

马钱苷对成骨细胞及成骨细胞–破骨细胞耦联的影响

王玉 杨林涛 孙博宇 刘宇 兰天 曾以德*

(山东中医药大学中医药创新研究院, 济南 250355)

摘要 该研究在促进成骨细胞分化的基础上, 探讨马钱苷(Loganin)对成骨细胞–破骨细胞耦联功能的影响。以小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)和小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)为实验对象, 通过CCK-8法检测Loganin对MC3T3-E1细胞活性的影响; 碱性磷酸酶(ALP)染色、ALP活性试剂盒及茜素红染色评估Loganin对成骨细胞分化的影响; qRT-PCR法检测成骨分化相关基因的表达情况; Western blot法检测成骨分化相关蛋白的表达情况; 共培养系统检测Loganin对成骨细胞–破骨细胞耦联的影响; TRAP染色和F-actin染色评估破骨细胞形成及破骨细胞吸收功能; qRT-PCR法检测破骨分化相关基因的表达。结果显示, Loganin在一定浓度范围(0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$)内显著提高MC3T3-E1细胞的活性、ALP活性以及促进矿化结节的形成, 且具有浓度依赖性。此外, Loganin(1 $\mu\text{mol/L}$)显著上调成骨分化标志物Runx2、OSX和OPG的基因表达水平以及Runx2、OPG和ALP的蛋白表达水平, 并且下调RANKL的基因及蛋白表达水平。共培养实验中, 含Loganin的条件培养基显著抑制破骨细胞及F-actin吸收环的形成, 且下调CTSK、TRAP基因的表达。因此, Loganin在促进成骨分化的基础上, 可能通过上调OPG和下调RANKL来影响成骨细胞–破骨细胞的耦联, 进而抑制破骨细胞的生成功能和破骨细胞的吸收功能, 调节骨代谢平衡。

关键词 马钱苷; MC3T3-E1细胞; RAW264.7细胞; 成骨细胞–破骨细胞耦联

Effects of Loganin on Osteoblasts and Coupling Activities between Osteoblasts and Osteoclasts

WANG Yu, YANG Lintao, SUN Boyu, LIU Yu, LAN Tian, TSENG Yiider*

(Innovation Research Institute of Traditional Chinese Medicine,
Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract Building on its effect in promoting osteoblast differentiation, this study investigated how Loganin influences the coupling between osteoblasts and osteoclasts. To investigate the effects of Loganin on the coupling activities between osteoblasts and osteoclasts based on the promotion of osteoblast differentiation by Loganin. Using mouse embryonic osteoblast precursor cells (MC3T3-E1) and mouse mononuclear macrophage leukemia cells (RAW264.7) as experimental models, the effects of Loganin on MC3T3-E1 cell viability were assessed using the CCK-8 assay. The ALP (alkaline phosphatase) staining, ALP activity assay, and alizarin red staining were applied to evaluate the Loganin's impact on osteoblast differentiation. The qRT-PCR was utilized to detect the transcriptions of osteoblast differentiation-related genes, and Western blot were applied to analyze the expressions of

收稿日期: 2025-04-29

接受日期: 2025-05-13

国家自然科学基金青年基金(批准号: 82305051)和山东省自然科学基金创新发展联合基金(批准号: ZR2022LZY023)资助的课题

*通信作者。Tel: 0531-89628012, E-mail: ytseng@sducm.edu.cn

Received: April 29, 2025

Accepted: May 13, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (Grant No.82305051) and the Innovation and Development Joint Fund of Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant No.ZR2022LZY023)

*Corresponding author. Tel: +86-531-89628012, E-mail: ytseng@sducm.edu.cn

related proteins. The effects of Loganin on the coupling activities between osteoblasts and osteoclasts were examined using a co-culture system. The formation of osteoclasts and their resorption function were assessed by TRAP staining and F-actin staining; and the expression of osteoclast differentiation-related genes was detected by qRT-PCR. The results showed that Loganin significantly enhanced the viability, ALP activity, and mineralized nodule formation of MC3T3-E1 cells within a certain concentration range (0.1 $\mu\text{mol/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$) in a concentration-dependent manner. Moreover, Loganin (1 $\mu\text{mol/L}$) significantly upregulated the gene expression levels of osteoblast differentiation markers *Runx2*, *OSX*, and *OPG*, as well as the protein expression levels of Runx2, OPG, and ALP, while downregulating the gene and protein expression levels of RANKL. In co-culture experiments, the conditioned medium from the Loganin group significantly inhibited the formation of osteoclasts and F-actin rings and downregulated the expression of *CTSK* and *TRAP* genes. Therefore, Loganin not only promotes osteoblast differentiation but also affects the coupling function between osteoblasts and osteoclasts by upregulating OPG and downregulating RANKL, thereby inhibiting the generation and resorption function of osteoclasts and regulating bone metabolism balance.

Keywords Loganin; MC3T3-E1 cells; RAW264.7 cells; osteoblast-osteoclast coupling

骨质疏松症是一种以骨量减少和骨微结构破坏为特征的代谢性骨病,其主要表现为骨骼脆性增加,进而显著升高骨折的风险^[1]。随着老龄化的进展,骨质疏松症所衍生的各种问题愈发严重,成为社会不可忽视的负担。与此同时,随着生命科学研究的进展,对于骨质疏松症病因病机有了更多的认识,所研发出的治疗药物在一定程度上也显著地改善了骨质疏松症的症状^[2]。

近年来的研究揭示成骨细胞与破骨细胞之间有着复杂的分子交互网络。而这个交互网络是维持骨代谢动态平衡的关键^[3]。成骨细胞在骨形成过程中不仅发挥着合成和矿化骨基质的作用,而且分泌调节因子对破骨细胞的分化和活性进行精细调控,以确保骨吸收和骨形成之间的适度协调与平衡^[4]。一旦这种耦联机制被打破,骨代谢常会发生紊乱,例如,破骨细胞的过度激活会导致骨吸收功能过度活跃,进而导致骨质疏松症^[5]。然而,在临床治疗中,长期使用抗骨吸收药物也可能打破耦联的平衡。例如,地舒单抗是一种抑制破骨细胞激活、分化和存活药物,可显著降低绝经后妇女的椎体、非椎体和髋部骨折风险^[6]。然而长期使用地舒单抗不仅抑制骨吸收功能,还会导致骨形成抑制^[7]。因此找寻安全、有效的药物具有重要临床意义。

中医药因其多靶点、多成分且低成本的特点,在骨质疏松症的治疗中具有独特的优势和广阔的前景。在中医“肾主骨”理论的指导下,研究发现补肾中药及其活性成分常具有促进成骨细胞分化、抑

制破骨细胞活性的双向调控作用^[8]。近年来已有研究开始关注中药对成骨细胞与破骨细胞间耦联的影响^[9-10],但细胞间耦联关系的复杂性使其尚未成为广泛研究的焦点,这一领域仍需进一步探索。马钱苷(Loganin)是从中药山茱萸中提取的活性成分,其具有促进成骨细胞分化等作用^[11],因此,本研究旨在探讨Loganin是否可以影响成骨细胞-破骨细胞耦联并对其机制展开深入研究,以期骨质疏松症的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 小鼠胚胎成骨细胞前体细胞MC3T3-E1(目录号:SCSP-5218)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7(货号:CL-0190)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 马钱苷(货号:IL0200)购自北京索莱宝科技有限公司。 α -MEM(货号:G4554)、茜素红(货号:G1038)和CCK-8试剂(货号:G4103)均购自武汉赛维生物技术有限公司;胎牛血清(货号:35081-CV)购自美国Corning公司;地塞米松(货号:D137736)、抗坏血酸(货号:A103533)和 β -甘油磷酸钠五水化合物(货号:D106347)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;RANKL(货号:462-TEC-010)购自美国R&D Systems公司;逆转录试剂盒(货号:G592)和荧光定量PCR试剂盒(货号:

G891)购自美国ABM公司; BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒(货号: C3206)购自上海碧云天生物技术有限公司; 碱性磷酸酶测定试剂盒(货号: A059)购自南京建成生物工程研究所; Runt-相关转录因子-2(Runx2)抗体(货号: 12556)购自美国Cell Signaling Technology公司; 骨保护素(OPG)抗体(货号: ab183910)购自英国Abcam公司; 碱性磷酸酶(ALP)抗体(货号: db11188)购自杭州戴格生物科技有限公司; 核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)抗体(货号: 66610)购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号: AC026)、山羊抗兔二抗(货号: AS028)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.1.3 仪器 仪器包括: 二氧化碳培养箱(中国力康生物医疗科技控股集团)、细胞计数仪(美国DeNovix公司)、活细胞多功能检测仪(德国BMG公司)、一体化显微成像系统(日本KEYENCE公司)、超微量分光光度计(美国DeNovix公司)、荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司)、超灵敏多功能成像仪(美国Cytiva公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8实验检测细胞活性 取第4代MC3T3-E1细胞、RAW264.7细胞以每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于96孔板中, 待24 h细胞贴壁后, 更换培养基为含0、0.01、0.1、1、10和100 $\mu\text{mol/L}$ Loganin的完全培养基对细胞进行干预, 24 h后将10 μL CCK-8的试剂加入不同浓度Loganin的细胞组别中, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育2 h, 然后在活细胞多功能检测仪上以波长450 nm的入射光测定各组别培养基的吸光度(D)值, 根据公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = [(D_{\text{实验}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}})] \times 100\%。$$

1.2.2 碱性磷酸酶染色及活性检测 以每孔 1×10^5 个细胞的密度, 将MC3T3-E1细胞接种于两个6孔板中。待细胞融合至60%~70%后, 分别更换为含0.01 $\mu\text{mol/L}$ 、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$ Loganin的成骨诱导培养基(α -MEM+10% FBS+50 $\mu\text{g/mL}$ 抗坏血酸+10 mmol/L β -甘油磷酸钠五水合物+10 nmol/L地塞米松), 每隔2日换液1次。7天后去除培养基, 在室温下以4%多聚甲醛对其中一个6孔板的细胞进行10 min的固定, 并以PBS清洗3次, 每次3 min。于每孔加入1 mL的BCIP/NBT碱性磷酸酶显色工作液, 在室温下

避光孵育30 min后, 去除工作液并以ddH₂O冲洗2次, 终止显色反应, 在一体化显微成像系统下对细胞进行观察并拍照。与此同时, 更换另一6孔板的原培养液为200 μL 的细胞裂解液, 根据碱性磷酸酶试剂盒的说明书进行活性检测, 以活细胞多功能检测仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度(D)值。

1.2.3 茜素红染色及定量分析 细胞培养及给药同2.2。在干预21天后, 弃去培养基, 以PBS洗涤3次, 在室温下用10%福尔马林对细胞进行固定30 min, 然后以PBS洗3次, 每次10 min。在弃去PBS后, 每孔细胞加入2 mL茜素红染液, 在室温孵育10 min后, 以PBS洗至液体近无色, 于一体化显微成像系统下观察并拍照。同时待孔板干燥后, 在每孔加入1 mL的10%氯化十六烷基吡啶溶液溶解矿化结节, 并使用活细胞多功能检测仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度(D)值。

1.2.4 成骨细胞条件培养基的制备 MC3T3-E1细胞在80%融合后, 更换为成骨诱导培养基及含1 $\mu\text{mol/L}$ Loganin的成骨诱导培养基, 继续培养24 h。24 h后, 弃去培养基, 预热的PBS缓冲液轻柔冲洗2次, 添加无血清 α -MEM, 继续培养MC3T3-E1细胞24 h。24 h后收集各组培养基, 以4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$ 离心10 min, 去除细胞碎片和大分子颗粒。离心结束后, 用移液枪轻取上清, 并采用0.22 μm 滤膜过滤, 以确保培养基中无细胞和大分子污染物。将过滤后的培养基与破骨分化诱导培养基(α -MEM+10% FBS+50 ng/mL RANKL)按1:1混合后作为破骨诱导分化条件培养基。

1.2.5 TRAP染色检测条件培养基对破骨细胞分化的影响 采用间接共培养模型观察Loganin对成骨细胞-破骨细胞耦联的影响。将RAW264.7细胞以每孔 3×10^3 个细胞的密度接种于96孔板中, 培养24 h。按照下列分组添加条件培养基: 对照组(成骨分化诱导培养基组上清+破骨分化诱导培养基); Loganin组(Loganin干预组培养基上清+破骨分化诱导培养基)。隔日全换液1次, 连续培养7天, 直到出现大量破骨细胞。使用4%多聚甲醛室温固定细胞10 min, PBS缓冲液漂洗3次, 加入0.2% Triton X-100进行透膜, PBS缓冲液漂洗3次, 加入TRAP孵育工作液, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱, 避光孵育20 min。染色结束, 弃去染色液, 蒸馏水漂洗3次, 在显微镜下观察并拍照, 随后计数。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名 Gene name	引物序列 Primer sequence	序列编号 Sequence ID
<i>OSX</i>	5'-GGC TTT TCT GCG GCA AGA GGT T-3' 5'-CGC TGA TGT TTG CTC AAG TGG TC-3'	NM_130458
<i>Runx2</i>	5'-CCT GAA CTC TGC ACC AAG TCC T-3' 5'-TCA TCT GGC TCA GAT AGG AGG G-3'	MP214929
<i>OPG</i>	5'-CGG AAA CAG AGA AGC CAC GCA A-3' 5'-CTG TCC ACC AAA ACA CTC AGC C-3'	MP217752
<i>TRAP</i>	5'-GCG ACC ATT GTT AGC CAC ATA CG-3' 5'-CGT TGA TGT CGC ACA GAG GGA T-3'	NM_007388
<i>CTSK</i>	5'-AGC AGA ACG GAG GCA TTG ACT C-3' 5'-CCC TCT GCA TTT AGC TGC CTT TG-3'	NM_007802
<i>RANKL</i>	5'-GTG AAG ACA CAC TAC CTG ACT CC-3' 5'-GCC ACA TCC AAC CAT GAG CCT-3'	NM_011613
<i>β-actin</i>	5'-CAT TGC TGA CAG GAT GCA GAA GG-3' 5'-TGC TGG AAG GTG GAC AGT GAG G-3'	NM_007393

所有引物来源均为小鼠。

All primers were derived from mice.

1.2.6 F-actin染色检测Loganin对破骨细胞功能的影响 细胞培养部分同2.5, 直至出现成熟多核破骨细胞。4%福尔马林室温固定细胞30 min, 0.1% Triton X-100处理5 min以透膜, 再用鬼笔环肽染液(1:200)避光染色30 min, 最后用Hoechst(1:500)染核10 min, PBS洗涤后在一体式显微镜下拍照分析, 并计算F-actin吸收环的大小。

1.2.7 qRT-PCR法检测成骨分化相关基因及破骨分化相关基因 细胞接种及给药方式同2.2及2.5。Loganin干预72 h后, 使用RNAEasy Fast细胞RNA提取试剂盒对RNA进行提取, 用超微量分光光度计在波长260和280 nm处测定吸光度(*D*)值。cDNA模板使用ALL-IN-ONE 5× RT MasterMix生成。成骨分化相关基因(*Runx2*、*OSX*、*OPG*、*RANKL*)与破骨分化相关基因(*TRAP*、*CTSK*)的表达水平通过实时荧光定量PCR(qRT-PCR)采用SYBR Green qPCR Mix进行检测。反应条件为: 93 °C酶激活180 s; 然后94 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 共45个循环。在所有分析中, 以 β -actin的表达水平作为内参对照, 引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测定靶基因的表达水平, 所有实验均重复进行3次。

1.2.8 Western blot法检测成骨分化及破骨分化相关标志物表达情况 Loganin干预MC3T3-E1细胞48 h后, 提取总蛋白, 使用BCA蛋白检测试剂盒测

定蛋白浓度。蛋白与上样缓冲液按比列混合以制备蛋白上样体系, 使用7.5%~12.5%的聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE蛋白分离, 后续使用无蛋白快速封闭液室温封闭15 min后, 分别以Runx2(1:5 000)、OPG(1:1 000)、ALP(1:5 000)、RANKL(1:1 000)、 β -actin(1:10 000)的抗体4 °C孵育过夜。采用超灵敏多功能成像仪(Amersham ImageQuant)可视化蛋白的信号, 最后用ImageJ软件进行分析, 以 β -actin的信号强度为内参对其他信号强度进行归一化。相对表达量=目的蛋白表达量/内参蛋白表达量。

1.2.9 统计学分析 结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 实验数据均采用GraphPad Prism 10.0.0软件进行统计分析。符合正态分布的多组间数据比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两组间比较采用*t*检验进行分析。*P*<0.05表示差异具有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 Loganin对MC3T3-E1细胞生长的影响

以CCK-8试剂对细胞进行毒性测试, 为后续实验选择Loganin对细胞干预的安全浓度。结果显示Loganin在0.01 μ mol/L时对MC3T3-E1细胞的活性无显著影响, 在0.1 μ mol/L以上时对细胞的活性有影响。其中, 在0.1 μ mol/L和1 μ mol/L的浓度下, 细胞活性增

高($P<0.05$), 10 $\mu\text{mol/L}$ 则使细胞活性降低($P<0.05$)。但是在100 $\mu\text{mol/L}$ 时MC3T3-E1细胞的活性明显的降低($P<0.01$)(图1)。这个结果显示10 $\mu\text{mol/L}$ 以上的Loganin可能对MC3T3-E1细胞产生毒性。因此选择安全无毒的Loganin浓度范围($\leq 1 \mu\text{mol/L}$)进行后续实验。

2.2 Loganin促进成骨细胞的分化

在成骨前体细胞分化为成骨细胞之后, ALP活性增高。因此, 以碱性磷酸酶对细胞染色可以显示细胞ALP的程度, 染色强度越显著, 细胞ALP的程度越高。在对MC3T3-E1细胞进行7天分化培养后, 碱性磷酸酶活性的定量分析结果显示Loganin干预细胞的浓度在0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时ALP活性与对照组相比无显著变化, 而经过0.1 $\mu\text{mol/L}$ 和1 $\mu\text{mol/L}$ 干预后细胞的ALP活性显著升高($P<0.05$)(图2A和图2C)。在成骨诱导21天后, 以茜素红染色分析矿化结节数量和大小, 结果显示矿化的结节数量和大小均有显著增加, 提示Loganin能够促进成骨细胞的矿化(图2B和图2D)。结合CCK-8细胞活性、碱性磷酸酶染色和茜素红染色的分析结果, 发现1 $\mu\text{mol/L}$ 的Loganin具有更显著促进MC3T3-E1细胞活化与分化的效果。据此, 在后续采用Loganin干预的实验均以1 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度进行。

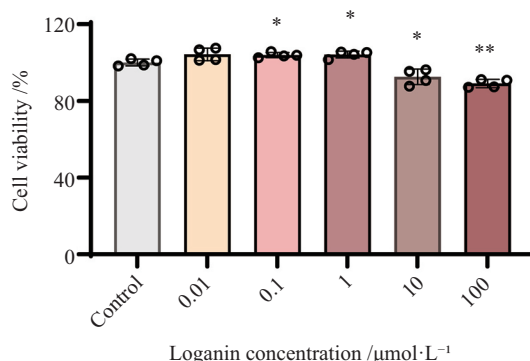
2.3 Loganin促进成骨细胞分化后相关基因、蛋白的表达

在分子层面以qRT-PCR以及Western blot测量Runx2、OSX、OPG和RANKL等成骨细胞分子标记基因和蛋白的表达情况, 用以了解在Loganin干预下MC3T3-E1细胞向成骨细胞分化的程度。由qRT-PCR

结果可见, Loganin的干预上调了MC3T3-E1细胞中Runx2($P<0.05$)、OSX($P<0.01$)和OPG($P<0.001$)基因的表达量(图3A~图3C)。RANKL基因的表达量则在Loganin干预后显著下调($P<0.01$)(图3D)。Western blot结果显示Loganin对Runx2、OSX和OPG三种成骨分化标志蛋白表达的上调作用($P<0.05$), 同时下调RANKL蛋白的表达($P<0.01$)(图3E~图3I)。由此结果显示Loganin能够促进MC3T3-E1细胞(成骨前体细胞)向成骨细胞分化。

2.4 Loganin对成骨细胞-破骨细胞耦联活性的影响

采用Loganin干预后的成骨细胞分化条件培养基与RAW264.7细胞共培养的方式评价Loganin对成骨细胞-破骨细胞耦联功能的影响。其中, RAW264.7分化为破骨细胞后, 经TRAP染色呈现为淡红色。因此, 以TRAP染色结果来评估RAW264.7细胞的破骨分化能力。本实验以含有Loganin的成骨细胞分化培养基对成骨前体细胞进行培养后, 将此培养基用来培养RAW264.7细胞。结果显示, RAW264.7细胞的破骨分化不如相同状况下没有Loganin的成骨细胞分化培养基, 即Loganin会抑制破骨细胞的形成(图4A和图4B)。在分子层面, 通过qRT-PCR检测破骨细胞标志基因的表达情况以明确Loganin干预成骨细胞后的条件培养基对RAW264.7细胞向破骨细胞分化的影响。qRT-PCR结果显示Loganin干预成骨细胞后的条件培养基可以下调破骨细胞中的TRAP基因表达水平($P<0.0001$), 而对CTSK基因的表达水平没有显著影响(图4C和图4D)。F-actin环的形成是破骨细胞从运动状态转变为吸收状态的关键步骤。F-actin染色可以评估破骨细胞的

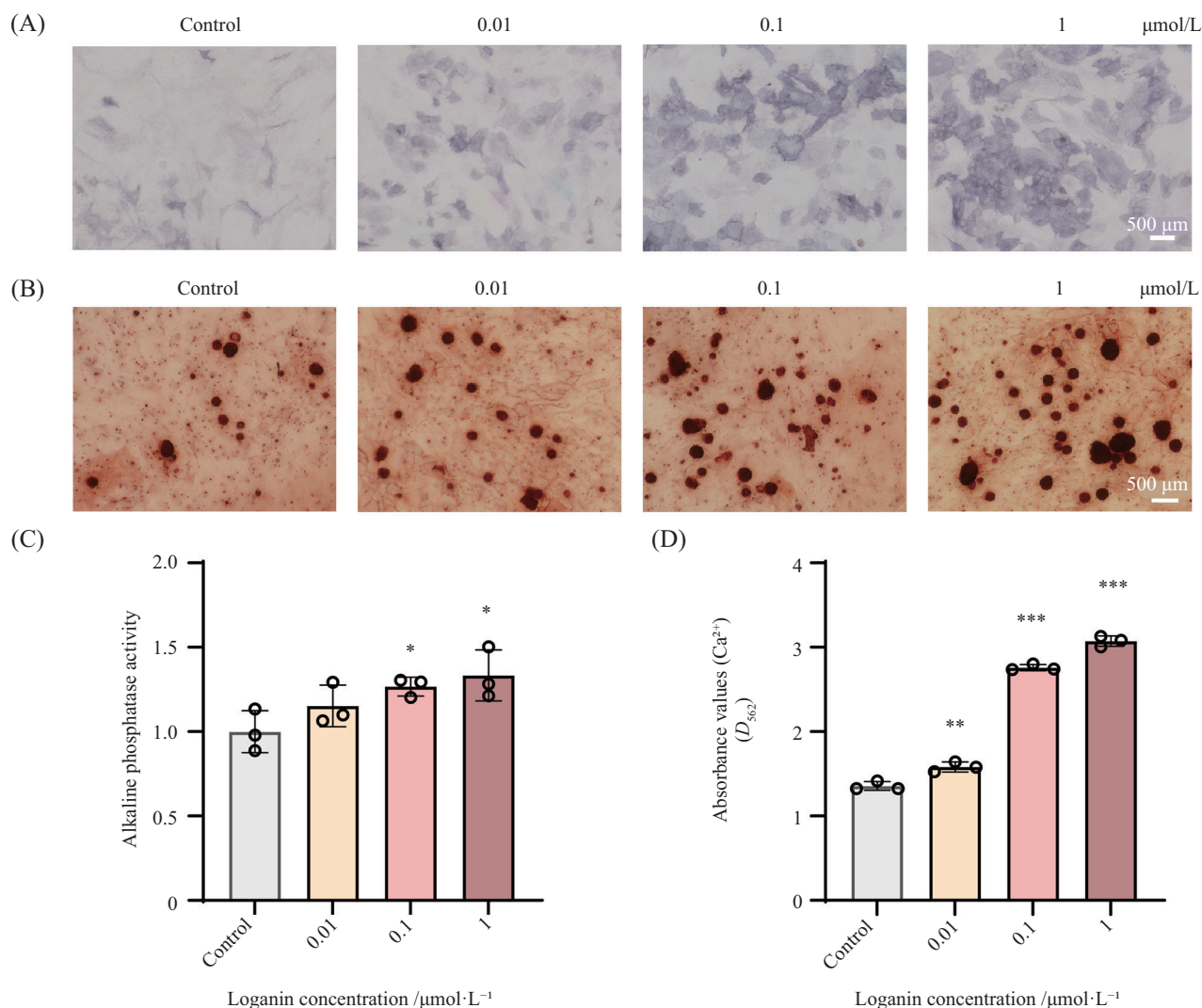


* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the control group.

图1 不同浓度Loganin对MC3T3-E1细胞活性的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of Loganin on the proliferative activity of MC3T3-E1 cells



A: 各浓度的Loganin成骨诱导7天后的碱性磷酸酶染色; B: Loganin成骨诱导21天后茜素红染色, 可见红褐色矿化结节沉积; C: 碱性磷酸酶活性的定量分析; D: Loganin成骨诱导21天后茜素红染色定量分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

A: alkaline phosphatase staining after 7 days of osteogenic induction by various concentrations of Loganin; B: alizarin red staining after 21 days of osteogenic induction by Loganin, showing brownish-red mineralized nodules; C: quantitative analysis of alkaline phosphatase activity; D: quantitative analysis of alizarin red staining after 21 days of osteogenic induction by Loganin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control group.

图2 Loganin对MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶的影响

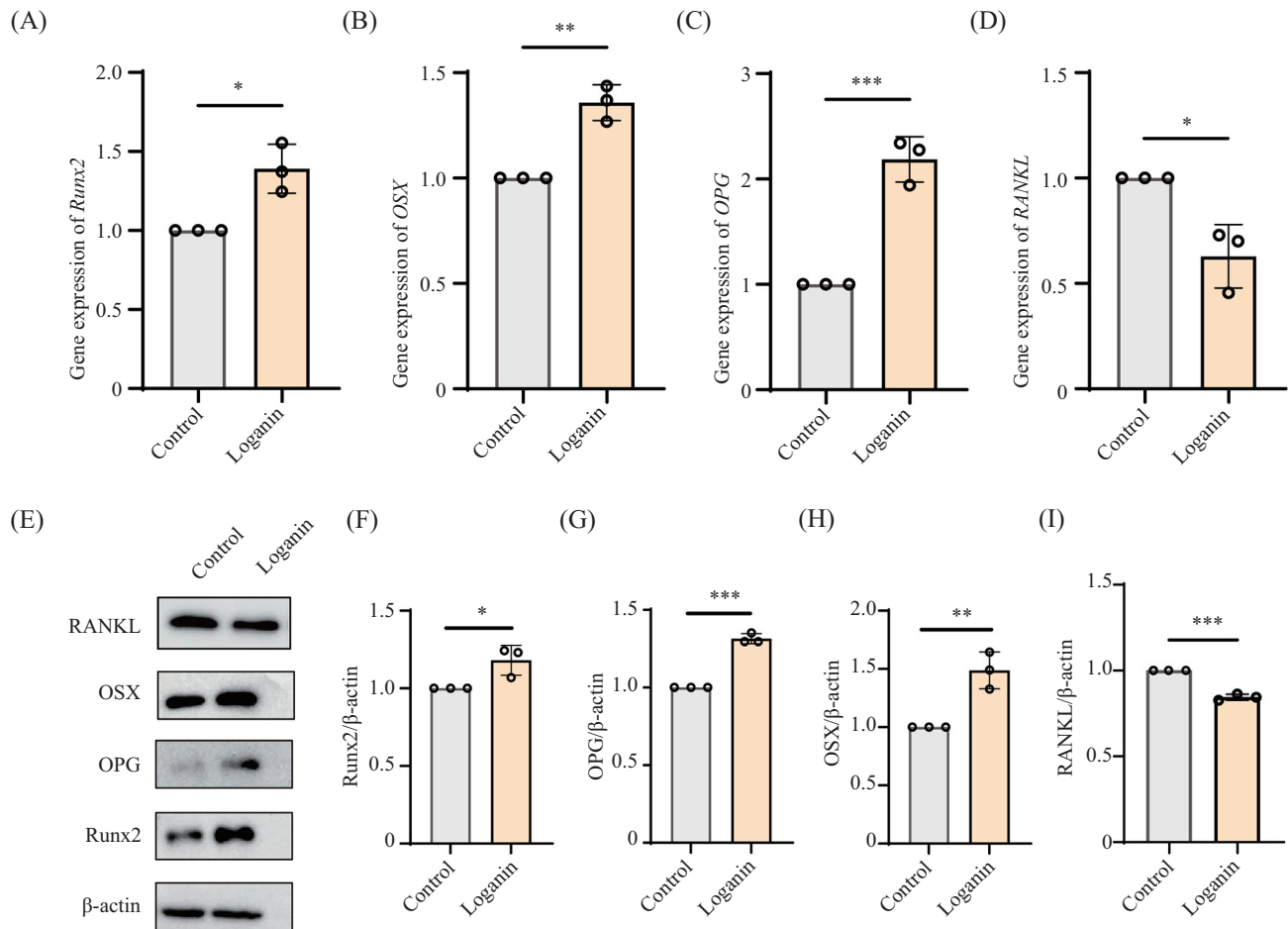
Fig.2 Effects of Loganin on alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells

骨吸收功能是否正常。染色后F-actin的闭合环形结构越多, 代表具有骨吸收功能的破骨细胞越多。在本实验中发现, 在Loganin干预成骨细胞后的条件培养基组中, 破骨细胞的F-actin环显著减少($P < 0.001$)。据此, Loganin能够通过调节成骨细胞分泌耦联因子(如RANKL和OPG)抑制破骨前体细胞向破骨细胞分化, 以成骨细胞-破骨细胞耦联的方式对骨组织进行干预。

3 讨论

成骨细胞与破骨细胞之间的耦联是维持骨

代谢平衡的关键机制, 涉及多种细胞因子和信号通路的复杂调控。成骨细胞能够通过分泌多种活性物质对破骨细胞的增殖、分化和功能进行精细调控, 从而影响骨吸收过程。这些活性物质包括RANKL、OPG、M-CSF、IL-6、CX3CL1、MCP-1、IGF、LPA等蛋白, 同时还有多种miRNA^[12]。其中, RANKL是成骨细胞分泌的关键因子, 它与破骨细胞前体细胞表面的RANK结合, 促进破骨细胞的分化和成熟, 增强骨吸收活性。而OPG作为RANKL的诱饵受体, 对RANKL与RANK的结合有着竞争性的关系, 从而抑制破骨细胞的形成和活性, 维持



A~D: 依次为Loganin成骨诱导后的MC3T3-E1细胞中Runx2、OSX、OPG与RANKL基因的表达; E: Loganin成骨诱导后的MC3T3-E1细胞中Runx2、OPG、OSX与RANKL蛋白的Western blot结果图; F~I: 依次为Runx2、OPG、OSX与RANKL蛋白的定量结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组比较。

A~D: the expression of Runx2, OSX, OPG, and RANKL genes in MC3T3-E1 cells following osteogenic induction by Loganin; E: Western blot analysis of Runx2, OPG, OSX and RANKL proteins in MC3T3-E1 cells following osteogenic induction by Loganin; F~I: quantitative analysis of Runx2, OPG, OSX, and RANKL proteins. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with the control group.

图3 Loganin对MC3T3-E1细胞成骨分化相关基因、蛋白的表达的影响

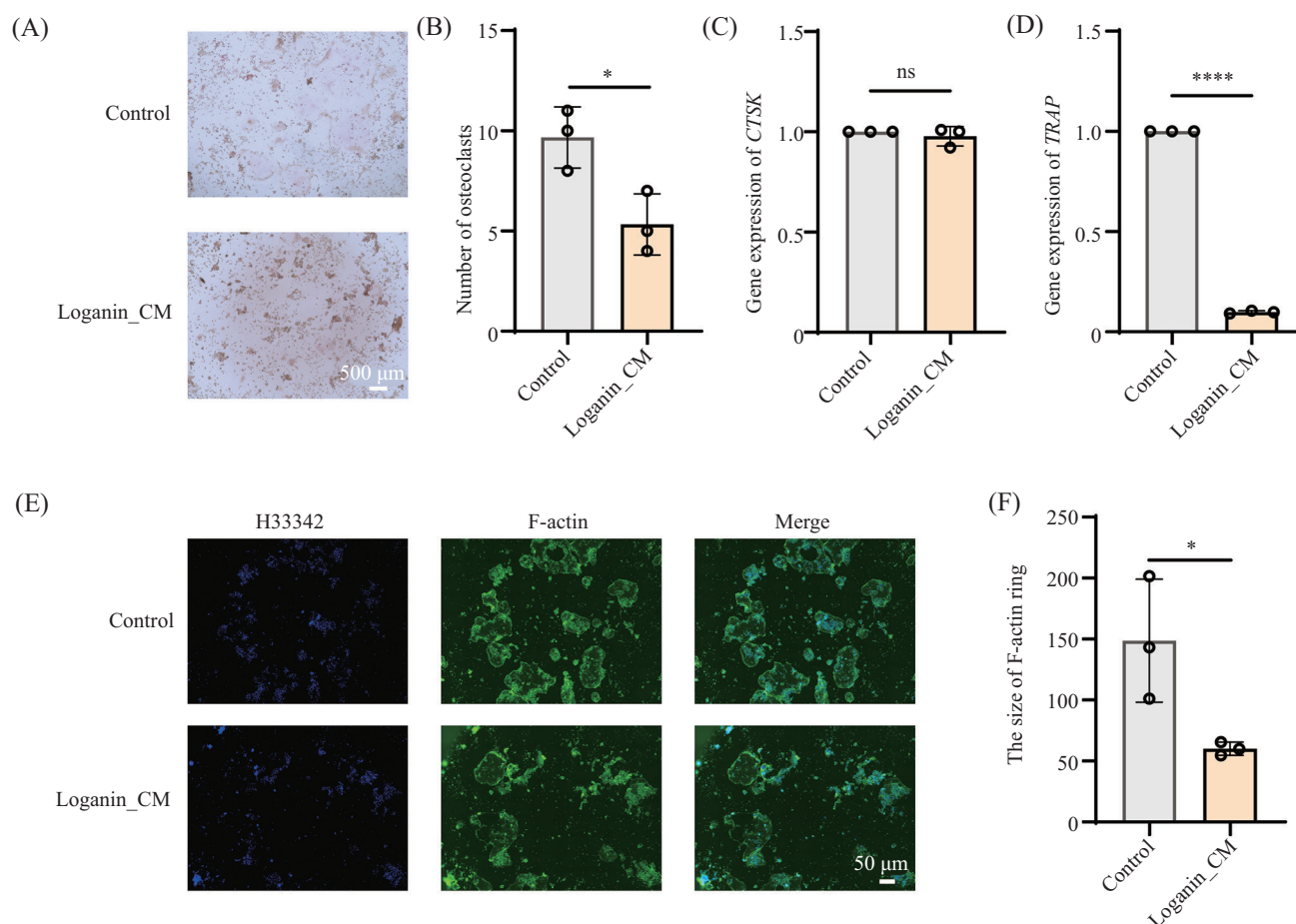
Fig.3 The effects of Loganin on the expression of osteogenic differentiation-related genes and proteins in MC3T3-E1 cells

骨吸收与骨形成的平衡^[13]。此外,成骨细胞分泌的IL-18、IL-33和miR-503等同样具有抑制破骨细胞活性的作用^[14-15]。这些因子通过复杂的信号通路和分子机制,调节成骨细胞与破骨细胞之间的耦联关系。

本研究证实山茱萸的活性成分Loganin不仅能够显著促进成骨前体细胞向成骨细胞的分化,而且通过同时下调RANKL和上调OPG,使得OPG/RANKL的值显著上升。这种变化直接抑制破骨细胞的形成,减少其数量,同时降低成熟破骨细胞的活性,并抑制骨吸收环的形成。这一结果表明,Loganin不仅直接作用于成骨前体细胞,促进其分化和活化,还通过调节成骨细胞分泌耦联因子(如RANKL和OPG),间接抑

制破骨前体细胞向破骨细胞分化,从而维持骨代谢的动态平衡。这个机制体现了中药多靶点、双向调节的优势。

综上所述,本研究为开发基于Loganin的新型骨质疏松症治疗药物提供了重要的实验依据。然而,本研究也存在一定的局限性,目前尚缺乏必要的干预实验或阻断性实验来直接验证这一机制,未来需要开展相关实验进一步加以明确。此外,本实验仅在体外细胞模型中进行,尚未验证Loganin在体内的作用效果,未来的研究应通过体内实验进一步验证Loganin的作用机制。同时,在未来的研究中,应更加关注如何通过调节成骨细胞与破骨细胞之间的耦联机制,开发出既能抑制骨吸收又能促进骨形成的



A: 条件培养基对破骨细胞生成的影响, Control组由成骨分化诱导培养基组上清+破骨分化培养基进行干预; Loganin_CM组由Loganin干预组培养基上清+破骨分化诱导培养基进行干预; B: 各组破骨细胞数统计分析; C: 条件培养基对*CTSK*基因表达的影响; D: 条件培养基对*TRAP*基因表达的影响; E: 各组细胞F-actin染色结果; F: 各组F-actin吸收环大小的定量分析。* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$, 与对照组比较。

A: the effect of conditioned medium on osteoclastogenesis, the control group was treated with osteoblast differentiation induction medium supernatant+osteoclast differentiation medium; the Loganin_CM group was treated with Loganin intervention medium supernatant+osteoclast differentiation induction medium; B: statistical analysis of osteoclast numbers in each group; C: the effect of conditioned medium on *CTSK* gene expression; D: the effect of conditioned medium on *TRAP* gene expression; E: F-actin staining results in each group; F: quantitative analysis of F-actin ring sizes in each group. * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$, ^{ns} $P > 0.05$ compared with the control group.

图4 Loganin对成骨细胞-破骨细胞耦联的影响

Fig.4 The effects of Loganin on osteoblast-osteoclast coupling

新型药物, 以实现更精准、更有效的骨质疏松症治疗。

参考文献 (References)

- [1] COMPTON J E, MCCLUNG M R, LESLIE W D. Osteoporosis [J]. Lancet, 2019, 393(10169): 364-76.
- [2] ROCHO F R, BONATTO V, LAMEIRO R F, et al. A patent review on cathepsin K inhibitors to treat osteoporosis (2011-2021) [J]. Expert Opin Ther Pat, 2022, 32(5): 561-73.
- [3] KIM J M, LIN C, STAVRE Z, et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis [J]. Cells, 2020, 9(9): 2073.
- [4] CHEN X, WANG Z, DUAN N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions [J]. Connect Tissue Res, 2018, 59(2): 99-107.
- [5] ZHAO W, LI J, SU T, et al. Osteoclast activation and inflammatory bone diseases: focusing on receptors in osteoclasts [J]. J Inflamm Res, 2025, 18: 3201-13.
- [6] KENDLER D L, COSMAN F, STAD R K, et al. Denosumab in the treatment of osteoporosis: 10 years later: a narrative review [J]. Adv Ther, 2022, 39(1): 58-74.
- [7] FERRARI S, LANGDAHL B. Mechanisms underlying the long-term and withdrawal effects of denosumab therapy on bone [J]. Nat Rev Rheumatol, 2023, 19(5): 307-17.
- [8] 肖亚平, 曾杰, 焦琳娜, 等. 补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J]. 中国中药杂志(XIAO Y P, ZENG J, JIAO L N, et al. Research progress on the treatment of osteoporosis with kidney-tonifying Chinese medicine and its regulation of signaling pathways [J]. China Journal of Chinese Materia Medica), 2018, 43(1): 21-30.
- [9] 朱在师, 黄泽灵, 蔡伟业, 等. 基于“阴阳平衡”探讨知母皂苷 BII-淫羊藿苷协同对破骨细胞-成骨细胞耦联功能的影响

- 响[J/OL]. 中国实验方剂学杂志(ZHU Z S, HUANG Z L, CAI W Y, et al. Effects of anemarsaponin BII and icariin combination on osteoclast-osteoblast coupling function based on “Yin-Yang balance” theory [J/OL]. China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae). <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20250342>, 2025-07-31.
- [10] 金昱彤. 基于成骨-破骨细胞耦联红景天苷经HIF-1 α 通路调控破骨细胞表型表达的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2022.
- [11] XI Y, HOU X, HUANG Y, et al. Loganin attenuates the inflammation, oxidative stress, and apoptosis through the JAK2/STAT3 pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2025, 34(1): 108114.
- [12] 任明诗, 丁羽, 李子涵, 等. 成骨细胞与破骨细胞相互调节作用的研究进展[J]. 中国药理学通报(REN M S, DING Y, LI Z H, et al. Research progress on the mutual regulation between osteoblasts and osteoclasts [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2022, 38(6): 822-7.
- [13] EL-MASRI B M, ANDREASEN C M, LAURSEN K S, et al. Mapping RANKL- and OPG-expressing cells in bone tissue: the bone surface cells as activators of osteoclastogenesis and promoters of the denosumab rebound effect [J]. Bone Res, 2024, 12(1): 62.
- [14] SALEH H, EELES D, HODGE J M, et al. Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation *in vitro* [J]. Endocrinology, 2011, 152(5): 1911-22.
- [15] WANG Q, SHEN X, CHEN Y, et al. Osteoblasts-derived exosomes regulate osteoclast differentiation through miR-503-3p/Hpse axis [J]. Acta Histochemica, 2021, 123(7): 151790.