

内 分 泌

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002940

# 乳铁蛋白通过调节 IGF-1 介导的 PI3K/mTOR 信号对糖皮质激素性骨质疏松大鼠的治疗作用

顾 燕<sup>1</sup>, 刘 波<sup>1</sup>, 罗建华<sup>1</sup>, 胡方芳<sup>2</sup>, 刘 倩<sup>1</sup>, 张 巧<sup>3</sup>

(1. 贵州省人民医院内分泌科, 贵阳 550002; 2. 贵州省人民医院检验科, 贵阳 550002;

3. 贵黔国际总医院内分泌科, 贵阳 550021)

**【摘要】目的:**观察乳铁蛋白对糖皮质激素性骨质疏松大鼠的治疗作用和机制。**方法:**SPF 级 Wistar 雌性大鼠 60 只, 随机分为对照组、模型组, 乳铁蛋白低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性药组(阿仑膦酸钠组), 肌内注射地塞米松磷酸钠注射液建立糖皮质激素性骨质疏松大鼠模型, 造模成功后灌胃给予药物治疗。放射学检测骨形态和骨密度(bone mineral density, BMD); 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中 1 型前胶原氨基端延长肽(procollagen type 1 amino-terminal propeptide, PINP)、骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, bALP)、骨钙素(osteocalcin, OC)、 $\beta$ -胶原降解产物( $\beta$ -crosslaps,  $\beta$ -CTX)、胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor 1, IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF binding protein, IGFBP)-3、IGFBP-4、IGFBP-5 表达水平; Western blot 检测股骨组织中胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1 receptor, IGF-1R)和磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/哺乳动物雷帕霉素复合物(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号相关蛋白表达。**结果:**与对照组比较, 模型组大鼠的 BMD 降低( $P=0.000$ ), 骨形态破坏; 血清中 PINP、bALP、OC、 $\beta$ -CTX、IGF-1、IGFBP-3、IGFBP-4、IGFBP-5 表达水平明显升高( $P=0.000$ ); 股骨组织中 IGF-1R、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 p-mTOR 蛋白表达无统计学差异( $P>0.05$ )。与模型组比较, 乳铁蛋白中剂量组和高剂量组大鼠的 BMD 增加( $P=0.030, P=0.008$ ), 骨形态改善; 血清中 PINP( $P=0.009, P=0.000$ )、bALP( $P=0.002, P=0.000$ )、OC( $P=0.007, P=0.000$ )和  $\beta$ -CTX( $P=0.020, P=0.009$ )表达水平均降低; IGF-1( $P=0.007, P=0.003$ )、IGFBP-3( $P=0.030, P=0.007$ )、IGFBP-4( $P=0.020, P=0.009$ )、IGFBP-5( $P=0.040, P=0.008$ )表达水平呈剂量依赖性增加; 大鼠股骨组织中 IGF-1R( $P=0.020, P=0.006$ )、p-PI3K/PI3K( $P=0.040, P=0.005$ )、p-Akt/Akt( $P=0.003, P=0.007$ )和 p-mTOR( $P=0.010, P=0.000$ )蛋白表达明显上调。**结论:**乳铁蛋白呈剂量依赖性改善糖皮质激素性骨质疏松大鼠的骨代谢, 且与调控 IGFBP 及 IGF-1 介导的 PI3K/mTOR 信号激活有关, 具有潜在的抗骨质疏松活性。

**【关键词】**乳铁蛋白; 糖皮质激素性骨质疏松; 胰岛素样生长因子-1; 骨代谢

**【中图分类号】**R589.5

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2020-11-05

## Therapeutic effect of lactoferrin on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats by regulating IGF-1-mediated PI3K/mTOR signaling pathway

Gu Yan<sup>1</sup>, Liu Bo<sup>1</sup>, Luo Jianhua<sup>1</sup>, Hu Fangfang<sup>2</sup>, Liu Qian<sup>1</sup>, Zhang Qiao<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology, Guizhou Provincial People's Hospital; 2. Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital; 3. Department of Endocrinology, Guiqian International General Hospital)

**【Abstract】Objective:** To observe the therapeutic effect and mechanism of lactoferrin on glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) in rats. **Methods:** Sixty female SPF Wistar rats were randomly divided into control group, model group, low-dose lactoferrin group, medium-dose group, high-dose group and alendronate group. Dexamethasone sodium phosphate injection was intramuscularly injected to establish GIOP model rats. After the molding being completed, drug intervention was given to them by gavage. The bone morphology and bone mineral density (BMD) were detected by radiological examinations. The levels of procollagen type 1 amino-terminal propeptide (PINP), bone alkaline phosphatase (bALP), osteocalcin (OC),  $\beta$ -crosslaps ( $\beta$ -CTX), insulin like growth factor-1 (IGF-1), IGF binding protein-3 (IGFBP-3), IGFBP-4, and IGFBP-5 in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot was used to detect the expression of IGF-1 receptor (IGF-1R) and phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of

作者介绍: 顾 燕, Email: guyangyxy@sina.com,

研究方向: 骨质疏松及骨代谢疾病。

基金项目: 贵州省科技计划资助项目(编号: 黔科合 LH 字[2016]7167)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211206.1517.020.html>

(2021-12-07)

rapamycin (PI3K/mTOR) signal-related proteins in femoral tissue. **Results:** Compared with control group, the BMD value of rats in the model group was decreased ( $P=0.000$ ) and bone morphology was destroyed. The serum levels of PINP, bALP, OC,  $\beta$ -

CTX, IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-4 and IGFBP-5 were increased significantly ( $P=0.000$ ). There was no significant difference in the protein expression of IGF-1R, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and p-mTOR in femoral tissue ( $P>0.05$ ). Compared with those of model group, the BMD ( $P=0.030, P=0.008$ ) and bone morphology of rats in middle and high-dose of lactoferrin groups increased; serum levels of P1NP ( $P=0.009, P=0.000$ ), bALP ( $P=0.002, P=0.000$ ), OC ( $P=0.007, P=0.000$ ) and  $\beta$ -CTX ( $P=0.020, P=0.009$ ) decreased; serum levels of IGF-1 ( $P=0.007, P=0.003$ ), IGFBP-3 ( $P=0.030, P=0.007$ ), IGFBP-4 ( $P=0.020, P=0.009$ ), and IGFBP-5 ( $P=0.040, P=0.008$ ) increased dose-dependently; the protein expression of IGF-1R ( $P=0.020, P=0.006$ ), p-PI3K/PI3K ( $P=0.040, P=0.005$ ), p-Akt/Akt ( $P=0.003, P=0.007$ ) and p-mTOR ( $P=0.010, P=0.000$ ) was significantly up-regulated in middle and high-dose lactoferrin groups in femoral tissues. **Conclusion:** Lactoferrin can improve the bone metabolism of GIOP in rats, and it is related to the regulation of IGFBP and IGF-1-mediated PI3K/mTOR signal activation. Lactoferrin has potential anti-osteoporosis activity.

**[Key words]** lactoferrin; glucocorticoid-induced osteoporosis; insulin-like growth factor-1; bone metabolism

糖皮质激素诱导性骨质疏松症 (glucocorticoid induced osteoporosis, GIOP) 是由于糖皮质激素所致的以骨强度 (骨密度和骨质量) 下降和骨折风险增高为特征的继发性骨骼系统疾病, 是临床最常见的继发性骨质疏松, 严重者可致椎体、肋骨和髌部等部位骨折, 极大地影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。

研究发现糖皮质激素能够抑制胰岛素样生长因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 转录, 减少 IGF-1 生成, 调节胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin like growth factor binding protein, IGFBP) 表达, 导致骨形成下降, 这是 GIOP 的主要发病机制之一<sup>[2]</sup>。已知 IGF-1 储存在骨骼基质中, 参与骨代谢调节, 并在骨骼重塑中起重要作用<sup>[3]</sup>。IGF-1 可以通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 途径激活哺乳动物雷帕霉素复合物 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的表达来刺激成骨细胞增殖和分化<sup>[4-5]</sup>。

近年来研究发现乳铁蛋白具有潜在的抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等作用。同时, 有研究证明乳铁蛋白还是一种强有力的骨形成刺激因子<sup>[6]</sup>。牛乳铁蛋白是一种从牛乳中分离得到的与铁结合的蛋白质复合物, 是一种安全的食品原料。前期研究发现给予地塞米松诱导大鼠发生 GIOP, 同时给予乳铁蛋白预防性治疗, 结果提示乳铁蛋白组骨密度及骨形态学较模型组明显改善, 提示乳铁蛋白能预防 GIOP 发生<sup>[7]</sup>。但其是否能治疗 GIOP, 能否改善骨代谢指标及其可能机制是什么目前尚未开展研究。因此, 本研究旨在探讨乳铁蛋白对 GIOP 的治疗作用及可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试剂 地塞米松磷酸钠注射液 (国药准字 H22022889, 贵州光正制药有限公司, 中国), 95% 乳铁蛋白 (HILMAR INGREDIENTS, 天津银河伟业进出口有限公司, 中国), 阿仑磷酸钠 (国药准字 H20059934, 海南海神同洲制药有限公司, 中国), 1 型前胶原氨基端延长肽 (procollagen type 1 amino-terminal propeptide, P1NP)、骨碱性磷酸酶 (bone alkaline phosphatase, bALP)、骨钙素 (osteocalcin, OC)、 $\beta$ -胶原降解产物 ( $\beta$ -crosslaps,  $\beta$ -CTX)、胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)、IGFBP-3、IGFBP-4、IGFBP-5 大鼠 ELISA 试剂盒 (武汉基因美生物科技有限公司, 中国), PI3K-mTOR 信号相关蛋白抗体: 抗 Akt、抗 p-Akt、抗 PI3K、抗 p-PI3K (Abcam, 英国), 抗 p-mTOR、抗  $\beta$ -Actin (Cell Signaling Technology, 美国)。

1.1.2 动物 本研究符合贵州省人民医院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。Wistar 雌性大鼠 (12 周龄) 60 只, SPF 级, 购买于辽宁长生生物技术股份有限公司, 饲养于 20°C 和光照 12 h/黑暗 12 h 环境, 自由饮水和进食。经过 1 周的适应期后, 将所有大鼠随机分为 6 组: 对照组、模型组、乳铁蛋白低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性药组 (阿仑磷酸钠组), 每组 10 只。

### 1.2 实验方法

1.2.1 骨质疏松模型建立和干预治疗 根据之前文献<sup>[8]</sup>描述, 除对照组外, 其余大鼠肌内注射地塞米松磷酸钠注射液 2.0 mg/kg, 1 周 2 次, 造模 12 周。12 周后对照组随机选取 5 只, 其余各组每组随机抽取大鼠 1 只 (共 5 只) 行骨密度 (bone mineral density, BMD) 检验造模是否成功。模型检验成功后, 按之前文献<sup>[8]</sup>描述, 将乳铁蛋白按 0.1 g/(kg·d)、1 g/(kg·d)、3 g/(kg·d) 用生理盐水稀释后分别给低中高剂量乳铁蛋白组大鼠灌胃, 阿仑磷酸钠 0.16 mg/(kg·d) 研磨后溶于生理盐水给予阳性药组灌胃, 对照组和模型组大鼠给予等体积生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续灌胃 12 周。

1.2.2 放射学分析 右胫骨和股骨通过微型 CT(R<sub>m</sub>CT2; 日本东京 Rigaku)以各向同性分辨率 10 μm 扫描。将获得的胫骨 3D 图像转换为多平面重建图像。从生长板近端 2 000 μm 开始,覆盖远端干骺端区域的 2 000 μm 感兴趣区域(100 个切片)用于评估骨形态。使用双能 X 射线骨密度仪 DXA(美国 GE 公司, LunerProdigy 型)测量左侧股骨的 BMD。由骨矿物质含量(g)和骨面积(m<sup>2</sup>)计算 BMD(g/m<sup>2</sup>)。

1.2.3 酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 大鼠空腹状态下,眼眶内眦静脉取血,3 000 r/min 离心,收集血清,-80℃保存。根据 ELISA 试剂盒说明书测量大鼠血清中骨代谢指标(P1NP、bALP、BGP、β-CTX)和 IGF-1、IGFBP-3、IGFBP-4、IGFBP-5 水平。

1.2.4 Western blot 收集大鼠股骨组织,加入 RIPA 蛋白裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂),组织匀浆,4℃裂解 30 min。在 4℃下以 12 000g 离心 5 min 收集上清液,BCA 试剂盒测量蛋白质浓度。采用 10% SDS-PAGE 胶分离蛋白质,并转移到硝酸纤维素膜。将膜用 5% BSA 封闭 1 h,然后加入抗 IGF-1R、抗 Akt、抗 p-Akt、抗 PI3K、抗 p-PI3K、抗 p-mTOR、抗 Actin 于 4℃过夜,然后在室温下与 HRP 的抗山羊或抗兔 IgG 孵育 1 h。用红外成像系统(LI-COR Biosciences, 美国)扫描和分析图像。

1.3 统计学处理

用 Graph-Pad Prism 7.0 进行统计分析,所有数据均表示为均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )。采用单因素方差分析进行统计学分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 乳铁蛋白对 GIOP 大鼠骨形态和 BMD 的影响

微 CT 结果发现糖皮质激素加速并诱导了实验大鼠的小梁骨微结构恶化,而乳铁蛋白和阿仑磷酸钠的治疗明显减轻了股骨的恶化(图 1)。骨密度检查发现,与对照组相比,模型组大鼠 BMD 明显减小( $P=0.000$ ),乳铁蛋白中剂量组、高剂量组和阳性药组大鼠 BMD( $P=0.030, P=0.008$ )较模型组明显增加,差异具有统计学意义( $F=7.894, P=0.032$ )(图 2, 表 1)。

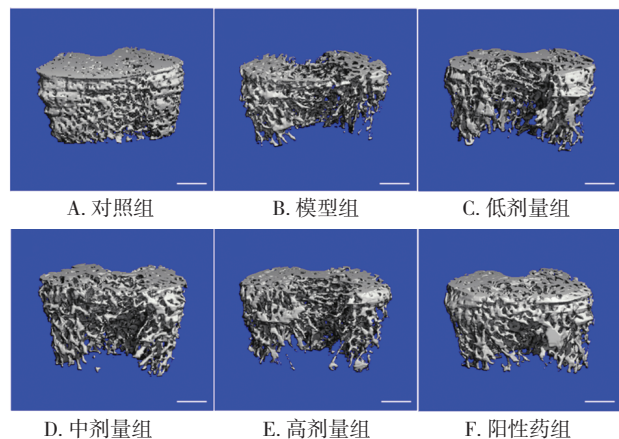
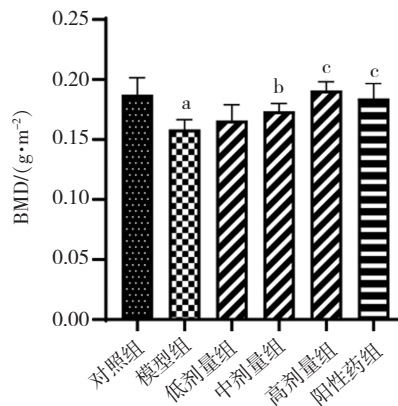


图 1 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠股骨骨形态的影响



注:a, 与对照组比较,  $P<0.001$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与模型组比较,  $P<0.01$

图 2 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠 BMD 的影响

表 1 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠 BMD 的影响 ( $\bar{x} \pm s; g/m^2$ )

组别	BMD
对照组 ( $n=5$ )	0.187 ± 0.014
模型组 ( $n=5$ )	0.158 ± 0.008 <sup>a</sup>
低剂量组 ( $n=5$ )	0.166 ± 0.013
中剂量组 ( $n=5$ )	0.174 ± 0.007 <sup>b</sup>
高剂量组 ( $n=5$ )	0.191 ± 0.007 <sup>c</sup>
阳性药组 ( $n=5$ )	0.184 ± 0.012 <sup>c</sup>
F 值	7.894
P 值	0.032

注:a, 与对照组比较,  $P<0.001$ ; b: 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c: 与模型组比较,  $P<0.01$

2.2 乳铁蛋白对 GIOP 大鼠骨代谢指标的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中骨代谢指标 P1NP( $P=0.000$ )、bALP( $P=0.000$ )、OC( $P=0.000$ )和 β-CTX( $P=0.000$ )水平均明显升高。与模型组比较,乳铁蛋白中剂量组和高剂量组较模型组大鼠血清中 P1NP( $P=0.009, P=0.000$ )、bALP( $P=0.002, P=0.000$ )、OC( $P=0.007, P=0.000$ )和 β-CTX( $P=0.020, P=0.009$ )水平均降低。与阳性药组比较,乳铁蛋白高剂量组大鼠血清中 OC( $P=0.010$ )水平降低,但 β-CTX( $P=0.010$ )水平升高。采用单因素方差分析进行统计学分析,差异具有统计学意义( $F_{P1NP}=90.17, P_{P1NP}=0.002; F_{bALP}=92.76, P_{bALP}=0.001; F_{OC}=42.75, P_{OC}=0.004; F_{\beta-CTX}=106.3, P_{\beta-CTX}=0.003$ )(图 3, 表 2)。

2.3 乳铁蛋白对 GIOP 大鼠 IGFBP/IGF-1 表达的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中 IGF-1( $P=0.000$ )、IGFBP-3( $P=0.000$ )、IGFBP-4( $P=0.000$ )和 IGFBP-5( $P=0.000$ )水平均明显增加。与模型组比较,乳铁蛋白中剂量和高剂量组大鼠血清中 IGF-1( $P=0.007, P=0.003$ )、IGFBP-3( $P=0.030$ ,

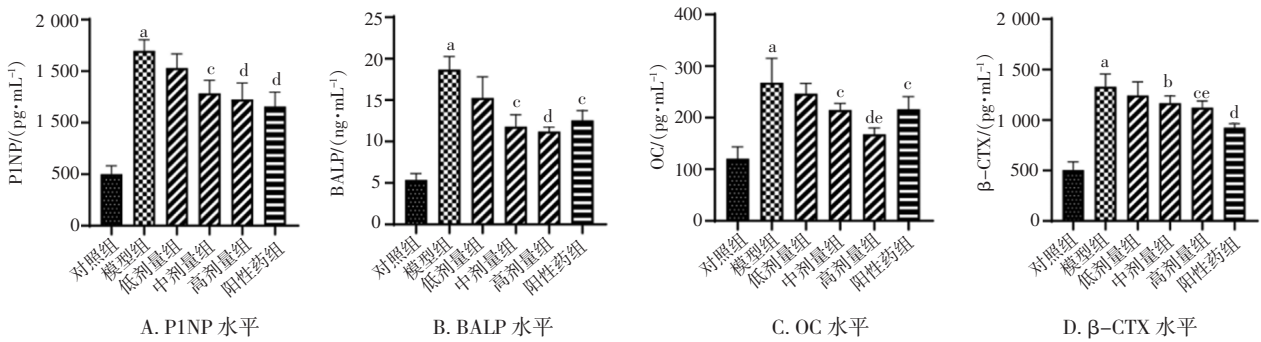


$P=0.007$ )、IGFBP-4 ( $P=0.020, P=0.009$ )、IGFBP-5 ( $P=0.040, P=0.008$ ) 水平均明显增加。与阳性药组比较, 乳铁蛋白高剂量组大鼠血清中 IGF-1 ( $P=0.010$ )、IGFBP-3 ( $P=0.020$ ) 和 IGF-BP-5 ( $P=0.030$ ) 水平升高, 但 IGFBP-4 ( $P=0.020$ ) 水平降低。采用单因素方差分析进行统计学分析, 差异具有统计学意义 ( $F_{IGF-1}=96.68, P_{IGF-1}=0.002; F_{IGFBP-3}=53.79, P_{IGFBP-3}=0.001; F_{IGFBP-4}=92.56, P_{IGFBP-4}=0.003; F_{IGFBP-5}=91.84, P_{IGFBP-5}=0.003$ ) (图 4, 表 3)。

2.4 乳铁蛋白对 GIOP 大鼠 PI3K-mTOR 信号的影响

与对照组比较, 模型组股骨组织中 IGF-1R ( $P>0.05$ )、p-

PI3K/PI3K ( $P>0.05$ )、p-Akt/Akt ( $P>0.05$ ) 和 p-mTOR ( $P>0.05$ ) 蛋白表达稍有升高, 但无统计学差异。与模型组比较, 乳铁蛋白中剂量组和高剂量组大鼠组织中 IGF-1R ( $P=0.020, P=0.006$ )、p-PI3K/PI3K ( $P=0.040, P=0.005$ )、p-Akt/Akt ( $P=0.003, P=0.007$ ) 和 p-mTOR ( $P=0.010, P=0.000$ ) 蛋白表达明显增加, 采用单因素方差分析进行统计学分析, 差异具有统计学意义 ( $F_{IGF-1R}=51.42, P_{IGF-1R}=0.002; F_{p-Akt/Akt}=118.2, P_{p-Akt/Akt}=0.001; F_{p-PI3K/PI3K}=111.4, P_{p-PI3K/PI3K}=0.002; F_{p-mTOR}=220.9, P_{p-mTOR}=0.003$ ) (图 5, 表 4)。



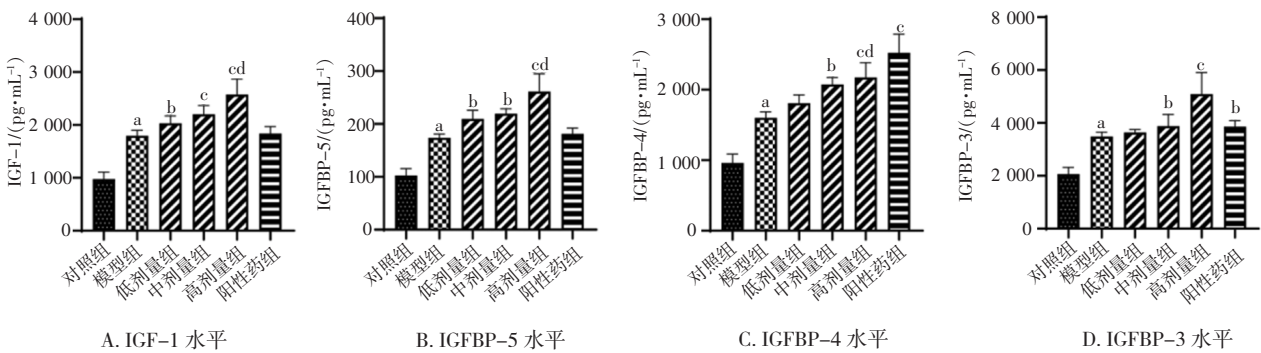
注: a, 与对照组比较,  $P<0.001$ ; b, 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c, 与模型组比较,  $P<0.01$ ; d, 与模型组比较,  $P<0.001$ ; e, 与阳性药组比较,  $P<0.05$

图 3 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠血清中骨代谢指标的影响

表 2 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠血清中骨代谢指标的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PINP/(pg·mL <sup>-1</sup> )	BALP/(ng·mL <sup>-1</sup> )	OC/(pg·mL <sup>-1</sup> )	β-CTX/(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照组 (n=5)	501.3.0 ± 79.36	5.363 ± 0.779	120.60 ± 22.96	503.80 ± 81.59
模型组 (n=5)	1 697.00 ± 109.50 <sup>a</sup>	18.680 ± 1.581 <sup>a</sup>	267.90 ± 47.10 <sup>a</sup>	1 329.00 ± 127.90 <sup>a</sup>
低剂量组 (n=5)	1 532.00 ± 135.30	15.250 ± 2.548	246.40 ± 19.93	1 243.00 ± 134.40
中剂量组 (n=5)	1 284.00 ± 126.70 <sup>c</sup>	11.780 ± 1.467 <sup>c</sup>	215.00 ± 12.97 <sup>c</sup>	1 168.00 ± 71.45 <sup>b</sup>
高剂量组 (n=5)	1 226.00 ± 159.70 <sup>d</sup>	11.200 ± 0.567 <sup>d</sup>	167.80 ± 12.42 <sup>b</sup>	1 123.00 ± 65.92 <sup>bc</sup>
阳性药组 (n=5)	1 158.00 ± 138.60 <sup>d</sup>	12.550 ± 1.187 <sup>c</sup>	216.10 ± 24.78 <sup>c</sup>	924.40 ± 40.27 <sup>d</sup>
F 值	90.170	92.760	42.750	106.300
P 值	0.002	0.001	0.004	0.003

注: a, 与对照组比较,  $P<0.001$ ; b, 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c, 与模型组比较,  $P<0.01$ ; d, 与模型组比较,  $P<0.001$ ; e, 与阳性药组比较,  $P<0.05$



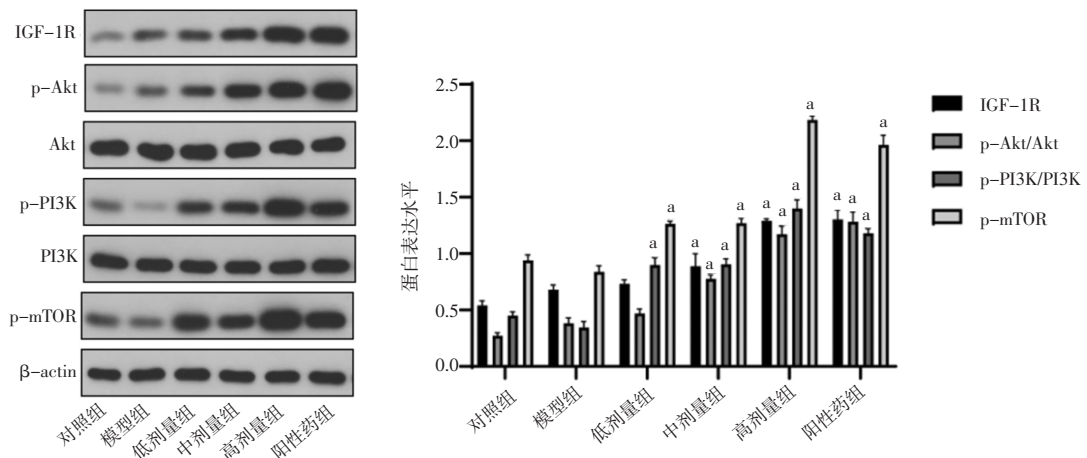
注: a, 与对照组比较,  $P<0.001$ ; b, 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c, 与模型组比较,  $P<0.01$ ; d, 与阳性药组比较,  $P<0.05$

图 4 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠血清 IGFBP/IGF-1 表达的影响

表 3 乳铁蛋白对骨质疏松大鼠血清 IGFBP/IGF-1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ; pg/mL)

组别	IGF-1	IGFBP-5	IGFBP-4	IGFBP-3
对照组 (n=5)	973.8 ± 134.2	102.600 ± 12.780	961.00 ± 126.30	2 060.0 ± 254.2
模型组 (n=5)	2 201.0 ± 168.9 <sup>a</sup>	173.900 ± 7.071 <sup>a</sup>	1 602.00 ± 85.70 <sup>a</sup>	3 484.0 ± 169.5 <sup>a</sup>
低剂量组 (n=5)	2 228.0 ± 133.6 <sup>b</sup>	209.700 ± 16.02 <sup>b</sup>	1 809.00 ± 117.70	3 640.0 ± 109.4
中剂量组 (n=5)	2 357.0 ± 250.3 <sup>c</sup>	219.600 ± 9.229 <sup>b</sup>	2 074.00 ± 98.81 <sup>b</sup>	3 879.0 ± 446.3 <sup>b</sup>
高剂量组 (n=5)	2 577.0 ± 290.3 <sup>cd</sup>	261.000 ± 33.830 <sup>cd</sup>	2 173.00 ± 211.80 <sup>cd</sup>	5 093.0 ± 809.8 <sup>c</sup>
阳性药组 (n=5)	1 795.0 ± 103.0	181.000 ± 11.280	2 523.00 ± 267.20 <sup>e</sup>	3 859.0 ± 225.8 <sup>b</sup>
F 值	96.680	91.840	92.560	53.790
P 值	0.002	0.003	0.003	0.001

注:a,与对照组比较,P<0.001;b:与模型组比较,P<0.05;c:与模型组比较,P<0.01;d:与模型组比较,P<0.001;e:与阳性药组比较,P<0.05



注:a,与模型组比较,P<0.05

图 5 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导性骨质疏松大鼠 PI3K/mTOR 信号的影响

表 4 乳铁蛋白对糖皮质激素诱导性骨质疏松大鼠 PI3K/mTOR 信号的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IGF-1R	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K	p-mTOR
对照组 (n=5)	0.542 ± 0.041	0.273 ± 0.026	0.450 ± 0.034	0.941 ± 0.047
模型组 (n=5)	0.680 ± 0.042	0.382 ± 0.048	0.346 ± 0.053	0.839 ± 0.054
低剂量组 (n=5)	0.731 ± 0.036	0.469 ± 0.041	0.898 ± 0.064 <sup>a</sup>	1.264 ± 0.023 <sup>a</sup>
中剂量组 (n=5)	0.889 ± 0.110 <sup>a</sup>	0.777 ± 0.034 <sup>a</sup>	0.904 ± 0.048 <sup>a</sup>	1.269 ± 0.042 <sup>a</sup>
高剂量组 (n=5)	1.290 ± 0.017 <sup>a</sup>	1.172 ± 0.070 <sup>a</sup>	1.400 ± 0.077 <sup>a</sup>	2.184 ± 0.036 <sup>a</sup>
阳性药组 (n=5)	1.303 ± 0.084 <sup>a</sup>	1.283 ± 0.087 <sup>a</sup>	1.180 ± 0.041 <sup>a</sup>	1.964 ± 0.086 <sup>a</sup>
F 值	51.420	118.200	111.400	220.900
P 值	0.002	0.001	0.002	0.003

注:a,与模型组比较,P<0.05

### 3 讨论

糖皮质激素是治疗自身免疫性和非感染性炎症性疾病的常用药物,随着其在临床的广泛应用,其副作用越来越备受关注,其中糖皮质激素诱导性骨质疏松就是其副作用之一。糖皮质激素治疗后数周其骨量开始流失,最初数月内流失迅速,每年可达 5%~15%,长期接受激素治疗的患者 GIOP 的发生率高达 30%~50%<sup>[2]</sup>。GIOP 的骨折阈值亦明显高于

其他原因所致骨质疏松。用糖皮质激素治疗者骨折发生率比不用激素者高 1.3~2.6 倍,椎体骨折风险增加 4 倍,髌部和桡骨骨折增加 2 倍<sup>[9]</sup>。目前公认的一线抗 GIOP 药物双膦酸盐为骨吸收抑制剂,但 GIOP 主要病理生理为骨形成减少为主,长期用药可能导致过度抑制骨转换,抑制骨重塑,导致骨损伤不能及时修复引起自发性骨折<sup>[9]</sup>。因此寻找一个安全、有效且针对发病机制的抗 GIOP 药物成为近年研究热点。乳铁蛋白是存在于人和动物体内的一种天然蛋白质,大量的体内外研究表明乳铁蛋白可以增加骨

形成,改善骨微结构,具有潜在抗骨质疏松活性。但大多数研究集中于原发性骨质疏松症的防治,关于乳铁蛋白防治 GIOP 的研究较少。

既往文献研究发现给予乳铁蛋白灌胃能够改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨质流失和骨形态结构。Guo HY 等<sup>[10]</sup>研究发现,乳铁蛋白灌胃给予卵巢切除大鼠 3 个月可以预防骨量减少,增加 BMD 和骨骼机械强度,且骨形成增加和骨吸收减少。高威和张巧<sup>[11]</sup>给予去卵巢大鼠乳铁蛋白灌胃 12 周,发现大鼠股骨近端、脊柱 BMD 明显升高,提示乳铁蛋白能防治绝经后骨质疏松。本研究组前期研究发现给予大鼠注射糖皮质激素,同时给予乳铁蛋白灌胃,发现乳铁蛋白能改善大鼠 BMD 及骨微结构,增加成骨细胞数目和降低破骨细胞,提示乳铁蛋白有预防 GIOP 发生的作用<sup>[7]</sup>。本研究给予已经发生 GIOP 的大鼠乳铁蛋白灌胃,结果提示 BMD 增高,Micro-CT 分析骨微结构改善,表明乳铁蛋白对改善 GIOP 大鼠骨微结构及 BMD 具有潜在治疗作用。

GIOP 导致的骨折风险与 BMD 无线性相关。GIOP 患者 BMD 未达 BMD 诊断时也可发生骨折。因此,BMD 不再是评估 GIOP 骨折风险的唯一指标。骨转换指标是 GIOP 骨折风险的预测因子,骨转换标志物和 BMD 联合检测可更好地预测骨折风险<sup>[12]</sup>。目前,国际上多推荐 P1NP 为首选骨形成标志物, $\beta$ -CTX 为首选骨吸收标志物。糖皮质激素对骨代谢的影响为骨形成下降,但应用激素早期可出现一过性骨转换增加<sup>[9]</sup>。糖皮质激素引起骨转换升高,即停药后 3 个月仍未下降,提示骨代谢失衡,骨转换增加,骨吸收大于骨形成,导致骨质疏松发生<sup>[13]</sup>。本研究发现给予地塞米松干预后,模型组大鼠血清中骨代谢指标 P1NP、BALP、OC 和  $\beta$ -CTX 水平升高,提示骨转换升高,与前述研究一致。乳铁蛋白治疗后大鼠血清中 P1NP、BALP、OC 和  $\beta$ -CTX 水平均下降,提示乳铁蛋白能抑制异常升高的骨转换而改善骨代谢,其抑制骨转换作用可能与乳铁蛋白抑制破骨细胞分化和成熟有关<sup>[14]</sup>。阳性药组  $\beta$ -CTX 水平下降幅度大于乳铁蛋白组,提示乳铁蛋白抑制骨吸收作用可能弱于阿仑膦酸钠。但两者 BMD 及骨微结构改善无统计学差异,推测乳铁蛋白可能在骨形成指标改善方面优于阿仑膦酸钠,后续可进一步延长实验时间观察糖皮质激素导致的高骨转换期过后乳铁蛋白对骨形成指标的影响。另外,Bharadwaj S 等<sup>[15]</sup>给予健康的绝经后女性口服富含核糖核酸的乳铁蛋白,发现补充富含核糖核酸乳铁蛋白组骨形成

增加,骨吸收明显减少,骨代谢平衡在短时间内恢复,进一步从临床角度确定了乳铁蛋白在人体中的促骨形成、抑制骨吸收的潜在作用。

成骨细胞是骨形成过程中的重要细胞。有研究用芯片技术探讨乳铁蛋白对成骨细胞基因表达的改变,发现人原代成骨细胞 IGF-1 mRNA 表达明显上调<sup>[16]</sup>。Hou JM 等<sup>[17]</sup>研究表明用不同浓度(0.1~1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的乳铁蛋白干预大鼠原代成骨细胞,出现浓度依赖性的 IGF-1 和 IGF-1R mRNA 表达上调。本研究也发现乳铁蛋白呈剂量依赖性增加血清中 IGF-1 含量和组织中 IGFBPs 表达,与前述研究相似。IGFBPs 即胰岛素样生长因子结合蛋白,具有调节 IGF-1 和 IGFR 的作用,血浆中及细胞外的 IGFs 几乎全部与高亲和力的 IGFBPs 结合<sup>[18-19]</sup>。骨组织 IGFBP-3 和 IGFBP-5 可促进 IGF 活性,IGFBP-3 和 IGFBP-5 可协同 IGF-1 促进成骨细胞增殖;相反地,IGFBP-4 可以抑制成骨细胞活性<sup>[20-22]</sup>。本研究发现乳铁蛋白呈剂量依赖性提高 GIOP 大鼠血清中 IGF-1、IGFBP-3、IGFBP-4、IGFBP-5 水平,说明乳铁蛋白激活了 IGF-1 及 IGFBPs 系统。但乳铁蛋白高剂量组 IGF-1、IGFBP-3 和 IGFBP-5 水平高于阳性药组,而 IGFBP-4 水平低于阳性药组。因为 IGFBP-3 和 IGFBP-5 主要与骨形成相关,而 IGFBP-4 与骨吸收密切相关,这些结果进一步说明乳铁蛋白侧重激活 IGF-1 及 IGFBPs 系统引起骨形成增加,而阿仑膦酸钠通过降低骨转换,抑制骨吸收治疗骨质疏松,两者指标的不同变化说明两者之间的不同抗骨质疏松机制。

有研究发现地塞米松可通过抑制 Akt/mTORC1 信号通路诱导成骨细胞连接蛋白 43(Cx43)降解导致骨损伤<sup>[23]</sup>。也有研究发现地塞米松可以抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导破骨细胞自噬增加,导致骨丢失<sup>[24]</sup>。糖皮质激素不仅影响成骨细胞及破骨细胞,也会影响骨细胞。骨细胞对糖皮质激素的不良影响非常敏感,暴露于低剂量 GCs 的骨细胞发生自噬,而暴露于高剂量 GCs 或长时间 GCs 导致骨细胞凋亡,从而导致骨损伤<sup>[25]</sup>。大剂量 Dex 通过抑制 Akt/mTORC1 信号通路诱导骨细胞自噬,并导致 Cx43 降解,破坏细胞与细胞间通讯,导致骨损伤<sup>[26]</sup>。IGF-1 是一种 Akt 激活剂<sup>[27]</sup>,可通过激活 Akt 磷酸化减弱 Dex 诱导的自噬和 Cx43 降解,从而保护骨组织<sup>[26]</sup>。本研究发现乳铁蛋白不仅促进大鼠血清中 IGF-1 释放,同时增加 IGF-1R、p-PI3K、p-Akt 和 mTOR 表达,与前述研究一致,推测乳铁蛋白有可能通过上



调 IGF-1 作用于 IGF-1R,然后激活 PI3k/Akt/mTOR 引起成骨细胞增殖,抑制成骨细胞凋亡,抑制骨细胞及成骨细胞自噬及凋亡起到抗骨质疏松作用。本研究发现阿仑磷酸钠也能够激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,这可能与骨吸收过程有关,需要后续进一步探究。

综上所述,本研究发现乳铁蛋白能够降低骨转换,抑制骨吸收,同时能促进骨形成,改善糖皮质激素性骨质疏松大鼠的骨代谢和骨形态。进一步发现乳铁蛋白可能通过释放 IGF-1 和激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节骨形成过程和成骨细胞功能,具有潜在的抗骨质疏松作用。但是,乳铁蛋白是否可作用于其他信号通路从而影响骨代谢仍需进一步探索。

## 参 考 文 献

- [1] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy [J]. JAMA, 2001, 285(6): 785-795.
- [2] 陈家伦. 临床内分泌学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2011: 1483-1485.
- [3] Chen JL. Clinical endocrinology[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2011: 1483-1485.
- [4] Ghodsi M, Larijani B, Keshkhar AA, et al. Mechanisms involved in altered bone metabolism in diabetes; a narrative review[J]. J Diabetes Metab Disord, 2016, 15: 52.
- [5] Bakker AD, Gakes T, Hogervorst JM, et al. Mechanical stimulation and IGF-1 enhance mRNA translation rate in osteoblasts via activation of the Akt-mTOR pathway[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(6): 1283-1290.
- [6] Bakker AD, Jaspers RT. IL-6 and IGF-1 signaling within and between muscle and bone: how important is the mTOR pathway for bone metabolism?[J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(3): 131-139.
- [7] Cornish J, Callon KE, Naot D, et al. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*[J]. Endocrinology, 2004, 145: 4366-4374.
- [8] 顾燕, 张巧. 乳铁蛋白对糖皮质激素性骨质疏松大鼠骨密度及骨形态学的影响[J]. 中华骨质疏松及骨矿物质杂志, 2010, 3(4): 269-275.
- [9] Gu Y, Zhang Q. Effects of lactoferrin on bone mineral density and bone structure in glucocorticoid-induced osteoporosis in rats[J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res, 2010, 3(4): 269-275.
- [10] Hou JM, Xue Y, Lin QM. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(10): 1277-1284.
- [11] 徐岑. 骨质疏松症[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2011: 203-211.
- [12] Xu C. Osteoporosis[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2011: 203-211.
- [13] Guo HY, Jiang L, Ibrahim SA, et al. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats[J]. Nutr, 2009, 139(5): 958-964.
- [14] 高威, 张巧. 乳铁蛋白对去卵巢大鼠骨密度和骨形态学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(9): 637-640.
- [15] Gao W, Zhang Q. Effect of lactoferrin on bone mineral density and thighbone tissue morphology in ovariectomized rats[J]. Chin J Osteoporos, 2009, 15(9): 637-640.
- [16] Vilaca T, Gossiel F, Eastell R. Bone turnover markers: use in fracture prediction[J]. J Clin Densitom, 2017, 20(3): 346-352.
- [17] Shen G, Ren H, Qiu T, et al. Effect of glucocorticoid withdrawal on glucocorticoid inducing bone impairment[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4): 1059-1064.
- [18] Lorget F, Clough J, Oliveira M, et al. Lactoferrin reduces *in vitro* osteoclast differentiation and resorbing activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(2): 261-266.
- [19] Bharadwaj S, Naidu AG, Betageri GV, et al. Milk ribonuclease-enriched lactoferrin induces positive effects on bone turnover markers in postmenopausal women[J]. Osteoporos Int, 2009, 20(9): 1603-1611.
- [20] Cornish J, Naot D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton[J]. Biometals, 2010, 23(3): 425-430.
- [21] Hou JM, Chen EY, Wei SC, et al. Lactoferrin inhibits apoptosis through insulin-like growth factor 1 in primary rat osteoblasts[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(4): 523-530.
- [22] Kanazawa I. Interaction between bone and glucose metabolism[J]. Endocr J, 2017, 64(11): 1043-1053.
- [23] Minchenko DO, Tsybmal DO, Davydov VV, et al. Expression of genes encoding IGF1, IGF2, and IGF2BP3 in blood of obese adolescents with insulin resistance[J]. Endocr Regul, 2019, 53(1): 34-45.
- [24] Böker J, Völzke H, Nauck M, et al. Associations of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 with bone quality in the general adult population[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2018, 88(6): 830-837.
- [25] Molagoda IMN, Jayasingha JACC, Choi YH, et al. Fermented oyster extract promotes insulin-like growth factor-1-mediated osteogenesis and growth rate[J]. Mar Drugs, 2020, 18(9): E472.
- [26] Gerharz EW, Gasser JA, Mosekilde L, et al. Skeletal growth and long-term bone turnover after enterocystoplasty in a chronic rat model [J]. BJU Int, 2003, 92(3): 306-313.
- [27] Shen C, Kim MR, Noh JM, et al. Glucocorticoid suppresses connexin 43 expression by inhibiting the Akt/mTOR signaling pathway in osteoblasts[J]. Calcif Tissue Int, 2016, 99(1): 88-97.
- [28] Fu LJ, Wu W, Sun XJ, et al. Glucocorticoids enhanced osteoclast autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Calcif Tissue Int, 2020, 107(1): 60-71.
- [29] Yao W, Dai W, Jiang JX, et al. Glucocorticoids and osteocyte autophagy[J]. Bone, 2013, 54(2): 279-284.
- [30] Gao J, Cheng TS, Qin A, et al. Glucocorticoid impairs cell-cell communication by autophagy-mediated degradation of connexin 43 in osteocytes[J]. Oncotarget, 2016, 7(19): 26966-26978.
- [31] Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy[J]. Cell, 2004, 117: 399-412.