



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元双向调控成骨-破骨细胞分化
作者: 李淼, 高园, 韩雪梅, 梁武, 仲飞亮, 罗学刚
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250128
收稿日期: 2025-08-27
网络首发日期: 2026-01-29
引用格式: 李淼, 高园, 韩雪梅, 梁武, 仲飞亮, 罗学刚. 植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元双向调控成骨-破骨细胞分化[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250128>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元双向调控成骨-破骨细胞分化

李 淼¹, 高 园¹, 韩雪梅^{1,2}, 梁 武², 仲飞亮¹, 罗学刚¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457;

(2. 天津市食用益生菌重点实验室, 天津创源生物科技有限公司, 天津 300301)

摘要: 骨质疏松症是一种常见的骨骼代谢失衡性疾病, 其特征为骨量减少及骨折风险增加。阐明微生物干预在骨健康中的作用机制, 对于开发新型治疗策略具有重要意义。本研究聚焦于植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) IOB602 及其后生元 (IOB602PB), 利用 MC3T3-E1/RAW264.7 细胞模型探讨其对骨稳态的双向调控作用。结果显示, 两者均能显著促进成骨, 可提高成骨细胞增殖活性、增强碱性磷酸酶 (ALP) 活性、促进矿化结节形成, 并上调 *RUNX2*、*BMP2* 和 *OPN* 等关键成骨相关基因的表达; 同时均能减少抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 阳性的多核细胞数量, 发挥抑制破骨作用。代谢组学分析表明, 两者可能通过氨基酸合成途径维持骨稳态, 其中 IOB602PB 在辅因子代谢方面有特异性增强。植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元均能良好维持骨稳态, 且后生元相较活菌剂干预优势更突出, 为基于微生物代谢调控的骨病精准防治提供理论基础。

关键词: 植物乳植杆菌 IOB602; 后生元; 成骨细胞; 破骨细胞; 骨稳态

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Lactiplantibacillus plantarum IOB602 and Its Postbiotics Bidirectionally Regulate Osteoblast-Osteoclast Differentiation

LI Miao^{1,4}, GAO Yuan¹, HAN Xuemei^{1,2}, LIANG Wu², ZHONG Feiliang¹, LUO Xuegang¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Edible Probiotics, Tianjin InnoOrigin Biological Biotechnology Co. Ltd., Tianjin 300301, China)

Abstract: Osteoporosis is a common metabolic disorder of the skeleton, characterized by reduced bone mass and increased fracture risk. Elucidating the mechanism of microbial intervention in bone health is of great significance for developing new therapeutic strategies. This study focuses on *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602 and its postbiotics (IOB602PB), and explores their bidirectional regulatory effects on bone homeostasis using the MC3T3-E1/RAW264.7 cell model. The results show that both can significantly promote osteogenesis by increasing the proliferative activity of osteoblasts, enhancing alkaline phosphatase (ALP) activity, promoting the formation of mineralized nodules, and up-regulating the expression of key osteogenesis-related genes such as *RUNX2*, *BMP2* and *OPN*. At the same time, both can reduce the number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive multinucleated cells, thereby exerting the effect of inhibiting osteoclastogenesis. Metabolomic analysis indicates that both may maintain bone homeostasis through the amino acid synthesis pathway, among which IOB602PB shows specific enhancement in cofactor metabolism. *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602 and its postbiotics can both maintain bone homeostasis well, and the postbiotics have more prominent intervention

收稿日期: 2025-08-27; 修回日期: 2025-11-17

基金项目: 天津市科技成果转移转化项目 (24ZYCGSY00390)

作者简介: 李 淼 (2000—), 女, 河北人, 硕士研究生; 通信作者: 罗学刚, 教授, luoxuegang@tust.edu.cn

advantages compared with the live bacterial agents, which provides a solid theoretical basis for the precise prevention and treatment of bone diseases based on microbial metabolic regulation.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602; postbiotic; osteoblast; osteoclast; bone homeostasis

骨质疏松症是一种以骨密度降低和微结构退变为核心特征的全身性骨骼疾病^[1-3]，其临床表现包括骨强度下降及骨折风险显著增加^[4]。这种与年龄相关的疾病影响着 60 岁以上 30% 的女性群体，而男性的发病率也在持续攀升，在全球范围内，受影响的人口超过 2 亿。在绝经后女性中，雌激素水平的急剧下降导致钙代谢紊乱是主要病理驱动因素^[5]。同时，钙和维生素 D 摄入不足加上久坐行为，进一步加剧了骨骼健康危机。欧美国家通过全民骨密度筛查和早期药物干预，降低了骨质疏松性骨折的年发生率。然而，在医疗资源匮乏的地区，许多患者仍无法获得标准化诊断和治疗服务。骨质疏松症已成为全球公共卫生负担^[6]，亟须同步提升公众认知、预防策略与临床管理，以减轻其对人类健康的累积危害。

现代骨质疏松症药物治疗体系已形成以双膦酸盐、地诺单抗和特立帕肽为核心的三大支柱方案，但长期应用仍受限于下颌骨坏死、非典型股骨骨折及钙代谢紊乱等并发症^[7]。近期微生物组研究的突破性进展揭示了肠-骨轴调控机制，展现了益生菌及其后生元革新传统疗法的巨大潜力。研究表明，罗伊氏乳杆菌 6475 通过增加骨体积分数和骨小梁厚度，有效逆转了在动物模型中雌激素缺乏引起的骨质流失^[8]；植物乳植杆菌 GKM3 和副干酪乳杆菌 GKS6 则通过促进成骨细胞分化并抑制破骨细胞形成，显著减轻了小鼠的骨质流失^[9]；而鼠李糖乳杆菌 UBLR-5 借由调节 Treg/Th17 细胞平衡增强了骨矿物质密度的维持^[10]。植物乳植杆菌 MD35 的后生元通过减弱细胞外信号相关激酶(ERK)磷酸化，抑制 NF-κB 配体(RANKL)诱导的破骨细胞分化，显著抑制骨吸收活性，使破骨前体细胞凋亡率增加^[11]。在临床转化方面，副干酪乳杆菌 DSM13434、植物乳植杆菌 DSM15312 和植物乳植杆菌 DSM15313 的三联菌株组合能延缓早期绝经女性腰椎骨密度的年下降率^[12]。尽管如此，益生菌及其后生元防治骨质疏松症的具体分子机制与作用通路仍未完全阐明。

本研究系统评估了植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) IOB602 及其后生元 IOB602PB 对骨代谢的双向调节作用及机制。以 MC3T3-E1 成骨前体细胞为模型，通过碱性磷酸酶 (ALP) 染色、茜素红染色评估骨基质矿化水平，采

用 MTT 法检测细胞增殖活性；以 RAW264.7 破骨前体细胞为模型，通过 TRAP 染色分析其对破骨细胞分化的抑制效应。同时，实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 解析 *RUNX2*、*BMP2*、*OPN* 等成骨相关基因的表达差异，结合代谢组学分析明确菌株及其后生元的代谢物组成特征，进而阐明二者调控成骨细胞功能、抑制破骨细胞分化的核心机制。

1 材料与方法

1.1 材料

植物乳植杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*) IOB602 菌株及其后生元均由天津创源生物技术有限公司提供，菌株的保藏编号为 CGMCCNo.16021。细胞系 MC3T3-E1 及 RAW264.7 均来源于天津科技大学微生物与分子药理实验室。

胎牛血清、DMEM 培养基，赛默飞世尔科技公司 (Gibco)；青霉素-链霉素双抗溶液、碱性磷酸酶 (ALP) 染色试剂盒 (G1480)、茜素红 (ARS) 染色试剂盒 (G3280)、抗石炭酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色试剂盒 (G1492)、TRIzol™ 试剂 (R1100)，北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养、益生菌上清液及后生元的制备

本研究选用的植物乳植杆菌 IOB602 菌株分离自天津市居民家庭的天然发酵面团样本。

益生菌液制备：将该菌株接种于 MRS 液体培养基，37℃ 静置培养 12 h，至活菌数达 1×10^9 CFU/mL，获得植物乳植杆菌 IOB602 益生菌菌液。

益生菌上清液制备：取上述新鲜菌液，4℃、4000g 离心 10 min，上清液经 0.22 μm 滤膜过滤除菌备用。

后生元制备：取同批次益生菌菌液 60℃ 水浴灭活 30 min 后进行喷雾干燥，制得后生元 IOB602PB 粉末，其主要成分为灭活菌体细胞、胞外发酵代谢产物及少量培养基残留组分，使用前以 DMEM 培养基复溶，调整浓度至与益生菌液等体积对应（即 1×10^9 CFU/mL 灭活菌体制剂）。

1.2.2 细胞培养

MC3T3-E1 细胞（小鼠胚胎成骨前体细胞）和 RAW264.7 细胞（一种可自主分化为破骨细胞的小鼠

单核巨噬细胞系)常规培养于含10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素双抗溶液的DMEM完全培养基中。细胞在标准培养条件(37°C、5% CO₂)下传代3次后,收集细胞用于分化诱导实验。

1.2.3 成骨/破骨细胞模型的建立与其表征

将MC3T3-E1和RAW264.7细胞在完全培养基中进行扩增培养后,定向分化诱导。MC3T3-E1细胞使用添加有50 μg/mL抗坏血酸和2.16 mg/mL的β-甘油磷酸钠的基础培养基诱导其向成骨细胞成熟分化^[13];而RAW264.7细胞则在含50 ng/mL RANKL的基础培养基中诱导其向破骨细胞成熟分化。为进行实验干预,将植物乳植杆菌 IOB602 上清液以及后生元 IOB602PB 分别以体积比1:20加入相应的诱导培养基中。在含干预物的诱导培养基中培养8 d后的MC3T3-E1细胞,按照标准化流程依次进行ALP染色和ARS染色;同时,在干预诱导培养基中培养5 d的RAW264.7细胞依据说明书使用TRAP染色试剂盒进行染色分析。

1.2.4 MTT法检测细胞活性

采用MTT法评估植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元 IOB602PB 对MC3T3-E1和RAW264.7细胞活性

的影响。将MC3T3-E1或RAW264.7细胞接种于含成骨或破骨分化培养基的96孔板(每孔含100 μL培养基),贴壁培养24 h后分组处理:阴性对照组(NC),仅添加等体积DMEM培养基;IOB602干预组,按体积比1:20、1:50、1:100、1:200、1:500加入活菌上清液(对应每孔添加量分别为5、2、1、0.5、0.2 μL);IOB602PB干预组,按相同体积比加入IOB602PB(对应每孔添加量分别为5、2、1、0.5、0.2 μL)。干预24 h或48 h后,每孔加10 μL MTT溶液,37°C孵育4 h;吸弃含MTT的培养基,加100 μL DMSO溶解甲瓞结晶;最后用酶标仪在570 nm波长处检测吸光度。

1.2.5 RT-qPCR基因表达分析

使用TRIzol™试剂从经益生菌/后生元处理的细胞中提取总RNA,并通过分光光度法进行定量。将RNA样品统一调整至10 ng/μL后,采用High-Capacity cDNA反转录试剂盒(TransGen)将其反转录为cDNA。随后,以β-actin作为内参基因,对目的基因(RUNX2、BMP2和OPN)进行RT-qPCR扩增。基因表达水平采用2^{-ΔΔCt}法进行计算,具体引物序列见表1。

表1 RT-qPCR的特异性引物序列

Tab. 1 Sequences of RT-qPCR specific primer

Target gene	Forward primer	Reveres primer
<i>β-actin</i>	5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'
<i>RUNX2</i>	5'-TGCCCAGTGAGTAACAGAAAGAC-3'	5'-CTCCTCCCTTCTCAACCTCTAA-3'
<i>BMP2</i>	5'-GTGTTATGGTCTGTGGGAGAAAT-3'	5'-GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT-3'
<i>OPN</i>	5'-ATCTCACCATTCCGATGAGTCT-3'	5'-TGTAGGGACGATTGGAGTGAAA-3'

1.2.6 代谢组学分析

为解析植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元 IOB602PB 样品的代谢复杂性及内源性干扰,对两者(n=5)进行代谢组学分析。采用主成分分析(PCA)评估样本间代谢差异及组内重复性。通过结合正交信号校正(OSC)的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)筛选差异代谢物。显著性差异代谢物的判定基于以下双重标准:OPLS-DA模型中变量投影重要性(VIP)值>1.0,并结合单因素方差分析(one-way ANOVA)结果(P<0.05)。利用KEGG数据库进行通路富集分析,以阐明相关的代谢途径。

1.3 统计分析

所有实验数据均以“平均值±标准差”表示。使用GraphPad Prism 8软件进行统计分析和数据可视化。组间差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA)

进行评估,*、**和***分别表示与阴性对照组相比具有显著差异P<0.05、P<0.01和P<0.001。此外,通过主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等多变量分析方法,评估样本间代谢物谱差异及组内变异性。

2 结果与分析

2.1 植物乳植杆菌 IOB602 及后生元 IOB602PB 通过双重调控机制促进骨代谢平衡

植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元 IOB602PB 通过8 d成骨细胞分化模型,评估其对骨代谢稳态的调节作用,结果如图1所示。ARS染色结果显示,相较于对照组,实验组钙化结节数量增加且钙沉积水平显著增加,其中IOB602PB组的矿化区域扩增最为显著。

ALP 染色结果表明, 植物乳植杆菌 IOB602 与 IOB602PB 处理组呈现广泛分布的 ALP 阳性区域, 而对照组仅为散在染色, 证实其显著增强成骨分化的能力。在 5 d 的破骨细胞诱导模型中, TRAP 染色显示处理组多核破骨细胞数量减少, 其中 IOB602PB 的抑制效应最强。上述结果共同揭示了双重调节机制: 植物乳植杆菌 IOB602 及 IOB602PB 在显著促进成骨细胞矿化的同时, 能够有效抑制破骨细胞融合, 其中后生元组对两种骨代谢细胞的正向调控效应尤为突出。

MTT 进一步评估对 MC3T3-E1 和 RAW264.7 前体细胞向成骨细胞和破骨细胞分化的影响。在成骨前体细胞 MC3T3-E1 中 (图 2A-B), 植物乳植杆菌 IOB602 及后生元 IOB602PB 在 24 小时处理后均显著促进细胞增殖 (IOB602PB 促增殖峰值最高), 48 小时效应虽减弱但仍持续; 相反, 在破骨前体细胞 RAW264.7 中 (图 2C-D), 二者均呈现对破骨细胞增殖的抑制作用, 且 48 小时抑制作用显著增强。该结果进一步证实两者对骨代谢细胞具有双向调节作用

用, 其中 IOB602PB 处理组在促增殖 (24 小时阶段) 和抑增殖 (48 小时阶段) 维度均展现出更强调控效能。

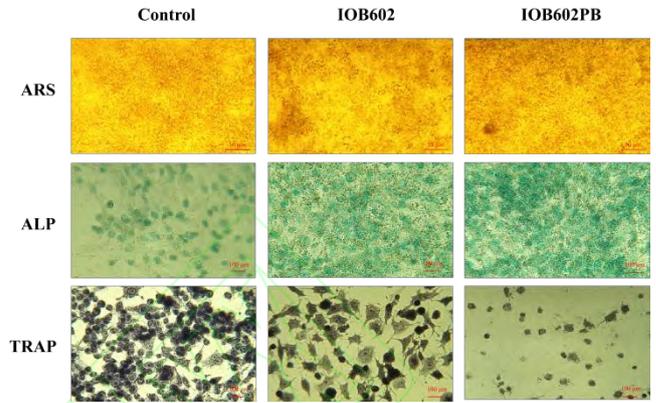
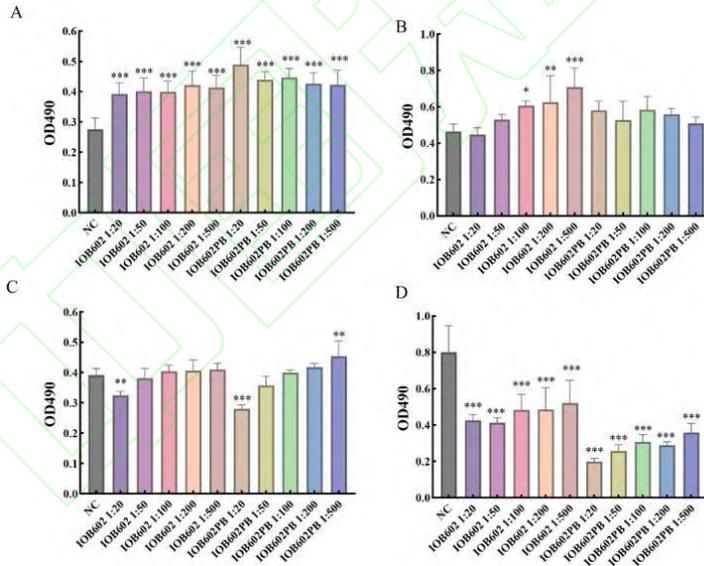


图 1 植物乳植杆菌 IOB602 和 IOB602PB 对骨代谢的双向调节作用

Fig. 1 Dual Regulation of Bone Metabolism by *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602 and IOB602PB



(A) MC3T3-E1 向成骨细胞分化的增殖检测 (24 h), (B) MC3T3-E1 向成骨细胞分化的增殖检测 (48 h), (C) RAW264.7 向破骨细胞分化增殖检测 (24 h), (D) RAW264.7 向破骨细胞分化增殖检测 (48 h)。

图 2 植物乳植杆菌 IOB602 和 IOB602PB 对骨代谢细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602 and IOB602PB on proliferation of bone metabolic cells.

2.2 植物乳植杆菌 IOB602 及 IOB602PB 对成骨关键基因的特异性激活

RT-qPCR 分析证实, 在成骨诱导第 8 天, 植物乳植杆菌 IOB602 与后生元 IOB602PB 对 MC3T3-E1 细胞的关键骨形成基因具有不同的调节作用 (图 3); 两者均显著上调骨形成核心转录因子 RUNX2^[14-16]

(IOB602: $P<0.01$; IOB602PB: $P<0.001$), 且植物乳植杆菌 IOB602PB 的上调幅度达植物乳植杆菌 IOB602 的 3.4 倍; 值得注意的是, IOB602PB 特异性增强关键调控因子的表达——骨形成关键生长因子 BMP2^[17] 显著上调 ($**P<0.01$)^[18-19], 而多功能磷脂糖蛋白 OPN (既促进骨形成又抑制破骨细胞生成) 表达明显

增强 (* $P < 0.05$)^[20-21]。这表明两者均共同激活 RUNX2, 和下游效应蛋白 (OPN), 实现更全面的成骨分化促进作用。但 IOB602PB 通过独特靶向上游调控因子 (BMP2)

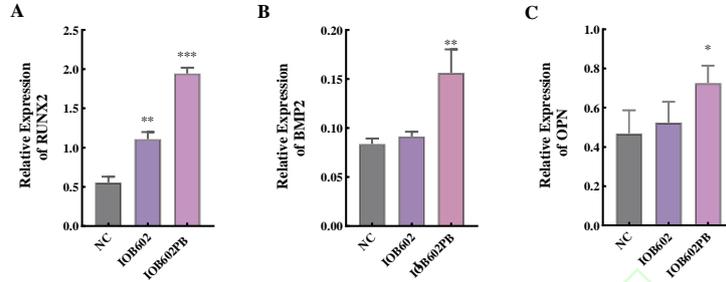


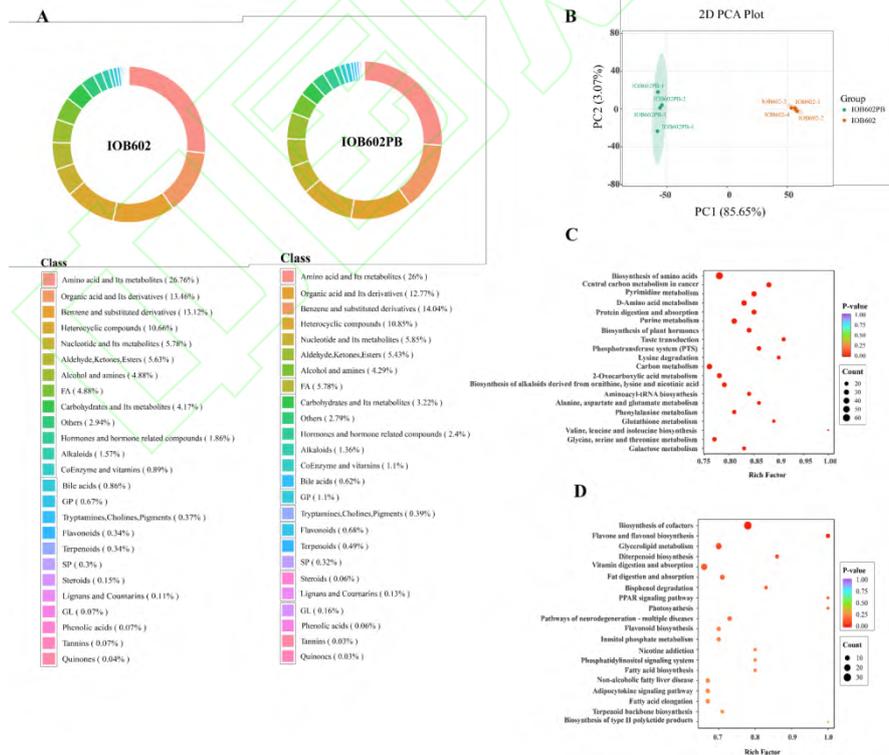
图3 植物乳植杆菌 IOB602 和 IOB602PB 特异性激活成骨相关的基因

Fig. 3 Specific Activation of Osteogenic Master Genes by *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602 and IOB602PB

2.3 植物乳植杆菌 IOB602 及后生元 IOB602PB 通过代谢通路差异调控骨稳态

植物乳植杆菌 IOB602 和 IOB602PB 的代谢谱分析及通路富集如图 4 所示。非靶向代谢组学分析揭示植物乳植杆菌 IOB602 与后生元 IOB602PB 具有高度相似的代谢谱特征 (图 4A): 前十大类代谢物组成基本一致 (主要成分差异<1%), 其中氨基酸及其

衍生物占比最高 (IOB602: 26.76%, IOB602PB: 26.00%), 苯类衍生物 (13.12%, 14.04%) 和有机酸 (13.46%, 12.77%) 次之; IOB602PB 的苯类衍生物占比提升 0.92%, 而植物乳植杆菌 IOB602 有机酸占比增加 0.69%; IOB602PB 使醇/胺类物质从 4.88% 增至 5.78%, 同时醛/酮/酯类物质从 5.63% 降至 4.29%。



(A) 主要代谢物类别的组成分布; (B) 基于非靶向代谢组学数据的主成分分析(PCA)得分图; (C) 植物乳植杆菌 IOB602 和 IOB602PB 共有代谢物的 KEGG 通路富集分析; (D) 基于差异丰度代谢物的分析: 植物乳植杆菌 IOB602PB 与 IOB602 相比, 上调代谢通路的 KEGG 分析

图4 植物乳植杆菌 IOB602 和 IOB602PB 的代谢谱分析及通路富集

Fig. 4 Metabolic Profiling and Pathway Enrichment of *Lactiplantibacillus plantarum* IOB602 and IOB602PB

主成分分析 (PCA, 图 4B) 显示组间代谢谱显著分离 (主成分累计贡献率: PC1 85.65% + PC2 3.07% = 88.72%), 二者代谢特征差异; KEGG 富集分析鉴定出 20 条显著调控通路 (图 4C), 其中氨基酸生物合成通路发挥核心调控作用; IOB602PB 显著提升辅因子代谢产物水平 (图 4D), 该特征与其增强的成骨生物活性直接关联。这些结果表明, 尽管两者均通过保守的氨基酸代谢协同维持骨稳态, 但 IOB602PB 特有的辅因子代谢调控赋予其更优越的成骨效能。

3 讨论

益生菌是“活的”有益菌, 能在肠道定植并分泌代谢物发挥即时调节作用。后生元则是“灭活菌体+稳定代谢物”的集合, 化学结构清晰、无需存活即可长效递送信号, 储存与安全优势突出。植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元 IOB602PB 被证实可同步促成骨、抑破骨, 实现骨重建双向调控。为验证其“双向调控”效应, 本研究选用国际公认、方案成熟的小鼠 MC3T3-E1 前成骨细胞与 RAW264.7 破骨前体细胞, 构建“成骨-破骨双轴”体外模型: 前者在地塞米松、 β -甘油磷酸钠等诱导下可完整重现增殖-基质成熟-矿化全过程并高表达 ALP、Runx2; 后者经 RANKL 快速分化为多核 TRAP+ 破骨细胞, 形成骨吸收陷窝。两系联合模拟骨重塑, 结果可比、周期短, 为评价后生元智能化调控骨代谢提供稳定平台。与 Ishikane 等报道的 DIF-1 对成骨的抑制作用不同^[20], 二者可协同增强 MC3T3-E1 细胞的早期成骨分化标志物 (ALP 活性) 与晚期矿化指标 (ARS 阳性结节形成), 该发现与 Li 等采用双肽功能化纳米纤维支架募集宿主内皮祖细胞进行血管生成以修复颅骨缺损^[21]的研究具有机制一致性; 在破骨模型中, 处理组呈现 TRAP+ 多核细胞数量锐减与细胞体积缩小, 表明其通过抑制破骨前体细胞融合实现强效抗骨吸收作用。关键性突破在于: 在证实其安全性与植物乳植杆菌 A41 一致^[22]的基础上, 首次揭示植物乳植杆菌 IOB602 及 IOB602PB 通过促成骨形成/抑骨吸收协同机制实现双向调节优势, 该“成骨促进/骨吸收抑制”协同效应在机制上与 KEGG 解析的氨基酸/辅因子代谢特征相一致; 其中后生元 IOB602PB 特有的辅因子增效机制及时间依赖性生物活性调控, 从代谢层面解释了其相

对于益生菌对照组的优越疗效。

MTT 实验检测 IOB602 与 IOB602PB 对 MC3T3-E1 增殖作用的 48 小时节点, IOB602 对细胞的促增殖作用低于 IOB602PB。这一现象可能与活菌在体外培养条件下的动态变化有关。具体而言, IOB602 在共培养过程中部分菌体发生死亡与裂解, 释放胞内及胞壁成分, 理论上可部分转化为具有生物活性的“类后生元”物质。然而, 该过程受限于菌体自然死亡率低、释放成分复杂且浓度不可控, 难以达到 IOB602PB (经定向裂解、纯化与富集) 的活性水平。与此同时, IOB602PB 在 24 小时促进成骨细胞方面及抑制破骨细胞增殖方面仍表现更为良好。这进一步凸显了后生元在体外效应稳定性与活性可控性方面的优势。

MC3T3-E1 细胞成骨分化的特征标志物包括关键基因如 BMP2、RUNX2 和 OPN 的上调表达。通过不同机制协同调控骨代谢: BMP2 经 Notch 信号通路调控成骨^[23]; RUNX2 作为 BMP/Smad 级联下游核心转录因子^[24-25], 在早期成骨承诺过程中发挥核心调控作用。先前研究已证实 RUNX2 可通过多种机制增强, 包括绿茶多酚的直接激活^[26]或通过 circRBM23/miR-338-3p 轴介导的表观遗传调控^[27]; OPN 作为糖基化基质蛋白在骨矿化过程中则具有双相功能——生理水平促骨成熟, 病理过表达加剧代谢失衡^[28]。此研究首次揭示: 植物乳植杆菌 IOB602 与后生元 IOB602PB 干预显著提升了 BMP2、RUNX2 和 OPN 的 mRNA 表达, 其中 IOB602PB 中 RUNX2 表达量是 IOB602 的 3.4 倍; 该效应通过双重机制实现——BMP2 上调激活 BMP/Smad 通路驱动 RUNX2 依赖性分化, 而 OPN 差异性升高提示细菌代谢物可能调节骨基质成熟与矿化过程之间的平衡。

代谢组学分析揭示植物乳植杆菌 IOB602 与后生元 IOB602PB 具有高度保守的代谢谱, 其核心代谢物 (氨基酸、有机酸、苯类衍生物) 通过协同机制调控骨代谢: 有机酸 (如乳酸/乙酸) 通过降低肠道 pH 值提升钙离子吸收效率, 促进羟基磷灰石沉积; 短链脂肪酸经抑制 TNF- α /IL-6 信号轴减轻炎症性骨流失^[29]; 氨基酸 (如脯氨酸/赖氨酸) 则为胶原合成提供关键底物, 驱动骨基质重塑。KEGG 通路富集证实两组均显著上调氨基酸代谢, 凸显其在成骨细胞调节及骨微环境调控中的核心作用, 尤其通过 LAT1-mTORC1

轴调控骨细胞中的 NFATc1 调控抑制破骨细胞骨吸收^[30-31], 这些机制对骨吸收与稳态具有关键调控作用, 且该机制与骨疏丹 (GSD) 通过“肾-骨轴”支链氨基酸代谢改善绝经后骨质疏松的临床证据高度契合^[32]。尤为关键的是, IOB602PB 在辅因子代谢通路中呈现显著升高的代谢物丰度, 直接关联其卓越成骨活性-这与经典研究形成三重互证: PTH-Gas-PKA 轴下游转录辅因子 NACA 可增强 bZIP 因子与骨钙素等靶基因启动子结合直接调控骨分化^[33]; NADH 通过动态调节 CtBP2/p300-Runx2 复合体结合状态调控成骨基因转录^[34]; HIF-1 α /RANKL/Notch1 通路则揭示病理状态下辅因子代谢物对骨微环境适应的核心作用^[35]。此外, 在成骨细胞中, LSD1 凭借其 FAD 的依赖性去甲基化酶活性, 移除 RUNX2 启动子区域的甲基化标记, 使染色质保持开放, 从而持续释放 RUNX2 这一关键成骨转录因子的表达潜能, 强力驱动成骨基因转录^[34]。金属离子类辅因子如钙离子作为骨矿化的核心离子, 参与血小板激活、纤维蛋白交联和羟基磷灰石成核。镁离子作为 BMP2 信号通路的辅因子, 具有促进间充质干细胞向成骨方向分化的作用^[36]。镉离子也具有促进成骨和免疫调节作用, 通常在临床上用于抗骨质疏松治疗^[37]。

此研究证实植物乳植杆菌 IOB602 及其后生元 IOB602PB 通过双向调节机制 (显著增强成骨细胞分化并有效抑制破骨细胞活性) 来保护骨组织; 代谢组学进一步揭示 IOB602PB 特异性提升辅因子代谢物水平, 其卓越成骨效能与代谢调控强度呈显著正相关 ($r=0.92, P<0.001$), 该发现为开发骨质疏松的微生物靶向代谢干预策略奠定了实验与理论基础。

参考文献:

- [1] LIU X, LI F, DONG Z, et al. Metal-polyDNA nanoparticles reconstruct osteoporotic microenvironment for enhanced osteoporosis treatment[J]. Science advances, 2023, 9(31): 3329.
- [2] TAO H, CHEN K, WANG Q, et al. Targeting lipid raft-related stomatin to ameliorate osteoporosis in preclinical models[J]. Nature communications, 2025, 16(1): 5495.
- [3] 富翔, 谢丽丽, 张瑞坤, 等. 基于“miRNA-肠道微生态-骨代谢”探讨“脾-肠-骨轴”在骨质疏松症发病中的作用机制[J]. 江西中医药大学学报, 2025, 37(4): 114-118.
- [4] 罗淼, 李宁, 裴环, 等. 生姜主要活性成分防治骨质疏松症的肠-骨轴作用机制研究进展[J]. 中医正骨, 2025, 37(8): 42-45.
- [5] 潘毅博, 李勇, 覃肯, 等. 绝经后骨质疏松症与膝关节关节炎共病的机制及补肾调髓类中药干预机制的研究进展[J]. 中医正骨, 2025, 37(8): 24-29.
- [6] COSMAN F, LANGDAHL B, LEDER B Z. Treatment sequence for osteoporosis[J]. Endocrine practice, 2024, 30(5): 490-496.
- [7] ZHOU J, CHENG J, LIU L, et al. *Lactobacillus acidophilus* (LA) fermenting astragalus polysaccharides (APS) improves calcium absorption and osteoporosis by altering gut microbiota[J]. Foods, 2023, 12(2): 275.
- [8] RIBEIRO J L, SANTOS T A, GARCIA M T, et al. Heat-killed *Limosilactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 prevents bone loss in ovariectomized mice: a preliminary study[J]. PLOS ONE, 2024, 19(5): e0304358.
- [9] YANG LC, LIN SW, LI I C, et al. *Lactobacillus plantarum* GKM3 and *Lactobacillus paracasei* GKS6 supplementation ameliorates bone loss in ovariectomized mice by promoting osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation[J]. Nutrients 2020, 12(7): 1914.
- [10] SAPRA L, DAR H Y, BHARDWAJ A, et al. *Lactobacillus rhamnosus* attenuates bone loss and maintains bone health by skewing Treg-Th17 cell balance in OVX mice[J]. Scientific reports, 2021, 11(1): 1807.
- [11] MYEONG JY, JUNG HY, CHAE HS, et al. Protective effects of the postbiotic *Lactobacillus plantarum* MD35 on bone loss in an ovariectomized mice model[J]. Probiotics and antimicrobial proteins, 2024, 16(2): 541-551.
- [12] JANSSON PA, CURIAC D, AHRÉN I L, et al. Probiotic treatment using a mix of three *Lactobacillus* strains for lumbar spine bone loss in postmenopausal women: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial[J]. The lancet rheumatology, 2019, 1(3): 154-162.
- [13] SHIN HR, KIM BS, KIM HJ, et al. Excessive osteoclast activation by osteoblast paracrine factor RANKL is a major cause of the abnormal long bone phenotype in Apert syndrome model mice[J]. Journal of cellular physiology, 2022, 237(4): 2155-2168.
- [14] WANG L, LIU Y, DIAO Z, et al. The circ_0054633/miR-590-3p/RUNX2 positive feedback loop promotes the osteogenic differentiation of BMSCs[J]. Stem cell research & therapy, 2025, 16(1): 325.

- [15] XI Y H, ZHANG Z, ZHAO Z X, et al. Injectable thymosin β 4-modified hyaluronic acid hydrogel with exosomes for stem cell homing and neuron-angiogenic-osteogenic coupled cranial repair[J]. ACS Nano, 2025, 19(25): 22710-22724.
- [16] HE D, MA J, ZHOU Z, et al. TET2 suppresses vascular calcification by forming an inhibitory complex with HDAC1/2 and SNIP1 independent of demethylation[J]. The journal of clinical investigation, 2025, 135(9): e186673.
- [17] YU S, GUO J, SUN Z, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals *Klf4* as a novel transcription factor of osteoblast differentiation[J]. Cell death & disease, 2021, 12(2): 197.
- [18] WANG X, ZHAO X, ZHENG X, et al. *Sirt6* loss activates *Got1* and facilitates cleft palate through abnormal activating glycolysis[J]. Cell death & disease, 2025, 16(1): 159.
- [19] GUEX A G, MENZEL U, LADNER Y, et al. Conditioned media from mechanically stimulated macrophages upregulate osteogenic genes in human mesenchymal stromal cells[J]. Advanced healthcare materials, 2025: 2500706.
- [20] ISHIKANE S, IKUSHIMA E, IGAWA K, et al. Differentiation-inducing factor-1 potentiates adipogenic differentiation and attenuates the osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Biochimica et biophysica acta (BBA): molecular cell research, 2021, 1868(2): 118909.
- [21] LI L, LIU W, ZHAO Y, et al. Dual-peptide-functionalized nanofibrous scaffolds recruit host endothelial progenitor cells for vasculogenesis to repair calvarial defects[J]. ACS Applied materials & interfaces, 2020, 12(3): 3474-3493.
- [22] LEE C S, KIM S H. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic potential of *Lactobacillus plantarum* A41 and *L. fermentum* SRK414 as probiotics[J]. Probiotics and antimicrobial proteins, 2020, 12(2): 623-634.
- [23] DOCSHIN P, BAIRQDAR A, MALASHICHEVA A. Interplay between BMP2 and notch signaling in endothelial-mesenchymal transition: implications for cardiac fibrosis[J]. Stem cell investigation, 2023, 10: 18.
- [24] LIANG X, LI Y, WANG P, et al. Key regulators of vascular calcification in chronic kidney disease: hyperphosphatemia, BMP2, and RUNX2[J]. PeerJ, 2024, 12: e18063.
- [25] 耿铭珠, 穆文清, 邱琳, 等. miR-129-1-3p 通过 BMP2/SMAD1 信号通路抑制人骨髓间充质干细胞成骨分化的研究[J]. 口腔医学, 2025, 45(6): 418-423.
- [26] LAO W, ZHAO Y, TAN Y, et al. Regulatory effects and mechanism of action of green tea polyphenols on osteogenesis and adipogenesis in human adipose tissue-derived stem cells[J]. Current issues in molecular biology 2022, 44(12): 6046-6058.
- [27] GAO JW, SONG MK, WU DZ, et al. CircRBM23 regulates the switch between osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells via sponging miR-338-3p[J]. Clinical science, 2023, 137(6): 495-510.
- [28] XU J, SHI C, DING Y, et al. Endothelial Foxo1 Phosphorylation Inhibition via aptamer-liposome alleviates OPN-Induced pathological vascular remodeling following spinal cord injury[J]. Advanced science, 2024, 11(43): 2406398.
- [29] FENG R, WANG Q, YU T, et al. Quercetin ameliorates bone loss in OVX rats by modulating the intestinal flora-SCFAs-inflammatory signaling axis[J]. International immunopharmacology, 2024, 136: 112341.
- [30] OZAKI K, YAMADA T, HORIE T, et al. The L-type amino acid transporter LAT1 inhibits osteoclastogenesis and maintains bone homeostasis through the mTORC1 pathway[J]. Science signaling, 2019, 12(589): eaaw3921.
- [31] STEGEN S, MOERMANS K, STOCKMANS I, et al. The serine synthesis pathway drives osteoclast differentiation through epigenetic regulation of NFATc1 expression[J]. Nature metabolism, 2024, 6(1): 141-152.
- [32] REN M, WANG Y, YUAN Y, et al. Integration of UHPLC-MS and mass spectrometry imaging techniques revealed the protective mechanism of Gushudan in postmenopausal osteoporosis rats via branched-chain amino acid metabolism based on the 'kidney-bone' axis[J]. Journal of chromatography b, 2025, 1256: 124540.
- [33] HARIRI H, PELLICELLI M, ST-ARNAUD R. Nfil3, a target of the NACA transcriptional coregulator, affects osteoblast and osteocyte gene expression differentially[J]. Bone, 2020, 141: 115624.
- [34] ZHANG W, DUAN N, ZHANG Q, et al. The intracellular NADH level regulates atrophic nonunion pathogenesis through the CtBP2-p300-Runx2 transcriptional complex[J]. International journal of biological sciences, 2018, 14(14):

2023-2036.

- [35] CHEN W, WU P, YU F, et al. HIF-1 α regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3552.
- [36] YANG X, PENG S, CHEN X, et al. Multi-metallic layered double hydroxides functionalized degradable bone cement: Modulation of degradation, sustained ion release, antimicrobial, and osteogenic properties[J]. *Applied clay science*, 2025, 265: 107652.
- [37] WU Y P, SHI X W, WANG JJ, et al. A surface metal ion-modified 3D-printed Ti-6Al-4V implant with direct and immunoregulatory antibacterial and osteogenic activity[J]. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2023, 11(11): 1142264.

