrain 的力学加载装置进行压迫。

1.2.4 实验动物检疫和饲养

BALB/c 小鼠放入屏障环境检疫室, 进行为期 3 d 的检疫观察, 无异常后即可进行使用, 继续后续实验。小鼠饲养在独立通风笼具中, 饲养环境要求: 温度 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 12 h/12 h 昼夜交替, 饲料使用大小鼠维持饲料, 饲料与饮用水保证定期更换, 保证饮食自由。

1.2.5 动物造模及干预

正常对照组: 正常饲养, 不做任何处理。牙周炎组: 用微量注射器在小鼠上颌第一磨牙的腭侧或下颌第一、第二磨牙的牙间乳头注射 LPS, 每周 3 次, 注射一周完成牙周炎小鼠模型构建。咬合创伤组: 75% 乙醇棉球清洁小鼠牙齿表面, 待干燥。将约 1 mm 厚的流体树脂通过两步自酸蚀光固化粘结剂粘接到小鼠上颌第一磨牙咬合面上, 粘连后每周检查树脂的固位力, 若树脂丢失, 则重新粘连, 收样前 2 周建立咬合创伤模型。牙周炎伴咬合创伤组: 先建立牙周炎伴咬合创伤小鼠模型, 在此基础上进行 LPS 注射完成建模。牙周炎伴咬合创伤+XAV939 干预组: 在成功建立牙周炎伴咬合创伤模型的基础上, 于造模结束后开始给予 YAP 抑制剂 XAV939 进行干预。XAV939 使用二甲基亚砜溶解后采用腹腔注射方式给药, 给药剂量为 5 mg/kg, 每 2 天给药 1 次, 持续干预 4 周。同时, 该组小鼠在干预期间, 咬合创伤装置保持原位, 且不再进行 LPS 注射。

1.2.6 病理切片与抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色

小鼠安乐死后取上颌骨, 经 4% 多聚甲醛固定 48 h 后, 采用 10% 乙二胺四乙酸溶液脱钙 4 周, 随后进行石蜡包埋并制备 5 μ m 连续切片。TRAP 染色参照 Sigma-Aldrich 试剂盒(货号 387A)说明书进行: 切片脱蜡后, 于 37 °C 孵育 TRAP 工作液 1 h, 苏木素复染细胞核, 中性树胶封片, TRAP 染色阳性的多核细胞(细胞核数 ≥ 3 个)被定义为破骨细胞。

1.2.7 流式细胞术

采用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(BD Biosciences, 货号 556547)进行检测: 收集细胞后经 PBS 清洗, 重悬于结合缓冲液, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 及 5 μ L 碘化丙啶, 避光孵育 15 min。使用 BD FACSCanto II 流式细胞仪进行检测, FlowJo 软件分

析早期及晚期凋亡细胞比例。

1.2.8 Western blot

细胞或小鼠牙周组织匀浆后采用含 1% 蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液(Beyotime, 货号 P0013B)冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, 美国 Bio-Rad 公司)分离蛋白, 湿转法转移至聚偏氟乙烯膜(美国 Merck 公司)。将膜与 YAP、p-YAP、JNK、RANKL、 β -actin 一抗于 4 °C 孵育过夜; 室温孵育 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 1 h。电致化学发光试剂显影, Image Lab 软件(美国 Bio-Rad 公司)定量分析灰度值, 以 β -actin 为内参。

1.2.9 qPCR

采用 TRIzol (美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA, 检测 260 nm 波长处吸光度 [$A_{(260)}$] 与 $A_{(280)}$ 比值 (1.8~2.0), 合格后, 采用 NovoScript® Plus 反转录试剂盒合成 cDNA。引物序列如下: Ankrd1 正向 5'-CTG GAA GAC CTG GTG AAG-3', 反向 5'-TGG TAG AGG TGG CAT AG-3'; Cyr61 正向 5'-CAG CTC CCT GAA AAT GAA, 反向 5'-GTT CTT GGG GTC TTT GTA; AP-1 正向 5'-CAG AGC CAG AAG TCA GAA, 反向 5'-GTT CTT GGC GTT CTC TGT; GAPDH 正向 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT-3', 反向 5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA G-3'。反应体系: NovoStart® SYBR qPCR SuperMix Plus 10 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, 最后用无酶水补足至 20 μ L, 于 ABI 7300 qPCR 仪进行反应: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 循环。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析, 以 GAPDH 为内参。

1.2.10 免疫荧光染色

细胞爬片经 4% 多聚甲醛固定 15 min, 牙周组织切片固定 48 h; 随后分别以 0.1% Triton X-100 透化 10 min (细胞) 或 20 min (组织), 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 1 h 以减少非特异性结合先后加入一抗 4 °C 孵育过夜、二抗室温避光孵育 1 h。YAP 检测采用兔源一抗及 Alexa Fluor 488 标记的二抗 (1:500, 美国 Invitrogen 公司, 货号 A-11008); JNK 检测使用兔源一抗及 Alexa Fluor 594 标记的二抗 (1:500, 美国 Invitrogen 公司, 货号 A-11012); RANKL 检测则采用兔源一抗与 Alexa Fluor 647 标记的二抗 (1:500, 美国 Invitrogen 公司, 货号 A-21245)。1 μ g/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染核 5 min 后, 中性树脂封片, 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司, 型号 Ts2-FL) 拍摄图像。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism8.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 Tukey 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

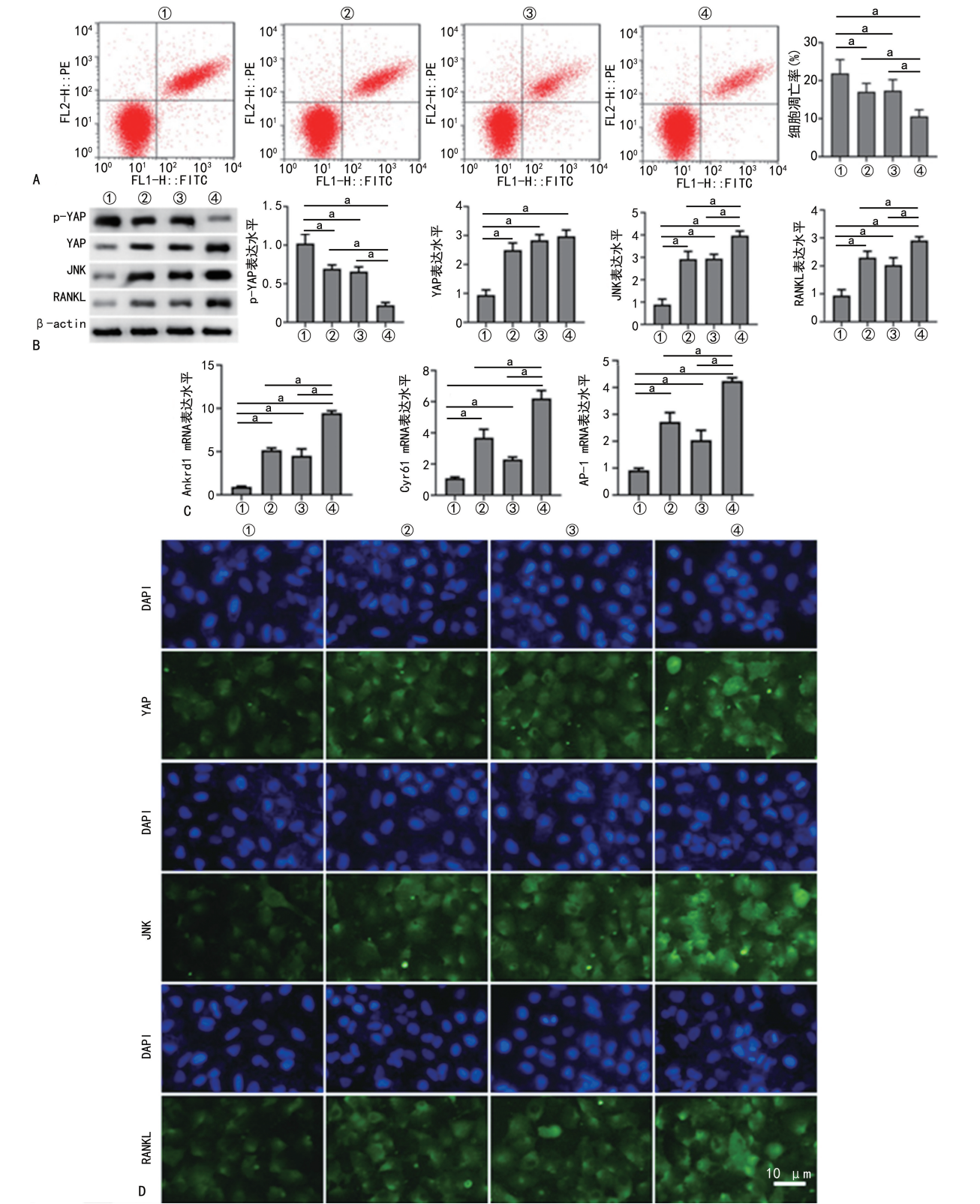
2 结果

2.1 体外应力结合 LPS 刺激对小鼠破骨细胞的刺激效果明显

通过细胞实验探究体外应力与炎症协同作用对破骨细胞活化的影响, 流式细胞术检测显示, 与正常对照组比较, 应力刺激组、LPS 刺激组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$), 而与应力刺激组及 LPS 刺激组比较, 应力+LPS 刺激组细胞凋亡率进一步降低 ($P < 0.01$), 见图 1A。Western blot 结果显示, 与正常对照组比较, 应力刺激组与 LPS 刺激组的 p-YAP 表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 而与应力刺激组及 LPS 刺激组比较, 应力+LPS 刺激组的 p-YAP 表达水平进一步降低 ($P < 0.01$)。进一步研究发现, 与正常对照组比较, 应力刺激组与 LPS 刺激组 JNK、RANKL 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 而与应力刺激组及 LPS 刺激组比较, 应力+LPS 刺激组 JNK、RANKL 表达水平进一步升高 ($P < 0.01$), 见图 1B。qPCR 结果显示, 与正常对照组比较, 应力刺激组与 LPS 刺激组中 YAP 下游靶基因 (Ankrd1、Cyr61) 及 JNK 通路转录因子 AP-1 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 而与应力刺激组及 LPS 刺激组比较, 应力+LPS 刺激组中上述基因的 mRNA 表达水平进一步升高 ($P < 0.01$), 见图 1C。

2.2 YAP 抑制剂明显逆转应力联合 LPS 刺激对破骨细胞的激活效应

流式细胞术检测结果显示, 与正常对照组比较, 应力+LPS 刺激组细胞凋亡率明显降低; 与应力+LPS 刺激组比较, 应力+LPS+XAV939 组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.001$), 见图 2A。Western blot 结果显示, 与正常对照组比较, 应力+LPS 刺激组细胞 p-YAP 表达水平明显降低 ($P < 0.001$); JNK、RANKL 表达水平明显升高 ($P < 0.001$); 与应力+LPS 刺激组比较, 应力+LPS+XAV939 组 p-YAP 表达水平明显升高 ($P < 0.001$), JNK、RANKL 表达水平明显降低 ($P < 0.001$), 见图 2B。qPCR 结果显示, 与正常对照组比较, 应力+LPS 刺激组 Ankrd1、AP-1、Cyr61 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.001$); 与应力+LPS 刺激组比较, 应力+LPS+XAV939 组 Ankrd1 ($P < 0.05$)、AP-1 ($P < 0.001$)、Cyr61 ($P < 0.05$) mRNA 表达水平明显降低, 见图 2C。免疫荧光染色显示, 与正常对照组比较, 应力+LPS 刺激组的 YAP、JNK、RANKL 表达强度增强; 与应力+LPS 刺激组比较, 应力+LPS+XAV939 组的 YAP、JNK、RANKL 表达强度减弱, 细胞核内 YAP 荧光强度也明显增强, 见图 2D。



A:流式细胞术检测各组细胞凋亡情况及定量分析图;B:Western blot 检测各组细胞 YAP、JNK、RANKL 表达及定量分析图;C:qPCR 检测各组细胞 Ankrd1、Cyr61、AP-1 mRNA 表达及定量分析图;D:免疫荧光染色检测各组细胞 YAP、JNK、RANKL(红色)表达定位(蓝色为 DAPI);①:正常对照组;②:应力刺激组;③:LPS 刺激组;④:应力+LPS 刺激组;^a: $P<0.01$ 。

图 1 应力与 LPS 刺激对破骨细胞的影响

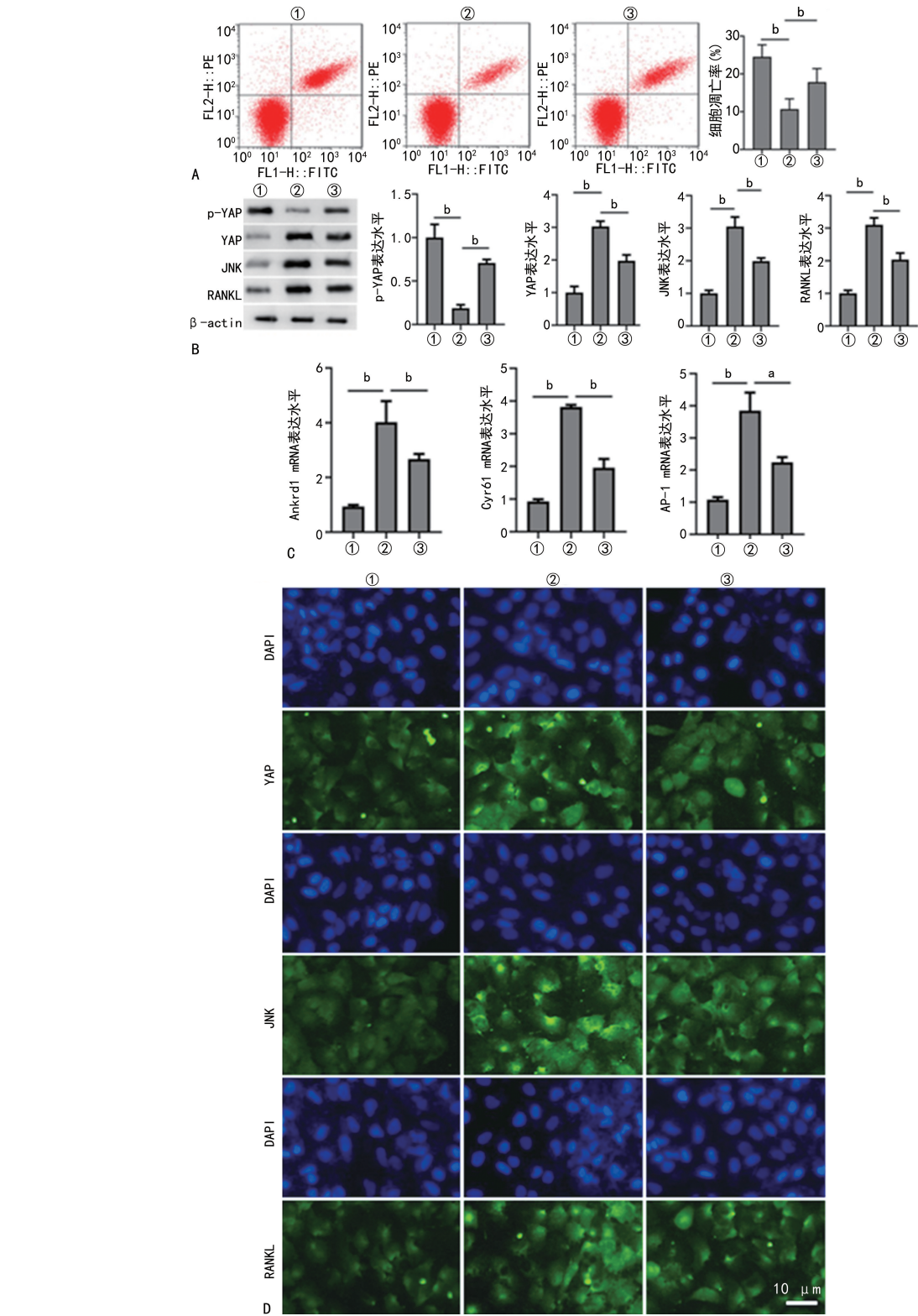
2.3 牙周炎伴咬合创伤小鼠模型明显激活 YAP/JNK/RANKL 通路并促进破骨细胞分化

在小鼠模型中,Western blot 结果显示,牙周炎伴咬合创伤组 YAP、JNK 和 RANKL 表达水平较正常

对照组明显升高($P<0.001$),且高于牙周炎组和咬合创伤组,见图 3A。qPCR 分析表明,牙周炎伴咬合创伤组 Ankrd1、Cyr61、AP-1 mRNA 表达水平较正常对照组明显升高($P<0.001$),且高于牙周炎组和咬合

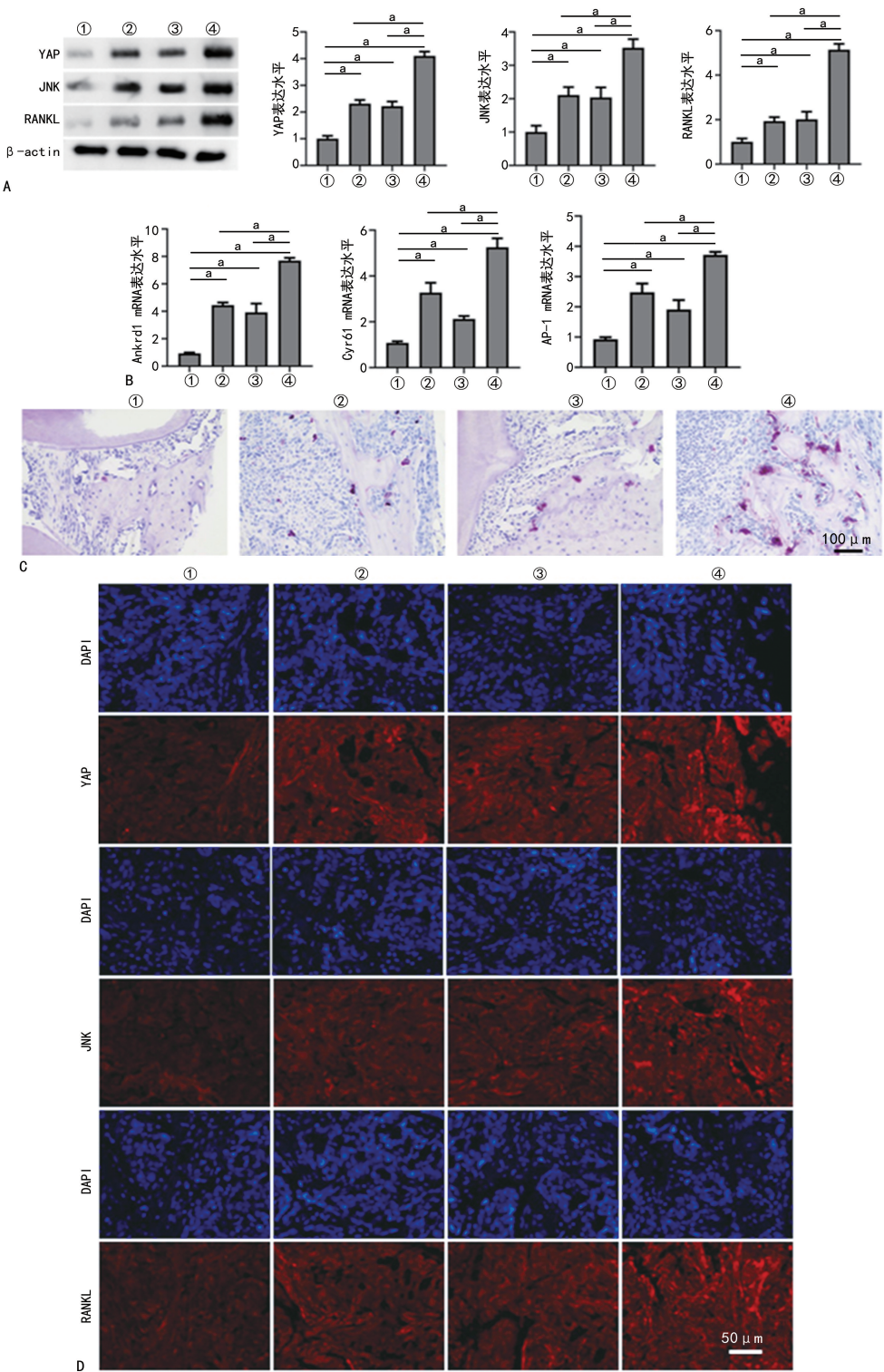
创伤组,见图 3B。TRAP 染色显示,牙周炎伴咬合创伤组牙周组织中破骨细胞数量较正常对照组明显增加,且多于单纯牙周炎组及咬合创伤组,同时细胞体积增大、核数量增多,见图 3C。免疫荧光染色进一步证实,正常对照组 YAP 蛋白主要定位于细胞质,而牙

周炎伴咬合创伤组 YAP 核内荧光强度较正常对照组明显增强,且强于单纯牙周炎组和咬合创伤组;JNK 与 RANKL 在该组的表达强度亦较正常对照组明显升高,且高于单纯牙周炎组及咬合创伤组,见图 3D。



A: 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况及定量分析图;B: Western blot 检测各组细胞 YAP/p-YAP、JNK、RANKL 表达及定量分析图;C: qPCR 检测各组细胞 Ankrd1、Cyr61、AP-1 mRNA 表达及定量分析图;D: 免疫荧光染色检测各组细胞 YAP、JNK、RANKL(红色)表达定位(蓝色为 DAPI);①: 正常对照组;②: 应力+LPS 刺激组;③: 应力+LPS 刺激+XAV939 组;^a: $P<0.05$, ^b: $P<0.001$ 。

图 2 YAP 抑制剂对破骨细胞活化的调控作用



A: Western blot 检测各组小鼠牙周组织 YAP、JNK、RANKL 表达及定量分析图; B: TRAP 染色检测各组小鼠牙周组织破骨细胞数量; C: qPCR 检测各组小鼠牙周组织 Ankrd1、Cyr61、AP-1 mRNA 表达及定量分析图; D: 免疫荧光染色检测各组小鼠牙周组织 YAP、JNK、RANKL(红色)表达定位(蓝色为 DAPI); ①: 正常对照组; ②: 牙周炎组; ③: 咬合创伤组; ④: 牙周炎伴咬合创伤组; ^a: $P < 0.001$ 。

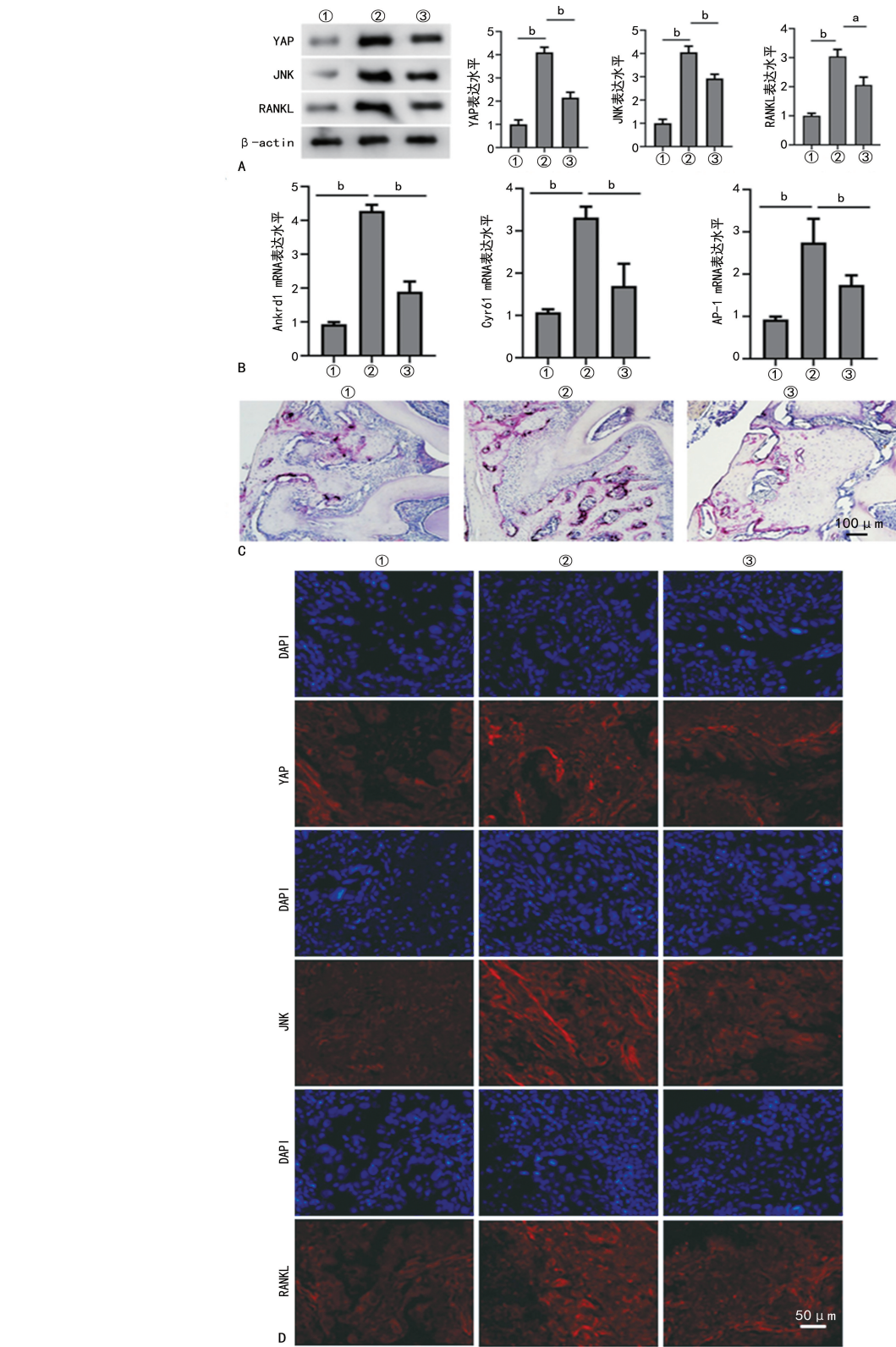
图 3 牙周炎伴咬合创伤模型对 YAP 通路及破骨细胞的影响

2.4 YAP 抑制剂明显抑制牙周炎伴咬合创伤小鼠的 YAP/JNK/RANKL 通路及破骨细胞活性

Western blot 结果显示, 牙周炎伴咬合创伤组 YAP、JNK 及 RANKL 表达水平较牙周炎组明显升高($P < 0.001$), 而牙周炎伴咬合创伤 + XAV939 组 YAP($P < 0.001$)、JNK($P < 0.001$)、RANKL($P < 0.01$)的以上蛋白表达水平较牙周炎伴咬合创伤组明

显降低, 见图 4A。qPCR 结果显示, 牙周炎伴咬合创伤组 Ankrd1、Cyr61、AP-1 mRNA 表达水平较牙周炎组明显升高($P < 0.001$), 而牙周炎伴咬合创伤 + XAV939 组上述基因 mRNA 表达水平较牙周炎伴咬合创伤组明显降低($P < 0.001$), 与牙周炎组无明显差异, 见图 4B。TRAP 染色显示, 牙周炎伴咬合创伤组牙周组织中破骨细胞数量较牙周炎组明显增加, 而牙

周炎伴咬合创伤+XAV939 组较牙周炎伴咬合创伤组明显减少,且细胞体积缩小、核数量减少,见图 4C。免疫荧光染色进一步显示,牙周炎伴咬合创伤组 YAP、JNK、RANKL 荧光强度较牙周炎伴咬合创伤组明显升高,而牙周炎伴咬合创伤+XAV939 组 YAP、JNK、RANKL 荧光强度较牙周炎伴咬合创伤组明显降低,见图 4D。



A: Western blot 检测上颌骨组织中 YAP、JNK、RANK 表达及定量分析图;B:qPCR 检测各组小鼠上颌骨组织 Ankrd1、Cyr61、AP-1 mRNA 表达及定量分析图;C:TRAP 染色检测各组小鼠上颌骨组织破骨细胞计数;D:免疫荧光染色检测各组小鼠上颌骨组织中 YAP、JNK、RANKL(红色)表达定位(蓝色为 DAPI);①:牙周炎组;②:牙周炎伴咬合创伤组;③:牙周炎伴咬合创伤+YAP 抑制剂组;^a: $P<0.01$;^b: $P<0.001$ 。

图 4 YAP 抑制剂逆转小鼠牙周炎伴咬合创伤的病理过程

3 讨 论

本研究系统探讨了 YAP 在咬合创伤协同牙周炎症加重骨吸收中的调控作用,揭示了体外机械应力与炎症信号通过 YAP/JNK/RANKL 通路驱动破骨细胞活化的分子机制。实验结果表明,体外机械应力与 LPS 刺激的联合作用明显降低 YAP 的磷酸化水平,并诱导其核转位,这一过程与 JNK 磷酸化及 RANKL 表达水平上调高度同步。YAP 的激活不仅依赖于经典的 Hippo 信号通路,更与体外机械应力直接调控其磷酸化状态密切相关^[13,22]。研究证实,YAP 核转位后上调下游靶基因(Ankrd1、Cyr61),并通过细胞骨架重组或整合素信号激活 JNK 通路;活化的 JNK 磷酸化 AP-1 转录因子,后者直接驱动 RANKL 基因转录^[23-24]。这种级联放大效应在动物模型中尤为明显:牙周炎伴咬合创伤组的 RANKL 表达水平及破骨细胞数量均明显高于牙周炎组。值得注意的是,RANKL 不仅是 YAP/JNK 通路的终末效应分子,其介导的骨吸收通过降低细胞外基质强度(如胶原降解),可能反向激活 YAP,从而形成潜在的正反馈循环,加剧骨吸收进程。这一机制或可解释为何伴咬合创伤的牙周炎患者骨破坏进展难以通过单纯控制菌斑得到缓解。

YAP 抑制剂 XAV939 的应用明显逆转了上述病理过程。在细胞实验中,XAV939 处理抑制 YAP 核转位,并明显降低 JNK 与 RANKL 的表达水平;在动物模型中,XAV939 明显减少破骨细胞数量。这种抑制作用提示,靶向 YAP 不仅能阻断机械应力信号传导,还可通过下调 JNK/AP-1 通路抑制炎症驱动的 RANKL 表达,从而实现病因性治疗。此外,免疫荧光染色显示,YAP 核定位与骨吸收区域的重叠性,提示 YAP 激活状态可能作为评估牙周炎进展的生物标志物。

YAP 的研究多聚焦在肿瘤或发育生物学,其在慢性炎症性骨病中的角色长期被忽视^[25]。本研究创新性地揭示了 YAP 在力学-炎症交叉调控中的核心枢纽作用,通过构建咬合创伤与牙周炎复合模型,证实 YAP 的激活程度与骨吸收的相关性,且抑制 YAP 可明显阻断 JNK/RANKL 通路活性,逆转骨吸收的程度。这一发现不仅为理解咬合创伤加速牙周炎骨破坏提供了分子基础,也为开发靶向力学信号通路的治疗策略开辟了新方向。然而,研究仍存在一定局限性:咬合创伤模型中机械应力尚未标准化,未来需精确模拟不同咬合力参数开展研究;此外,YAP 调控的微 RNA 或表观遗传修饰在通路中的作用仍有待探索。

值得注意的是,YAP 作为关键的信号整合因子,其调控作用并非孤立于 JNK/RANKL 通路。在复杂的牙周微环境中,YAP 可能与其他重要的骨代谢和炎症信号通路存在广泛交互。YAP 与经典的 Hippo 通路核心激酶级联哺乳动物不育-20 样激酶 1/2 (mammalian sterile 20-like kinase1/2, Mst1/2)、大

肿瘤抑制因子 1/2 (large tumor suppressor 1/2, LATS1/2) 存在紧密联系。虽然本研究观察到体外机械应力能调控 YAP 磷酸化状态,但炎症刺激(如 LPS)也可能通过激活 Hippo 上游调节因子间接影响 LATS 活性,从而协同调控 YAP 的核质穿梭^[11]。另外,YAP 与 Wnt/ β -catenin 通路的交互作用在骨稳态中也至关重要。研究显示,活化的 YAP 可与 β -catenin 竞争结合 TEAD 转录因子,或直接调控 Wnt 基因表达,影响成骨-破骨细胞平衡^[26]。在本研究观察到的骨吸收加速背景下,YAP 激活可能通过抑制成骨相关的 Wnt 信号通路或促进破骨相关因子的表达,间接加剧骨破坏。此外,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的其他成员如细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)也广泛参与机械应力和炎症诱导的细胞反应,并可能通过 p-YAP 或共享上游激酶与 YAP 信号发生交叉^[27]。

综上所述,本研究分析的 YAP/JNK/RANKL 通路是咬合创伤协同炎症加速牙槽骨吸收的重要通路。然而,骨吸收的病理进程受到包括 Hippo、Wnt/ β -catenin 及 MAPK 家族成员在内的复杂信号网络的精密调控。YAP 很可能处于这一网络的中心节点,整合来自力学刺激和生物刺激的信号,并通过与上述通路的多层次交互,最终决定破骨细胞的分化与活性。这种网络的复杂性提示,单纯靶向单一通路可能效果有限。本研究证实靶向抑制 YAP 可有效阻断这一病理进程,其优势可能在于 YAP 作为枢纽分子的位置,为伴咬合创伤的牙周炎的精准治疗提供了新思路。未来研究需进一步优化 YAP 抑制剂的局部递送系统,并探索其与现有疗法(如光动力抗菌治疗)的联合应用潜力^[28-29],以期实现从机制研究到临床转化的跨越。

参考文献

- [1] KWON T, LAMSTER I B, LEVIN L. Current concepts in the management of periodontitis[J]. Int Dent J, 2021, 71(6): 462-476.
- [2] FU Y, ZHANG S, LIU J, et al. Imbalanced EphB4/EphrinB2 signaling modulates bone resorption in periodontitis induced by porphyromonas gingivalis[J]. ACS Infect Dis, 2024, 10(4): 1152-1161.
- [3] 刘倍伶, 黄姣, 白远亮, 等. 牙周治疗对牙周炎患者口腔健康相关生活质量的影响研究[J]. 重庆医学, 2021, 50(19): 3351-3355.
- [4] ROJASAWASTHIEN T, SRITHANYARAT S S, BULANAWICHIT W, et al. Effect of mechanical force stress on the inflammatory response in human periodontal ligament cells[J]. Int Dent J, 2024, 75(1): 117-126.
- [5] LIU X, LI J, YUE Y, et al. Mechanisms of me-

- chanical force aggravating periodontitis: a review[J]. *Oral Dis*, 2024, 30(3): 895-902.
- [6] PAN W, YANG L, LI J, et al. Traumatic occlusion aggravates bone loss during periodontitis and activates Hippo-YAP pathway[J]. *J Clin Periodontol*, 2019 Apr; 46(4): 438-447.
- [7] ZHOU J, GUO L, YANG Y, et al. Mechanical force regulates root resorption in rats through RANKL and OPG[J]. *BMC Oral Health*, 2022, 22(1): 290.
- [8] MAYAHARA K, OKUMA R, SASAGAWA T, et al. Effects of low-level laser irradiation on osteoclastogenesis in prostaglandin E2-stimulated macrophages[J]. *Lasers Med Sci*, 2025, 40(1): 163.
- [9] YU Q, GUO K, YANG Y, et al. LncRNA ADAMTS9-AS2 regulates periodontal ligament cell migration under mechanical compression via ADAMTS9/fibronectin [J]. *J Periodontal Res*, 2024, 59(1): 174-186.
- [10] UCHINUMA M, TAKETA NI Y, KANAYA R, et al. Role of Piezo1 in modulating the RANKL/OPG ratio in mouse osteoblast cells exposed to porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and mechanical stress[J]. *J Periodontal Res*, 2024, 59(4): 749-757.
- [11] HENG B C, ZHANG X, AUBEL D, et al. An overview of signaling pathways regulating YAP/TAZ activity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(2): 497-512.
- [12] REGGIANI F, GOBBI G, CIARROCCHI A, et al. YAP and TAZ are not identical twins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2021, 46(2): 154-168.
- [13] LIN S, HE X, WANG Y, et al. Emerging role of lncRNAs as mechanical signaling molecules in mechanotransduction and their association with Hippo-YAP signaling: a review[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2024, 25(4): 280-292.
- [15] LI B, HE J, LV H, et al. c-Abl regulates YAP-PY357 phosphorylation to activate endothelial atherogenic responses to disturbed flow[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(3): 1167-1179.
- [16] LUSINI M, NENNA A, CHELLO C, et al. Role of autophagy in aneurysm and dissection of the ascending aorta[J]. *Future Cardiol*. 2020 Sep; 16(5): 517-526.
- [17] PANDYA M, GOPINATHAN G, TILLBERG C, et al. The Hippo Pathway Effectors YAP/TAZ are essential for mineralized tissue homeostasis in the alveolar bone/periodontal complex[J]. *J Dev Biol*, 2022, 10(1): 14.
- [18] XIANG L, ZHANG X, YU H, et al. Overexpression of α CGRP promotes osteogenesis of periodontal ligament cells by regulation of YAP signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 5077-5085.
- [19] JANG H Y, KIM J M, KIM J S, et al. Protaetia brevitaris extract attenuates rankl-induced osteoclastogenesis by inhibiting the JNK/NF- κ B/PLC γ 2 signaling pathway[J]. *Nutrients*, 2023, 15(14): 3193.
- [20] 邹林洪, 胡丹, 张琳林, 等. OPG/RANKL/RANK 调节系统与大鼠慢性牙周炎发展的相关性分析[J]. *重庆医学*, 2016, 45(31): 4334-4336.
- [21] KRISHNACOUMAR B, STENZEL M, GARBAGAOGLU H, et al. Caspase-8 promotes scramblase-mediated phosphatidylserine exposure and fusion of osteoclast precursors [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 40.
- [22] AN L, NIE P, CHEN M, et al. MST4 kinase suppresses gastric tumorigenesis by limiting YAP activation via a non-canonical pathway [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(6): e20191817.
- [23] TAN K, WANG J, SU X, et al. KAT6A/YAP/TEAD4 pathway modulates osteoclastogenesis by regulating the RANKL/OPG ratio on the compression side during orthodontic tooth movement[J]. *Prog Orthod*, 2024, 25(1): 29.
- [24] WU L, OU Z, LIU P, et al. ATXN3 promotes prostate cancer progression by stabilizing YAP [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 152.
- [25] THOMPSON B J. YAP/TAZ: drivers of tumor growth, metastasis, and resistance to therapy [J]. *Bioessays*, 2020, 42(5): e1900162.
- [26] LI K, LIU L, LIU H, et al. Hippo/YAP1 promotes osteoporotic mice bone defect repair via the activating of Wnt signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2024, 116: 111037.
- [27] ZHANG J, WANG S, YU J, et al. A dual role of HGF-ERK signaling in il6/hgf-induced hepatocyte proliferation [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2025, 19(9): 101538.
- [28] GUO J, WANG M F, YUAN S J, et al. Photo-controlled co-delivery of verteporfin and acriflavine via platelets achieves potentiated glioblastoma-targeted photodynamic therapy [J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 371.
- [29] SONG M, ZHU L, ZHANG L, et al. Combination of molecule-targeted therapy and photodynamic therapy using nanoformulated verteporfin for effective uveal melanoma treatment[J]. *Mol Pharm*, 2024, 21(5): 2340-2350.