

特女贞苷靶向 RANKL 蛋白和 PI3K/Akt 信号通路改善绝经后骨质疏松症的作用研究

钟玉环*, 王雪阳, 黄伟毅, 李泽平, 张锐祺, 何婷婷

福建中医药大学 中西医结合学院 中西医结合研究院, 福建 福州 350122

摘要: **目的** 探讨特女贞苷对绝经后骨质疏松症 (PMOP) 的防治作用及其分子作用机制。 **方法** 体外培养成骨细胞与核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 诱导的 RAW264.7 细胞 (破骨细胞), 加入 0 (对照组)、5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的特女贞苷溶液处理 72 h, 茜素红染色观察特女贞苷对成骨细胞成熟和分化的影响; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 检测成骨细胞 Runt 相关转录因子 2 (Runx2)、碱性磷酸酶 (ALP)、Osterix、骨保护素 (OPG)/RANKL mRNA 和蛋白表达; qRT-PCR 检测破骨细胞中基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、c-FOS、活化 T 细胞核因子 c1 (NFATc1)、组织蛋白酶 K (CTSK) mRNA 水平, Western blotting 检测破骨细胞中 c-FOS、NFATc1、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6)、p-磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/PI3K、p-蛋白激酶 B (Akt)/Akt 蛋白表达; 体内实验建立去卵巢大鼠 PMOP 模型, 给予特女贞苷低、高剂量 (1、2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 干预 8 周, Masson 染色观察胫骨结构; Micro-CT 检测胫骨骨小梁数量 (TB.N)、骨小梁相对体积 (BV/TV)、骨小梁厚度 (TB.Th)、骨小梁分离指数 (TB.Sp); ELISA 法检测外周血中骨特异性碱性磷酸酶 (BALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRAP-5b)、CTSK、 β -骨胶原交联 (β -CTX)、肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6 水平; qRT-PCR 检测骨组织中 Runx2、Osterix、OPG/RANKL、NFATc1、c-FOS、TRAF6 mRNA 水平; Western blotting 检测骨组织中 NFATc1、c-FOS、TRAF6 蛋白表达。 **结果** 成骨细胞: 与对照组比较, 特女贞苷 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组矿化度显著增加 ($P<0.05$), Runx2、ALP、Osterix、OPG/RANKL mRNA 和蛋白水平显著升高 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。破骨细胞: 与对照组比较, 特女贞苷组的 MMP9、c-FOS、NFATc1、CTSK mRNA 水平显著下降 ($P<0.05$ 、0.01), c-FOS、NFATc1、TRAF6、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达显著下调 ($P<0.05$ 、0.01)。动物实验: 与模型组比较, 特女贞苷低、高剂量组骨小梁面积明显上升 ($P<0.01$); TB.Th、TB.N 和 BV/TV 值显著提高 ($P<0.05$ 、0.01), TB.Sp 值显著降低 ($P<0.01$); 外周血中 BALP 水平显著上升 ($P<0.01$), TRAP-5b 水平显著下降 ($P<0.01$ 、0.001), CTSK、 β -CTX 水平显著降低 ($P<0.01$), TNF- α 、IL-6 水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001); 骨组织中 Runx2、Osterix、OPG/RANKL mRNA 水平显著上升 ($P<0.001$), NFATc1、c-FOS、TRAF6 mRNA 水平显著下降 ($P<0.01$ 、0.001); NFATc1、c-FOS、TRAF6 蛋白含量显著下降 ($P<0.05$ 、0.01)。 **结论** 特女贞苷通过调控 RANKL/RANK 及 PI3K/Akt 信号通路, 发挥促成骨、抑破骨的双重作用。

关键词: 特女贞苷; 核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL); 成骨细胞; 破骨细胞; 绝经后骨质疏松症; PI3K/Akt

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)12-3458-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.005

Effect of specnuezhenide on treatment of postmenopausal osteoporosis by targeting RANK protein and PI3K/Akt signaling pathway

ZHONG Yuhuan, WANG Xueyang, HUANG Weiyi, LI Zeping, ZHANG Ruiqi, HE Tingting

Academy of Integrative Medicine, College of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To investigate the preventive and therapeutic effects of specnuezhenide on postmenopausal osteoporosis (PMOP) and its molecular mechanism. **Methods** Osteoblasts and RAW264.7 cells (osteoclasts) induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) were cultured *in vitro*. The cells were treated with 0 (control group), 5, and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ loganin solution for 72 h. Alizarin red staining was used to observe the effects of loganin on osteoblast maturation and differentiation. Real-

收稿日期: 2025-07-20

基金项目: 福建省卫健委中医处科技计划项目 (2021zyyj58); 福建省自然科学基金项目 (2022J01131153); 福建省教育厅 2022 年度福建省中青年骨干教师教育科研项目 (科技类) (JAT220136)

*通信作者: 钟玉环, 从事中西医结合防治老年性骨病研究。E-mail: yuhuan_zhong@126.com

time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of Runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALP), Osterix, osteoprotegerin (OPG)/RANKL in osteoblasts. qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP9), *c-FOS*, nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1), and cathepsin K (CTSK) in osteoclasts. Western blotting was used to detect the protein expression of c-FOS, NFATc1, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), p-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/PI3K, and p-protein kinase B (Akt)/Akt in osteoclasts. *In vivo* experiments were conducted to establish a PMOP model in ovariectomized rats. Low and high doses of loganin (1 and 2 mg·kg⁻¹) were administered for 8 weeks. Masson staining was used to observe the tibial structure. Micro-CT was used to detect the trabecular bone number (TB.N), trabecular bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (TB.Th), and trabecular separation (TB.Sp) of the tibia. ELISA was used to detect the levels of bone-specific alkaline phosphatase (BALP), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP-5b), CTSK, β -C-terminal telopeptide of type I collagen (β -CTX), tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukin (IL)-6 in peripheral blood. qRT-PCR was used to detect the mRNA levels of Runx2, Osterix, OPG/RANKL, NFATc1, *c-FOS*, and TRAF6 in bone tissue. Western blotting was used to detect the protein expression of NFATc1, *c-FOS*, and TRAF6 in bone tissue. **Results** Osteoblasts: Compared with the control group, the mineralization degree in the 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ loganin groups was significantly increased ($P < 0.05$), and the mRNA and protein levels of Runx2, ALP, Osterix, and OPG/RANKL were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). Osteoclasts: Compared with the control group, the mRNA levels of MMP9, *c-FOS*, NFATc1, and CTSK in the loganin groups were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01), and the protein expression of c-FOS, NFATc1, TRAF6, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt was significantly downregulated ($P < 0.05$, 0.01). Animal experiments: Compared with the model group, the trabecular bone area in the low and high-dose loganin groups was significantly increased ($P < 0.01$); TB.Th, TB.N, and BV/TV values were significantly increased ($P < 0.05$, 0.01), and TB.Sp values were significantly decreased ($P < 0.01$). The levels of BALP in peripheral blood significantly increased ($P < 0.01$), while the levels of TRAP-5b significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001), and the levels of CTSK and β -CTX significantly decreased ($P < 0.01$). The levels of TNF- α and IL-6 also significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). In bone tissue, the mRNA levels of Runx2, Osterix, and OPG/RANKL significantly increased ($P < 0.001$), while the mRNA levels of NFATc1, *c-FOS*, and TRAF6 significantly decreased ($P < 0.01$, 0.001). The protein contents of NFATc1, *c-FOS*, and TRAF6 also significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Specnue exerts dual effects of promoting osteogenesis and inhibiting osteoclastogenesis by regulating the RANKL/RANK and PI3K/AKT signaling pathways.

Key words: specnuezenide; receptor activator of nuclear factor- κB ligand (RANKL); osteoclasts; osteoporosis; postmenopausal osteoporosis; PI3K/Akt

绝经后骨质疏松症 (PMOP) 是原发性骨质疏松症最常见的类型之一, 主要发生于中老年女性。其核心特征是骨密度降低和骨微观结构变化, 导致骨脆性增加和骨折风险显著上升^[1]。PMOP 主要由绝经后雌激素水平急剧下降引发, 雌激素的缺乏导致成骨细胞促进的骨形成和破骨细胞调节的骨吸收之间的平衡被破坏, 造成骨重塑过程失衡^[2]。研究显示, 约 80% 的老年骨折与骨质疏松密切相关, 其中髋部、脊柱等部位的骨折常伴随高致残率和致死率^[3], 因此如何有效预防及治疗 PMOP 是当前临床面临的主要难题。

近年来, 随着中药现代化研究的不断推进, 中药活性成分在调节成骨与破骨细胞平衡方面显示出良好前景, 为 PMOP 提供了新型治疗策略^[4]。特女贞苷是传统中药女贞子中可溶性裂隙环环状糖苷的活性成分^[5], 且具有多种药理作用。众多研究表明, 特女贞苷具有抗炎、免疫调节和抗衰老的特

性, 其机制可能与对 p66Shc、促分裂原活化的蛋白激酶 (MAPK) /胞外信号调节激酶 (ERK)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) /血管内皮生长因子 (VEGF) 等氧化应激及炎症相关信号通路的抑制有关^[6-10]。既往研究表明, 特女贞苷可通过抑制核因子 κB 受体活化因子配体 (RANKL) 诱导的破骨细胞生成改善糖尿病诱导的骨质流失^[11]。目前尚无关于特女贞苷治疗 PMOP 的研究, 本实验通过体内外实验系统探讨了特女贞苷在调控成骨、破骨细胞功能中的作用, 重点考察其对 RANKL/RANK 通路及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号轴的影响, 为特女贞苷预防和治疗 PMOP 的可能性提供参考。

1 材料

1.1 实验细胞

成骨细胞, 从出生后 72 h SD 乳鼠颅骨中提取; RAW264.7 细胞 (武汉生物公司, 货号 CL-0190)。

1.2 实验动物

30 只 SPF 级 1 月龄雌性 SD 大鼠 30 只, 体重 (200±20) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(沪)2017-0005, 于福建中医药大学动物实验中心统一喂养, 室内温度为 (25±1) °C, 空气湿度为 (50±10) %, 每 12 小时明暗循环交换, 大鼠可自由摄食和饮水。出生后 72 h SD 乳鼠, 由福建中医药大学动物实验中心提供, 动物使用许可证编号为 SYXK(闽)2019-0007。本研究已获福建中医药大学实验动物伦理委员会审批通过, 审批编号 FJTCM IACUC 2021110。

1.3 药品与主要试剂

特女贞苷(宝鸡市辰光生物科技有限公司, 货号 HS19591S1, 质量分数 98%), 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制成 0.1 g·mL⁻¹ 液; 戊酸雌二醇片 (EV, 批号 558A, 拜耳医药保健有限公司广州分公司)。

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 检测试剂盒 (货号 J22405)、骨保护素 (OPG) 检测试剂盒 (货号 J22902)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5b (TRAP-5b) 检测试剂盒 (货号 J23072)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 检测试剂盒 (货号 J22380), 武汉吉立德生物科技有限公司; 骨特异性碱性磷酸酶 (BALP) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号 A059-2); β -骨胶原交联 (β -CTX) 检测试剂盒 (广州奥瑞达生物, 货号 ARD40115); 组织蛋白酶 K (CTSK) 检测试剂盒 (上海江莱生物科技有限公司, 货号 JL11782-96T); 活化 T 细胞核因子 c1 (NFATc1) 抗体 (武汉博士德生物技术公司, 货号 A00340-1); c-FOS 抗体 (货号 66590-1-Ig)、GAPDH 抗体 (货号 60004-1-Ig)、兔二抗 (货号 SA00001-9)、Akt 抗体 (货号 10176-2-AP), 美国 Proteintech 公司; 肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 抗体 (货号 ab137452)、p-PI3K(p85) 抗体 (货号 ab138364)、p-PI3K 抗体 (货号 ab138364), 美国 abcam 公司; RANKL 抗体 (货号 sc-377079)、OPG 抗体 (货号 sc-390518)、碱性磷酸酶 (ALP) 抗体 (货号 sc-271431)、Osterix 抗体 (货号 sc-393325), Santacruz 公司; Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 抗体 (货号 12556S)、PI3K 抗体 (货号 60225-1-Ig)、p-Akt (S473) (货号 S473), 美国 CST 公司。

1.4 主要仪器

Centrifuge-5424R 低温超高速离心机 (德国艾本德生命科技有限公司); Universal Hood II 化学发

光成像系统、Power pac basic 小型垂直电泳槽工具槽 (美国伯乐生命科学有限公司); Cascada III.I 超纯水净化系统 (加拿大 PALL 公司); GL-1800 干式恒温器 (海门其林贝尔仪器制造有限公司); KQ-500DE 台式超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); HFU586 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 提取颅骨成骨细胞

选择出生 72 h SD 乳鼠, 快速脱颈处死后, 用 75% 乙醇消毒后, 移入生物安全柜内, 剪断颈部, 分离头盖骨, 浸泡在 PBS 中, 剪刀、镊子在酒精灯上灼烧, 冷却后将头盖骨表面的组织清除干净; 转至新的培养皿中, 将头盖骨尽量剪碎, 弃去 PBS, 加入 6 mL 胰酶, 37 °C 培养箱消化 10 min 后, 移液枪吹打, 弃去胰酶, 加入 6 mL 0.2% I 型胶原酶, 再次放入培养箱消化 30 min, 中间每隔 10 min 吹打混匀 1 次, 60 min 后, 将胶原酶液收集到离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min。离心后能看到沉淀。弃去上清, 用 α -MEM (含 10% FBS+1% 青链霉素) 重悬, 放入培养箱培养 12 h, 培养后可看到细胞贴壁为梭形、锥形和多边形。培养箱内培养 12 h, 换液, PBS 清洗后继续培养, 每天观察状态。传至第 3 代时, 备用。

2.2 细胞分组及给药

将成骨细胞和 RAW 264.7 细胞以 1×10^5 ·孔⁻¹ 分别种植于 6 孔板, 培养过夜后, 分别加入 0 (对照组)、5、10 μ mol·L⁻¹ 的特女贞苷溶液处理 72 h, 其中 RAW 264.7 细胞培养液中还需加入 50 ng·mL⁻¹ RANKL 以诱导分化破骨细胞^[12], 分别连续给药 24、48 h 换液 1 次。

2.3 茜素红染色

培养 7 d 后各组成骨细胞弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次; 4% PFA 室温固定 30 min。用 PBS 轻轻冲洗细胞 2 次, 加入适量茜素红染色液 3~5 min。弃染色液, 用 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次, 并加入适量 PBS 避免细胞干燥。显微镜下观察拍照, 钙质结节与茜素红染料结合后呈现橘红色。10% 氯化十六烷基吡啶溶液溶解钙化结节, 取溶解液置于 96 板内, 用酶标仪 (405 nm) 下读取吸光度 (A) 值。

2.4 动物分组、造模及给药

雌性 SD 大鼠适应性喂养 7 d, 行双侧卵巢切除术模拟人 PMOP。用 1% 戊巴比妥钠 (50 mg·kg⁻¹) ip

麻醉，手术部分剪毛发消毒，从腹中线与股骨头连线中点依次剪开皮层、肌层，进入腹腔后沿子宫双侧探及左右末端卵巢进行结扎切除术后将腹壁逐层缝合。术后 3 d 连续 ip 青霉素（每只 8 万单位）防止感染。假手术组 6 只大鼠除未切除卵巢外与上述手术组步骤一致，余下 24 只进行双侧卵巢切除术后随机分为模型组、EV (0.1 mg·kg⁻¹) 组和特女贞苷低、高剂量 (1、2 mg·kg⁻¹) 组，ig 给药 8 周后，腹主动脉取外周血、胫骨、股骨进行检测。

2.5 Masson 染色

取胫骨组织进行石蜡切片，脱蜡至水，丽春红染色，磷钼酸处理，苯胺蓝染色，分化，脱水封片，显微镜镜检，图像采集，Image J 软件分析骨小梁面积。

2.6 Micro-CT 检测

使用 Quantum GX2 扫描及分析所有大鼠左侧

股骨标本，测量参数包括骨小梁数量 (TB.N)、骨小梁相对体积 (BV/TV)、骨小梁厚度 (TB.Th)、骨小梁分离指数 (TB.Sp)。

2.7 血清 BALP、TRAP-5b、CTSK、β-CTX、TNF-α、IL-6 水平检测

大鼠腹主动脉取血 5 mL，放置于含有肝素的抗凝离心管中，4 ℃、2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min，取上清液放于-80 ℃冰箱中备用，按照试剂检测盒说明书进行操作检测指标水平。

2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞及骨组织相关因子表达

提取细胞/胫骨组织总 RNA，取 2 μg RNA 进行逆转录合成 cDNA，完成 PCR 扩增，以 GAPDH 为内参。引物序列见表 1，实验重复 3 次，取均值。目的基因用 2^{-ΔΔCt} 计算相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (3'→5')
GAPDH	TGACCACAGTCCATGCCATC	GACGGACACATTGGGGGTAG
RUNX2	GTAAAGCGTATCACCCCTCGT	TCAGCGATTTGTGGATGTGT
Osterix	GCTCGTAGATTTCTATCCTC	CTTAGTGACTGCCTAACAGA
ALP	ACACCTTGTGGTTACTGCTGA	CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA
OPG	GAAGCAACTCAAAATTGTGGAA	TCAGCCAATTCGGTATAATCTTG
RANKL	AGACACAGAAGCACTACCTGACTC	GGCCCCACAATGTGTTGTA
NFATc1	ACCACCTTCCGCAACCA	GGTACTGGCTTCTCTCCGTTTC
c-FOS	ATGGGCTCTCCTGTCAACAC	GGCTGCCAAAATAAACTCCA
TRAP	AGGACGTGTTCTCTGACCG	CGCAAACGGTAGTAAGGG
基质金属蛋白酶9 (MMP9)	GCTTCTGTCCTACTCGAGCC	ACAGGCTGTACCCTTGGTCT
CTSK	CTGTGGAAGAAGACCCACGG	ACTTCTTCGCTGGTCATGTCT

2.9 Western blotting 检测细胞及骨组织相关因子表达

提取细胞/胫骨组织蛋白，采用 BCA 定量分析，100 ℃下经 10 min 水浴变性，配制 10% 浓度凝胶，采用 80 V 电压电泳 30 min 后，调至电压 120 V 电泳 60 min 分离蛋白，在 100 V、60 min 条件下进行转膜至 PVDF 上，加入 5% 脱脂牛奶 4 ℃ 封闭过夜，丢弃封闭液，TBST 洗膜 3 次，每次 10 min，加入一抗 [NFATc1 抗体 1：1 000、C-FOS 抗体 1：1 000、TRAF6 抗体 1：2 000、GAPDH 抗体 1：5 000、RANKL 抗体 1：2 000、Runx2 抗体 1：2 000、OPG 抗体 1：1 000、ALP 抗体 1：1 500、Osterix 抗体 1：2 000、p-PI3K 抗体 1：2 000、PI3K 抗体 1：4 000、p-PI3K (p85) 抗体 1：2 000、p-Akt (S473) 1：1 000、Akt 抗体 1：1 000]，4 ℃ 封闭过夜，TBST

洗膜 3 次、每次 10 min，加入二抗 (1：20 000)，常温孵育 2 h，相同洗膜条件洗膜后加入荧光液在凝胶成像系统显影，Image J 软件对所得条带灰度值进行半定量分析，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白的相对表达含量

2.10 统计学分析

数据使用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行可视化处理和统计学分析，实验数据均符合正态分布，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用单因素方差分析进行多组间样本均数比较，用 *t* 检验进行组间两两比较。

3 结果

3.1 细胞实验

3.1.1 茜素红染色观察特女贞苷对成骨细胞成熟和分化的影响 结果如图 1 所示，在 10 μmol·L⁻¹ 浓度下，钙化结节显著增多；采用 Image J 进一步对

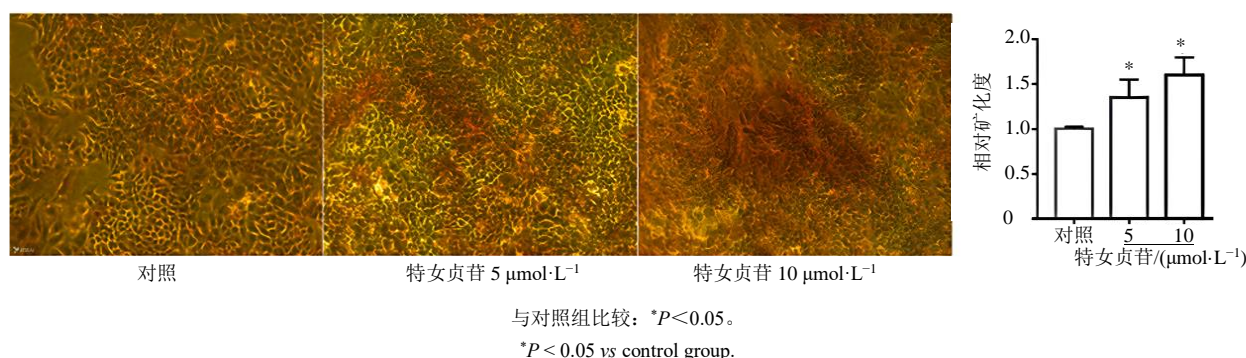


图 1 茜素红染色观察特女贞苷对成骨细胞成熟和分化的影响 (×200)

Fig. 1 Alizarin red staining to observe effect of specnue on maturation and differentiation of osteoblasts (×200)

矿化结节进行半定量分析, 与对照组比较, 特女贞苷 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组矿化度显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明, 特女贞苷可增强成骨细胞的矿化能力, 促进成骨细胞的成熟和分化。

3.1.2 特女贞苷促进成骨细胞形成相关因子 mRNA 的表达 结果如图 2 所示, 与对照组比较, 特女贞苷 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 *Runx2*、*Osterix* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 特女贞苷 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

组的 *Runx2*、*ALP*、*Osterix* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。为观察特女贞苷对骨平衡关系的影响, 检测破骨功能相关因子 *OPG/RANKL*, 与对照组比较, 特女贞苷 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 *OPG/RANKL* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果表明, 在特女贞苷干预下成骨分化相关因子的 mRNA 水平上升, 且可上调 *OPG/RANKL* mRNA 的表达水平, 对成骨细胞成熟和分化有促进作用。

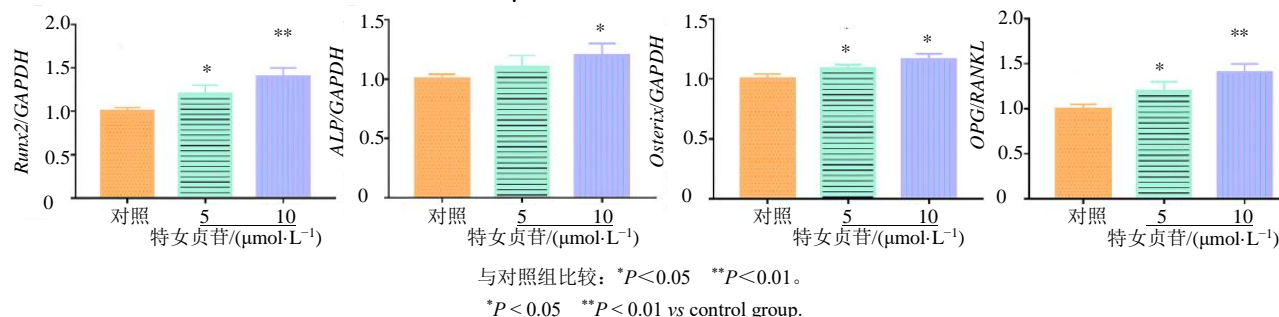


图 2 特女贞苷对成骨细胞形成相关因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect on expression of mRNA related to osteoblast formation factors by specnue ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.1.3 特女贞苷促进成骨细胞形成相关因子的蛋白表达 如图 3 所示, 与对照组比较, 特女贞苷 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 *OPG/RANKL*、*ALP*、*Osterix*、*Runx2* 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果表明, 特女贞苷可上调成骨细胞形成相关因子的蛋白含量且能促进成骨细胞分化, 其结果与 PCR 结果一致。

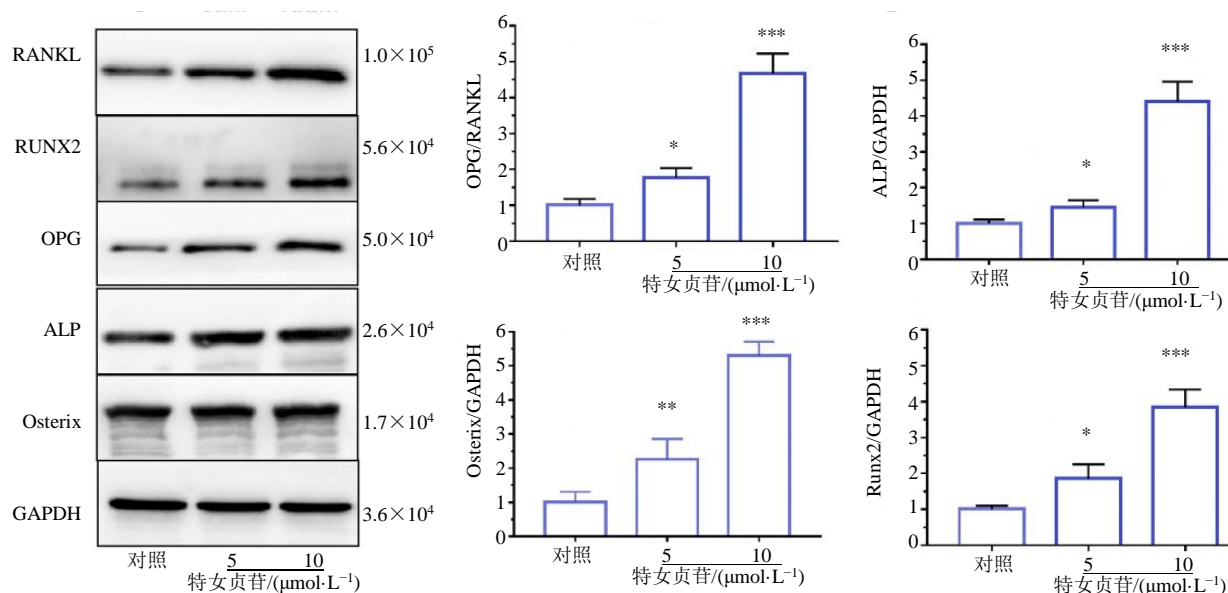
3.1.4 特女贞苷抑制 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞分化相关基因的表达 结果如图 4 所示, 与对照组比较, 特女贞苷 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 *MMP9*、*c-FOS*、*NFATc1*、*CTSK* mRNA 水平显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果表明, 在特女贞苷干预情况下破骨分化相关因子的 mRNA 含量下降, 抑制 RAW264.7 向破

骨细胞分化。

3.1.5 特女贞苷对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化相关蛋白表达的影响 如图 5 所示, 与对照组相比, 破骨相关因子 c-FOS、NFATc1、TRAF6 蛋白表达及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 在特女贞苷干预下显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果表明特女贞苷可以有效抑制破骨细胞的成熟及分化, 并降低 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白比例。

3.2 动物实验

3.2.1 Masson 染色检测特女贞苷对 PMOP 模型大鼠病理学的影响 如图 6 所示, 假手术组为正常骨组织结构, 骨小梁排列规则且致密; 模型组呈现明显的骨质流失, 骨小梁数量减少, 间隙增大, 结构

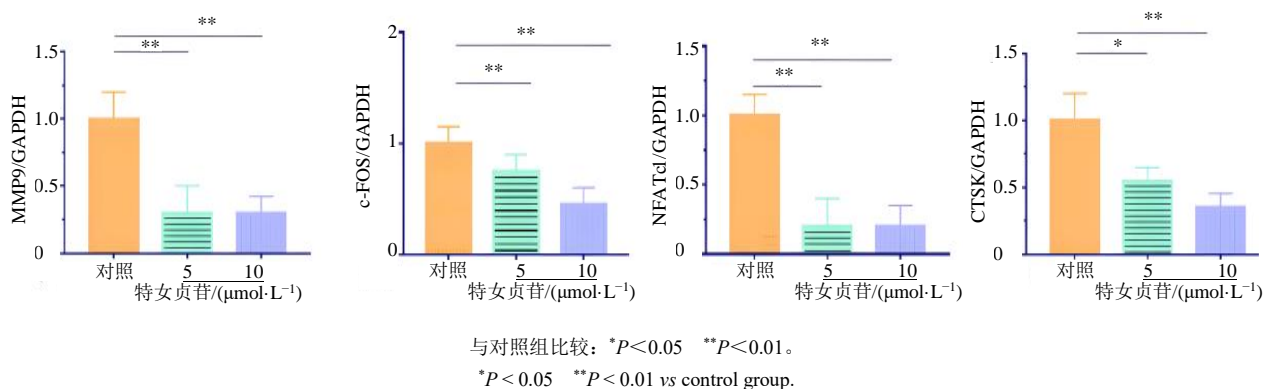


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 3 特女贞苷干预成骨细胞相关因子的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Protein expression of osteoblast-related factors intervened by specnue ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 4 特女贞苷抑制 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化相关基因的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Specnue inhibits expression of genes related to RANKL-induced differentiation in RAW264.7 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

疏松, 骨微结构紊乱; 而 EV 组稍有改善, 骨小梁数量和密度较模型组增加, 但仍未恢复到假手术组水平; 特女贞苷治疗后明显改善了紊乱的骨微结构, 骨小梁数量较模型组增多且面积增大, 高剂量组呈显著恢复接近假手术组水平。进一步分析骨小梁面积变化可发现, 与假手术组比较, 模型组骨小梁面积明显下降 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 特女贞苷低、高剂量组骨小梁面积明显上升 ($P < 0.01$)。

3.2.2 Micro-CT 检测特女贞苷干预 PMOP 模型的大鼠骨微观结构 如图 7 所示, 假手术组的股骨远端和胫骨近端显示出丰富的骨小梁, 这些骨小梁排

列规则且密集; 相比之下, 模型组的骨小梁较为稀疏, 多处出现断裂, 骨质流失明显; 而在特女贞苷低、高剂量组中, 骨小梁的数量和排列相较于模型组有所恢复, 显示出治疗的积极效果。选择胫骨近端作为感兴趣的区域 (ROI), 进一步分析了骨质的详细参数, 与对照组相比, 模型组大鼠的胫骨近端 BV/TV、TB.Th 和 TB.N 显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), 而 TB.Sp 显著增加 ($P < 0.01$); 相较于模型组, 特女贞苷组大鼠的胫骨近端 TB.Th、TB.N 和 BV/TV 值显著提高 ($P < 0.05$ 、 0.01), TB.Sp 值显著降低 ($P < 0.01$)。

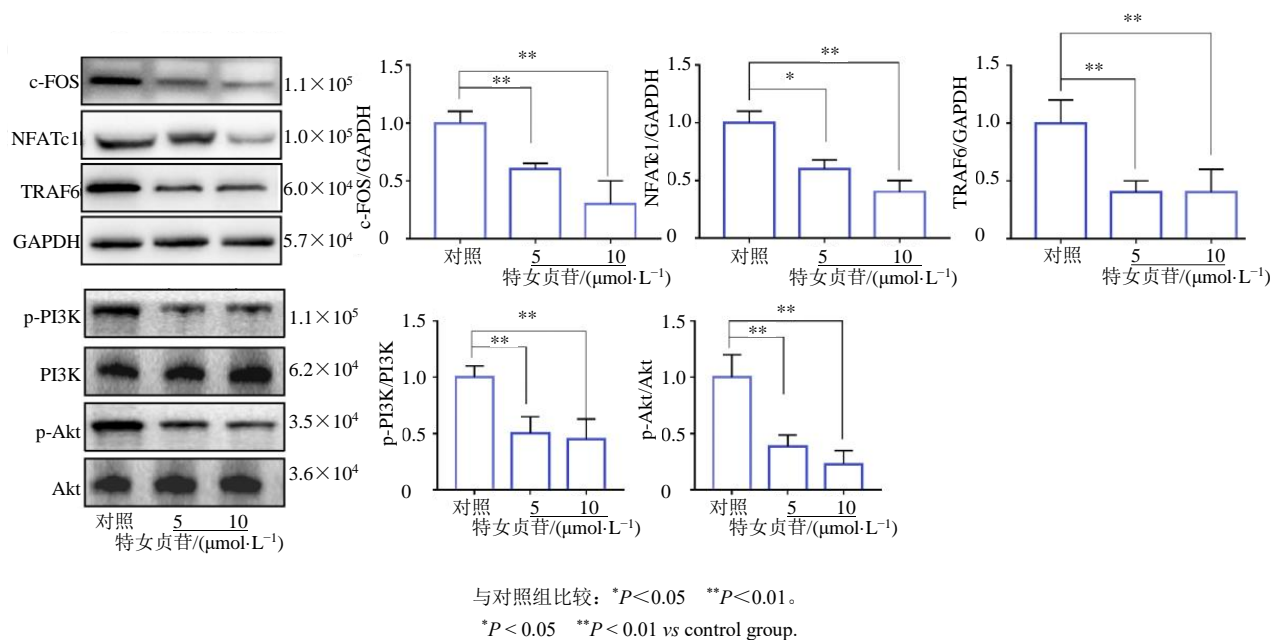


图 5 特女贞苷干预 RANKL 诱导的 RAW 264.7 细胞的相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of specnue on expression of related proteins in RAW 264.7 cells induced by RANKL ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

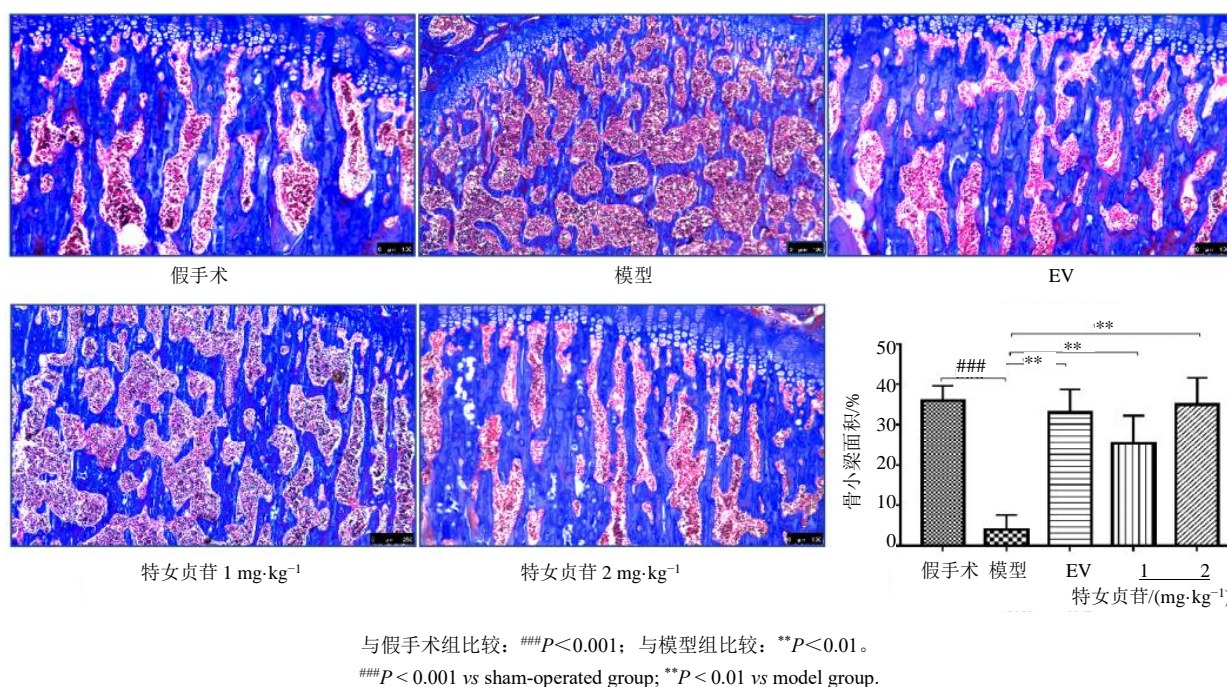
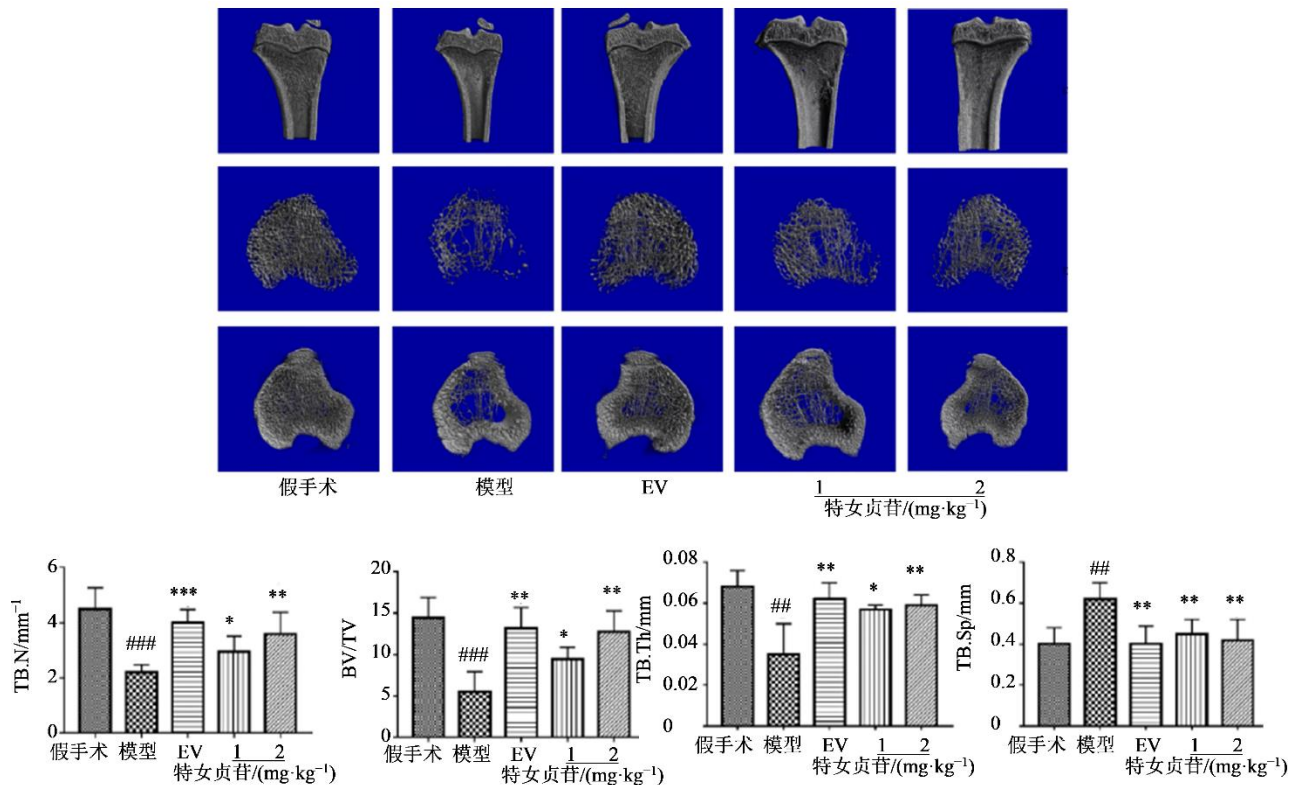


图 6 Masson 染色检测特女贞苷对骨质疏松病理学影响 ($\times 200$)

Fig. 6 Masson staining to detect pathological effects of specnue on osteoporosis ($\times 200$)

3.2.3 ELISA 检测外周血中相关成骨、破骨因子及体内微环境变化 结果见图 8, 与假手术组比较, 模型组外周血中 BALP 水平显著下降 ($P < 0.001$), TRAP-5b 水平显著上升 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 特女贞苷组 BALP 水平显著上升 ($P < 0.01$),

TRAP-5b 水平显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明特女贞苷可以有效维持骨稳态平衡。与假手术组比较, 模型组外周血中 CTSK、 β -CTX 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 特女贞苷组 CTSK、 β -CTX 水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明特女贞苷可



与假手术组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs sham-operated group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 7 Micro-CT 分析特女贞苷对大鼠骨参数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 7 Micro-CT analysis of effects of specnue on bone parameters of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

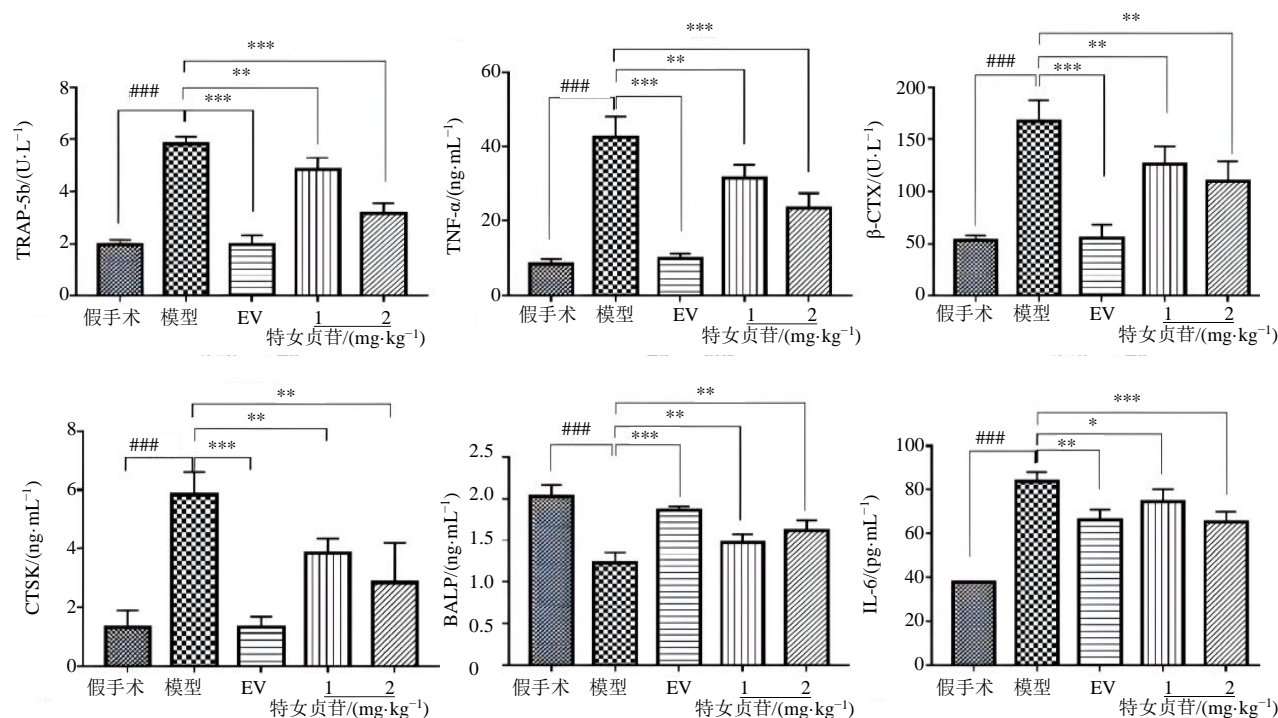
以抑制破骨细胞从而降低骨吸收。与假手术组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6 显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 特女贞苷组 TNF- α 、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), TNF- α 、IL-6 被认为是一种骨吸收刺激因子, 可以调控破骨细胞增殖分化, 结果表明特女贞苷可以降低 TNF- α 、IL-6 水平从而抑制骨吸收。

3.2.4 qRT-PCR 检测大鼠骨组织中相关 mRNA 表达水平 如图 9 所示, 与假手术组比较, 模型组成骨相关 *Runx2*、*Osterix*、*OPG/RANKL* mRNA 水平显著下降 ($P < 0.001$), 破骨相关 *NFATc1*、*c-FOS*、*TRAF6* mRNA 水平显著上升 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 特女贞苷组 *Runx2*、*Osterix*、*OPG/RANKL* mRNA 水平显著上升 ($P < 0.001$), *NFATc1*、*c-FOS*、*TRAF6* mRNA 水平显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结果表明, 特女贞苷通过促进骨组织内成骨因子的表达、抑制骨组织内破骨因子 mRNA 的表达, 达到预防和治疗绝经后骨质疏松的作用。

3.2.5 Western blotting 检测大鼠骨组织中相关蛋白表达 如图 10 所示, 模型组中 NFATc1、c-FOS、TRAF6 表达情况较假手术组显著上升 ($P < 0.001$), 与模型组相比, 经过特女贞苷治疗后 NFATc1、c-FOS、TRAF6 蛋白含量显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果表明, 特女贞苷可以下调 PMOP 大鼠骨组织中破骨相关因子的蛋白含量从而预防和治疗 PMOP。

4 讨论

PMOP 是与雌激素减少和年龄增长相关的全身骨代谢性疾病。女性绝经后卵巢功能退化导致雌激素水平骤降打破了骨形成与骨吸收之间的平衡, 导致骨量减少、骨微结构破坏, 骨折风险显著升高^[13]。尽管目前临床常用的治疗手段如钙剂、双膦酸盐及激素替代疗法等具有一定疗效, 但也存在如肌肉骨骼疼痛、发热、头痛等不良反应, 甚至过多的雌激素还可能升高乳腺癌、宫颈癌的发病风险。特女贞苷作为临床治疗 PMOP 的传统中药女贞子的活性成分, 已被证实其对氧化应激诱导的成骨细胞模型起到保护作用, 且能促进骨形成过程^[14-15]。为进一

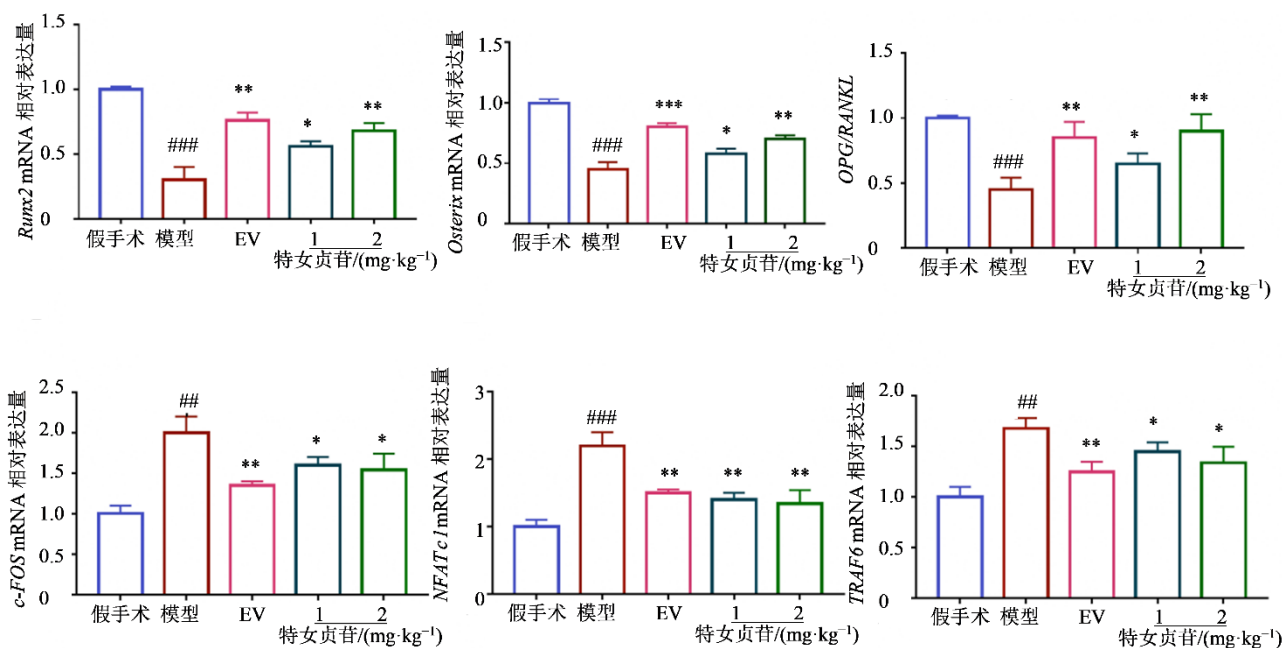


与假手术组比较: ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs sham-operated group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 8 ELISA 检测特女贞苷干预后外周血成骨、破骨及炎症相关因子水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Changes in osteogenic, osteoclastic and inflammatory-related factors in peripheral blood after treatment with specnue detected by ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与假手术组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs sham-operated group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 9 qRT-PCR 检测特女贞苷对大鼠骨组织相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 9 qRT-PCR detection of specnue on expression of related genes in rat bone tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

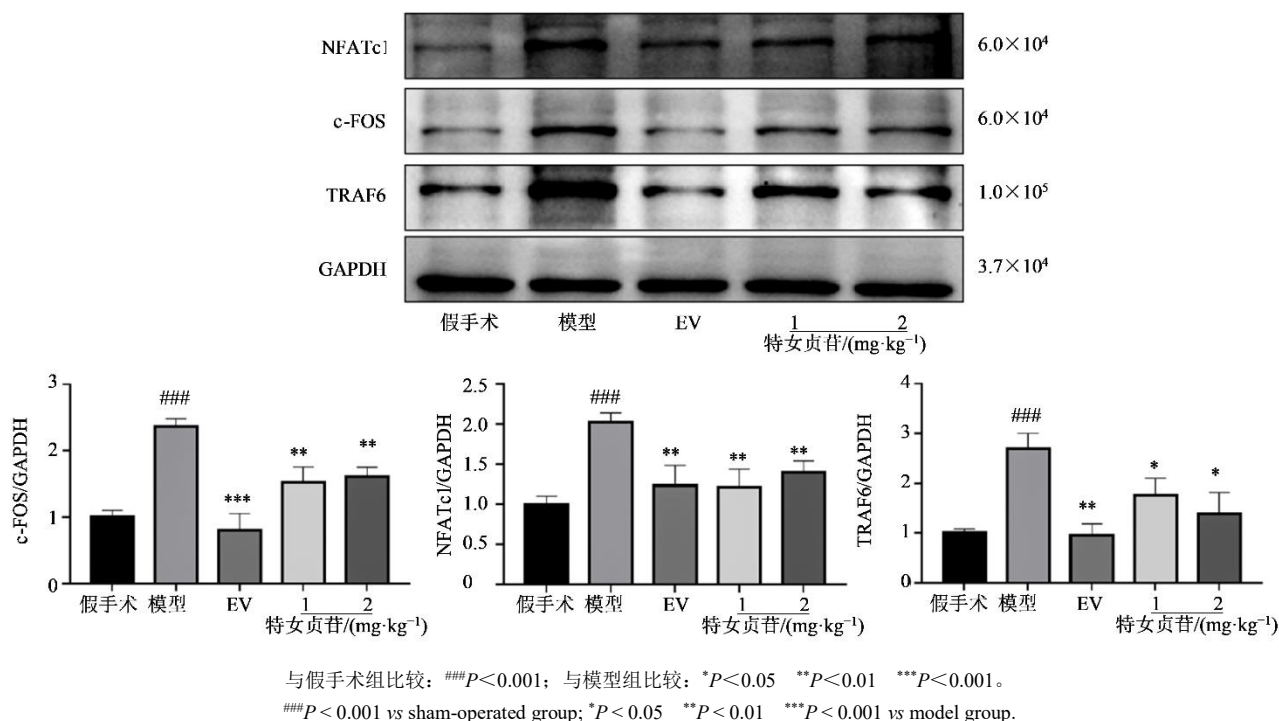


图 10 Western blotting 检测特女贞苷对大鼠骨组织中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Western blotting analysis of specnue on expression of related proteins in rat bone tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

步研究特女贞苷是否通过 RANKL 信号通路抑制破骨细胞分化和骨吸收功能进而起到治疗 PMOP 的作用, 本实验通过体外实验, 首先探明特女贞苷对成骨细胞的影响, 观察是否能改善成骨细胞的分化; 而后通过 RANKL 诱导的破骨细胞, 观察特女贞苷对破骨细胞的影响的分子机制, 最后通过构建 PMOP 大鼠模型, 进一步观察其机体内治疗 PMOP 的作用及潜在机制。

茜素红染色结果显示, 特女贞苷干预后的成骨细胞在骨钙化能力上显著增强, 且随着浓度的增加而增加。为进一步从分子生物学的角度验证结果, 本研究采用 qRT-PCR 及 Western blotting 检测成骨分化的关键因子, ALP 是成骨细胞分化的重要标志物, 其在成骨细胞的成熟和矿化过程中起关键作用, ALP 能够水解有机磷酸酯, 产生无机磷酸根, 从而促进羟基磷灰石的沉积, 这对于骨的矿化至关重要^[16]。Runx2 是成骨细胞分化的主要调控因子, 被称为成骨细胞的“主开关”基因。Runx2 在成骨细胞的早期分化阶段发挥关键作用, 调控多种成骨相关基因的表达, 包括 ALP、骨钙素和 I 型胶原。Runx2 的表达上调是成骨细胞分化的早期标志, 其缺失会导致成骨细胞分化受阻^[17]。Osterix 是 Runx2 下游的转录因子, 成骨细胞分化和成熟所必需。

Osterix 能够直接激活多种成骨相关基因的表达, 如 I 型胶原和骨钙素, 促进成骨细胞的分化和矿化。Osterix 在成骨细胞分化晚期发挥作用, Runx2 和 Osterix 的联合作用确保了成骨细胞的完全分化和功能发挥^[18]。OPG 和 RANKL 系统在骨重塑中起到重要的调节作用, RANKL 通过与其受体 RANK 结合可以促进破骨细胞的生成及活性, 从而加快骨吸收, OPG 通过与 RANKL 的结合可以抑制上述过程, 从而抑制破骨细胞的形成和功能^[19]。在本研究中, 经特女贞苷干预后的成骨细胞 ALP、Runx2、Osterix 表达量均有提高, 促进成骨细胞的分化和矿化, 同时下调了 RANKL 的表达、上调了 OPG 的表达, 这一调节作用有助于抑制破骨细胞的活性减少骨吸收, 进一步改善骨质疏松的症状。

通过 RANKL 与 OPG 的含量观察特女贞苷对破骨细胞的影响, 进一步采用 RANKL 诱导 RAW 264.7 细胞朝破骨细胞分化, 不同浓度的特女贞苷干预后检测相应的破骨细胞相关因子, MMP9 是破骨细胞分泌的、主要降解骨基质中的胶原, 是评估破骨细胞活性的重要指标^[20]。C-FOS 是调控破骨细胞前体向成熟破骨细胞分化的重要转录因子, 对破骨细胞的生成和功能具有促进作用。NFATc1 是破骨细胞分化的核心调控因子, 受 RANKL 信号通路

激活。NFATc1 调控多种破骨细胞特异性基因 (如 *TRAP*、*CTSK*、*DC-STAMP*) 的表达, 在破骨细胞分化的各个阶段及功能发挥中起关键作用^[21]。*CTSK* 是破骨细胞中主要的组织蛋白酶, 负责降解骨基质中的 I 型胶原及其他有机成分。*CTSK* 的高表达是破骨细胞骨吸收功能的核心标志, 其缺失会导致骨吸收障碍^[22]。研究显示, 不同浓度特女贞苷干预后的 RAW 264.7 细胞 MMP9、C-FOS、NFATc1、*CTSK* 的含量从基因以及蛋白层面均下调, 这表明特女贞苷不仅促进了成骨细胞的分化以及钙化, 同样抑制了破骨细胞的生成及活性, 从而在 PMOP 的治疗中发挥了重要的作用。PI3K/Akt 信号通路在 RANKL 介导的破骨细胞存活、分化和骨吸收功能中起重要作用^[23]。这一作用可能与 PI3K 通过其下游效应分子 Akt 的磷酸化有关。该通路的活化通常表现为关键蛋白磷酸化水平的升高 (即 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值升高)。Western blotting 检测结果显示, 特女贞苷显著降低了 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的表达水平, 这表明其能够通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 减少破骨细胞的分化和骨吸收功能, 从而起到保护骨质的作用。

为进一步讨论特女贞苷在机体内的效果以及功效如何, 采用去卵巢大鼠模拟 PMOP 并给予特女贞苷进行相应的实验检测。Masson 染色和 Micro-CT 分析结果表明, 特女贞苷显著增加了大鼠骨小梁的数量和密度, 改善了骨微结构。这些发现与之前关于特女贞苷在治疗糖尿病诱导的骨质流失中的作用相一致, 进一步支持了特女贞苷在骨质疏松治疗中的潜在应用。 β -CTX 是 I 型胶原被降解后释放入血的片段, β -CTX 含量的增高反映了骨吸收程, TRAP-5b 是破骨细胞分泌的酶, 常作为骨吸收的标志物^[24]。BALP 是 ALP 同工酶之一, 由成骨细胞产生, BALP 的活性能有效及时的反映骨形成^[25]。TNF- α 与 IL-6 不仅是炎症因子也被认为是一种骨吸收刺激因子, 在经特女贞苷治疗后, 模型大鼠外周血中 BALP、TRAP-5b、 β -CTX、*CTSK*、TNF- α 、IL-6 含量均显著降低, 特女贞苷通过调节外周血中相关骨代谢标志物进一步发挥治疗 PMOP 的作用。将实验大鼠的胫骨进行取材用于 qRT-PCR 及 Western blotting 检测发现成骨细胞相应因子 Runx2、Osterix、OPG/RANKL 含量在特女贞苷的治疗下均显著上升而破骨细胞的有关因子 NFATc1、c-FOS、TRAF6 在特女贞苷的干预下表达量均下调,

说明在体内实验中特女贞苷稳定的发挥着增加成骨细胞的分化钙化、降低破骨细胞的活性的作用, 从而治疗 PMOP。

本研究通过多层次多角度的实验验证了特女贞苷在 PMOP 治疗中的有效性和潜力, 特女贞苷不仅减少了骨吸收还进一步促进了骨形成, 使其在治疗 PMOP 方面有着独特的优势, 这些研究发现为其在防治 PMOP 方面的应用提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Black D M, Rosen C J. Postmenopausal osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(3): 254-262.
- [2] You L, Pan L, Chen L, et al. miR-27a is essential for the shift from osteogenic differentiation to adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 253-265.
- [3] Brown J P. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2021, 36(3): 544-552.
- [4] Liu C Y, Ma R F, Wang L L, et al. *Rehmanniae Radix* in osteoporosis: A review of traditional Chinese medicinal uses, phytochemistry, pharmacokinetics and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198: 351-362.
- [5] Guo N, Yu Y H, Ablajan K, et al. Seasonal variations in metabolite profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(12): 1701-1714.
- [6] Fu G M, Ip F C F, Pang H H, et al. New secoiridoid glucosides from *Ligustrum lucidum* induce ERK and CREB phosphorylation in cultured cortical neurons [J]. *Planta Med*, 2010, 76(10): 998-1003.
- [7] Lin H M, Yen F L, Ng L T, et al. Protective effects of *Ligustrum lucidum* fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111(1): 129-136.
- [8] Wu J M, Ke X, Fu W, et al. Inhibition of hypoxia-induced retinal angiogenesis by specnuezhenide, an effective constituent of *Ligustrum lucidum* Ait., through suppression of the HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. *Molecules*, 2016, 21(12): 1756.
- [9] Yang J, Jia J, Yang Y K, et al. Protective effect of Specnuezhenide on islet β cell of rats with gestational diabetes mellitus [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(1): 60-64.
- [10] 顾闻, 刘特, 陈久林, 等. 特女贞苷对血管内皮细胞氧

- 化损伤的作用研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(9): 1093-1098.
- Gu W, Liu T, Chen J L, et al. Effect of specnuezhenide reducing the oxidative damage of vascular endothelial cells [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2018, 38(9): 1093-1098.
- [11] Ye X S, Jiang J J, Yang J, et al. Specnuezhenide suppresses diabetes-induced bone loss by inhibiting RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2022, 54(8): 1080-1089.
- [12] 肖新华, 周后德, 王运林, 等. RANKL 诱导小鼠单核细胞 RAW264.7 分化成成熟破骨细胞 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(2): 151-155.
- Xiao X H, Zhou H D, Wang Y L, et al. Osteoclastogenesis in RAW264.7 cells induced by RANKL [J]. Chin J Osteoporos, 2005, 11(2): 151-155.
- [13] 汤淑女, 尹香君, 余卫, 等. 中国老年人骨质疏松症知识知晓及影响因素分析 [J]. 中国健康教育, 2023, 39(3): 200-205.
- TANG S N, Yin X J, Yu W, et al. Analysis on awareness of osteoporosis knowledge and its influencing factors among Chinese elderly persons [J]. Chin J Health Educ, 2023, 39(3): 200-205.
- [14] 陈烨, 刘彤彤, 吴怡, 等. 特女贞苷对 MC3T3-E1 细胞氧化损伤的保护作用及相关通路研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42(2): 1-5.
- Chen Y, Liu T T, Wu Y, et al. Protective effects of specnuezhenide on oxidative damage of MC3T3-E1 cells and related pathways [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2023, 42(2): 1-5.
- [15] Deng X H, Lin B F, Xiao W L, et al. Specnuezhenide alleviates senile osteoporosis by activating TGR5/FXR signaling in bone marrow mesenchymal stem cells and RANKL-induced osteoclasts [J]. Drug Des Devel Ther, 2025, 19: 1595-1608.
- [16] Wu X H, Qu M H, Gong W Y, et al. Kindlin-2 deletion in osteoprogenitors causes severe chondrodysplasia and low-turnover osteopenia in mice [J]. J Orthop Translat, 2021, 32: 41-48.
- [17] Vimalraj S, Arumugam B, Miranda P J, et al. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 78: 202-208.
- [18] Tsukune N, Naito M, Ohashi A, et al. Forced expression of mouse progerin attenuates the osteoblast differentiation interrupting β -catenin signal pathway *in vitro* [J]. Cell Tissue Res, 2019, 375(3): 655-664.
- [19] 季韶洋. TNFRSF11B (OPG) 蛋白功能结构域的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- Ji S Y. Research on the functional Domain of TNFRSF11B(OPG) protein [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2008.
- [20] Ortega N, Behonick D, Stickens D, et al. How proteases regulate bone morphogenesis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 995: 109-116.
- [21] Wang Q X, Xie J, Zhou C C, et al. Substrate stiffness regulates the differentiation profile and functions of osteoclasts via cytoskeletal arrangement [J]. Cell Prolif, 2022, 55(1): e13172.
- [22] Gao L H, Li S S, Yue H, et al. Associations of serum cathepsin K and polymorphisms in CTSK gene with bone mineral density and bone metabolism markers in postmenopausal Chinese women [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 48.
- [23] 齐保玉. 基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路研究补骨生髓方调节 BMSCs 成骨/成脂分化的效应与机制 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2024.
- Qi B Y. Based on the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway, the effect and mechanism of the bone graft and marrow growth formula in regulating osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs were studied [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2024.
- [24] Brown J P, Don-Wauchope A, Douville P, et al. Current use of bone turnover markers in the management of osteoporosis [J]. Clin Biochem, 2022, 109/110: 1-10.
- [25] Nizet A, Cavalier E, Stenvinkel P, et al. Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease-mineral and bone disorder [J]. Clin Chim Acta, 2020, 501: 198-206.

[责任编辑 兰新新]