

## 骨膳食补充剂对低钙饲喂大鼠骨性能的调节作用

邵茹<sup>1</sup>, 赵显峰<sup>2</sup>, 毛江毅<sup>2</sup>, 唐雪<sup>1\*</sup>, 王旖<sup>2\*</sup>, 周鹏<sup>3</sup>

<sup>1</sup>江南大学食品学院 江苏无锡 214122

<sup>2</sup>达能开放科研中心 上海 200135

<sup>3</sup>江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室 江苏无锡 214122)

**摘要** 目的:探究一款由乳清蛋白、亮氨酸、柠檬酸钙和维生素 D<sub>3</sub> 组成的骨膳食补充剂对低钙饲喂大鼠骨性能的调节作用。40 只 SD 雌性大鼠被随机分为正常组、低钙模型组、碳酸钙组、柠檬酸钙+VD<sub>3</sub> 组和补充剂组。方法:连续灌胃 90 d 后,测定大鼠生长性能、股骨生物力学参数和股骨微观结构、钙代谢水平、骨形成和骨吸收标志物以及肌细胞因子虹膜素(Irisin)水平。RT-PCR 测定 ALP、OC 及调控其表达水平的关键基因的 mRNA 表达水平。结果:与正常组相比,低钙组大鼠体质量和脏器指数无显著性变化( $P > 0.05$ ),骨密度和最大载荷极显著降低( $P < 0.01$ );同时伴随血清钙浓度显著下降( $P < 0.05$ ),骨吸收作用增强和骨矿流失严重。与低钙组相比,灌胃不同钙制剂能够显著增加大鼠股骨密度、最大载荷( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )和血清中骨形成标志物(碱性磷酸酶和骨钙素)的含量;骨膳食补充剂不仅对股骨长度、股骨干重、最大挠度具有显著提高作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而且在增强骨密度、恢复骨微观结构和骨形成产物含量的效果要优于柠檬酸钙+VD<sub>3</sub> 和碳酸钙( $P < 0.01$ )。此外,骨膳食补充剂能有效提高缺钙大鼠腓肠肌质量、腿肌率及前肢拉力( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),增强肌肉对骨骼的生物力学作用。通过提高肌肉分泌 Irisin 激活 Wnt 信号通路,上调 Runx2、ALP 和 OC 表达水平,刺激成骨细胞增殖、分化,增强骨形成和矿化。结论:骨膳食补充剂可激活 Wnt 信号通路增加骨形成,抑制骨矿流失,并恢复骨微观结构,提高骨密度和骨强度,改善骨质疏松,这可能与其提高肌肉质量和 Irisin 分泌,增强肌肉对骨骼的生物力学作用有关。

**关键词** 骨质疏松; 乳清蛋白; 亮氨酸; 骨膳食补充剂; 骨代谢

文章编号 1009-7848(2024)07-0182-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.07.018

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种全身性骨病,主要表现为骨密度和骨质量下降,骨微结构破坏以及骨脆性增加<sup>[1]</sup>。骨骼受严格的机制调节以维持其动态平衡,然而,随着年龄增长,极易受内外环境因素影响,出现骨吸收作用增强、骨量下降以及骨微结构变化,导致骨质疏松,严重时会发生骨折<sup>[2]</sup>。近年来,骨质疏松症与肌肉之间的关系受到广泛关注<sup>[3]</sup>。研究发现,肌肉减少症患者更容易患有骨质疏松,发生骨折<sup>[4]</sup>。临床调查发现,肌少导致的骨质疏松症的患病率在 37%左右,且更容易发生脆性骨折<sup>[5]</sup>。骨密度与肌肉质量成正比,肌肉质量减少会导致骨密度下降<sup>[6]</sup>。因此,骨骼肌与骨骼健康紧密相关,肌肉减少是骨质疏松症发病的重要因素之一。

目前,补充钙和维生素 D 是维持骨密度、减少

骨质流失的常见膳食干预措施。一方面,通过激活钙离子通道,促进钙吸收和钙贮留,维持钙稳态,增加骨矿化<sup>[7]</sup>。另一方面,羟化维生素 D(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)是维生素 D 在体内的主要活性形式,与肠道上皮细胞的维生素 D 受体(Vitamin D receptors, VDR)结合后,可有效刺激肠道钙吸收<sup>[8]</sup>。然而,钙的生物利用率受年龄、钙类型及饮食中过多的植酸、鞣酸、纤维素等影响,使得单纯补充钙和维生素 D 对于减少骨质流失作用十分有限<sup>[9]</sup>,需从肌肉与骨骼健康相互作用的角度深入思考。

蛋白质和必需氨基酸作为人体重要的营养素,在促进肌肉蛋白合成,维持骨骼健康方面具有重要作用。从牛乳中分离的乳清蛋白,不仅营养价值极高且来源广泛,已普遍用于蛋白粉、运动饮料和营养补充剂。相比于酪蛋白,乳清蛋白更能有效刺激蛋白质合成作用,减缓由于年龄变化而带来的肌肉减少<sup>[10]</sup>,参与成骨细胞与破骨细胞的骨代谢平衡<sup>[11]</sup>。亮氨酸既是蛋白质合成底物,也可作为信号分子参与调控细胞生长、蛋白质周转。对亮氨

收稿日期: 2023-07-12

第一作者: 邵茹,女,硕士生

通信作者: 唐雪 E-mail: tangxue@jiangnan.edu.cn

王旖 E-mail: Yi.WANG@danone.com

酸应用于老龄化骨骼肌代谢的研究发现, 饲喂 4.45%亮氨酸的日粮, 可显著提高老年大鼠肌肉蛋白合成速度<sup>[12]</sup>。本文在已有钙制剂和维生素 D 的基础上, 通过添加乳清蛋白和亮氨酸, 复配具有改善骨骼健康的新型补充剂。以低钙大鼠模型为研究对象, 探究其对钙代谢水平、骨骼和肌肉指标以及血清相关指标的影响, 以期明确该膳食补充剂改善骨骼健康的作用, 以及相关产品研发和应用, 提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

试验原料: 骨膳食补充剂, 含有 86.82%乳清蛋白、10.96%柠檬酸钙、2.19%L-亮氨酸、0.03%维生素 D<sub>3</sub>。

主要试剂: 低钙饲料(150 mg/kg), 江苏协同生物医药生物工程有限公司; 钙离子测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(Osteocalcin, OC)、酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、I 型胶原 C 端肽(C-Telopeptides-1, CTX-1)、Irisin 酶联反应试剂盒, 厦门慧嘉生物科技有限公司; RN54-EASYspin Plus 骨组织 RNA 快速提取试剂盒, 北京艾德莱生物科技有限公司; HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper) 逆转录试剂盒、HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR, 南京诺维赞生物科技股份有限公司; PCR 引物, 苏州金唯智生物科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

M5 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; 5804R 台式高速冷冻离心机, Thermo Fisher; 微量移液器, 德国 Eppendorf 公司; MPI-B 型化学发光检测仪、电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; R686VLT 型超低温冰箱, 美国 INVETRO 公司; 5804R 台式高速冷冻离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; Quantum GX Micro-CT, 美国珀金埃尔默股份有限公司; TA-XT 质构仪, 英国 Stable Micro System。

### 1.3 动物与分组

40 只 4 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司(生产许可证号: SYXK(苏)2021-0056), 饲养于江南大学实验动物中心 SPF 级别隔离屏障环境, 饲养温度为 21~25 °C、相对湿度 40%~60%, 光照周期为昼夜交替 12 h/12 h, 自由采食、饮水, 每周称量并记录体质量和采食量。所有操作均符合江南大学动物伦理委员会要求。

大鼠适应性饲养 1 周后随机分组: 正常组, 低钙模型组, 碳酸钙组, 柠檬酸钙+VD<sub>3</sub> 组(10.96%柠檬酸钙和 0.03%维生素 D<sub>3</sub>), 补充剂组 [3.8 g/kg bw, 相当于成人(60 kg)推荐量的 10 倍], 其中碳酸钙组、柠檬酸钙+VD<sub>3</sub> 组和补充剂组钙水平相同。各组连续灌胃 90 d, 灌胃体积为 1 mL/100 g bw, 每周对大鼠进行称重, 观察其体质量变化情况, 随时调整灌胃体积。整个期间除正常组饲喂普通饲料外, 其余组均饲喂低钙饲料, 具体方案如表 1 所示。

表 1 大鼠分组及灌胃情况

Table 1 Rat grouping and gavage

组别	饲料种类	处理方法及剂量	大鼠数量/只
正常组	普通饲料	灌胃等体积去离子水	8
低钙模型组	低钙饲料	灌胃等体积去离子水	8
碳酸钙组	低钙饲料	灌胃 0.21 g/kg bw 碳酸钙	8
柠檬酸钙+VD <sub>3</sub> 组	低钙饲料	灌胃 0.42 g/kg bw 柠檬酸钙+维生素 D <sub>3</sub>	8
补充剂组	低钙饲料	灌胃 3.8 g/kg bw 受试物	8

大鼠宰杀前禁食 12 h, 腹腔注射 1%的戊巴比妥钠溶液麻醉, 心脏取血后 4 °C, 5 000×g 离心 15 min 取上清液得到血清, -80 °C 保存。大鼠处死后, 取胸腺、肝脏、脾脏、肾脏、左右两侧比目鱼肌和腓

肠肌称重后, 置于 -80 °C 保存。左右两侧股骨剥离后, 左侧股骨放入 10 mL 离心管中, 1 周内 4 °C 保存, 测定骨力学参数, 右侧股骨保存于 -80 °C 环境中, 用于其它指标测定。

## 1.4 实验方法及相关指标测定

1.4.1 钙代谢平衡实验 实验结束前1周大鼠饲养于代谢笼,收集36 h尿液、粪便并记录采食量。测定饲料、粪便和尿液中的钙含量。其中,饲料和粪便钙含量按照《食品安全国家标准 食品中钙的测定》(GB 5009.92-2016)进行检测,样品采用微波消解后测定。尿钙含量按照钙测定试剂盒说明书测定。钙吸收和钙贮留率计算公式如下:

$$\text{钙吸收率}(\%) = (m_{\text{摄入钙}} - m_{\text{粪钙}}) / m_{\text{摄入钙}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{钙贮留率}(\%) = (m_{\text{摄入钙}} - m_{\text{粪钙}} - m_{\text{尿钙}}) / m_{\text{摄入钙}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.2 大鼠股骨骨密度测定 左侧股骨用于Micro-CT测定,设置拍摄条件:扫描电压90 kV,电流88  $\mu$ A,FOV为86 mm,高分辨率扫描方式,扫描时间为14 min,采用1 mm Cu滤波器。数据及图像分析采用仪器自带软件。所有骨骼分析部位体积参数相同,均为股骨远心端生长板往上。

1.4.3 股骨生物力学测定 使用TA-XT质构仪进行测定,采用三点弯曲试验方法,选用剪切探头,跨距设置16 mm,将左侧股骨水平放置,前侧表面朝上,探头以速度为1 mm/s向下压缩,直至股骨断裂,测量最大载荷和最大挠度。

1.4.4 大鼠前肢拉力测定 使用大鼠抓力仪器测定前肢拉力,使大鼠前肢抓牢拉力杆,抓住尾巴平稳地向后拉直至前肢松开,记录最大抓力,每组重复3次。

1.4.5 骨钙、血清钙、骨骼和肌肉相关指标测定 骨钙测定前,使用咬骨钳称取股骨中部0.1 g左右进行消化和微波消解,方法严格按照《食品安全国家标准 食品中钙的测定》(GB 5009.92-2016)进行检测。血清钙含量测定按照南京建成钙离子检测试剂盒说明书操作,ALP、OC、TRAP-5、CTX-1、Irisin的测定均按照酶联免疫吸附试剂盒说明书操作。

1.4.6 骨代谢相关信号通路基因表达测定 按照RNA柱式提取试剂盒说明书操作,提取股骨总RNA。用nanodrop测定浓度和纯度,选取 $A_{260}/A_{280}$ 在1.8~2.0的合格样品进行逆转录,整个过程按照试剂盒说明书进行。

引物主要参照NCBI网站信息库信息筛选并评分后得到,通过实时荧光定量PCR进行扩增,测定模板Ct值,以 $\beta$ -actin为内参进行相对定量。引物序列如表2所示。

表2 用于测量mRNA表达的引物序列

Table 2 Primers used in the measurement of mRNA expression

名称	上游 5'-3'	下游 5'-3'
$\beta$ -actin	ACGTTGACATCCGTAAAGACC	AGGATAGAGCCACCAATCCAC
ALP	ATCGGAACAACCTGACTGACC	CCTGCCTCCTTCCACTAGCAA
OCN	GCAAAGCCCAGCGACTCTGA	TAGCGCCGAGTCTATTACC
Runx2	TCTGAGCACAGTCCATGCAG	AAGAGGCTGTTTGACGCCAT

## 1.5 数据分析

所有实验结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,采用单因素方差(One-way ANOVA)分析、Tukey检验进行组间显著性差异分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示具有极显著差异,使用GraphPad Prism 9.0作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 骨膳食补充剂对大鼠体质量、体长、采食量和脏器指数的影响

如表3所示,与正常组相比,低钙组大鼠体质量、

体长和采食量虽有降低趋势但无显著性差异( $P > 0.05$ );各干预组采食量无显著性变化( $P > 0.05$ ),补充剂组体质量和体长有增加趋势,其中体长显著高于低钙组( $P < 0.05$ )。此外,各组肝脏指数、脾脏指数和肾脏指数无显著性差异( $P > 0.05$ ),与低钙组相比,补充剂组胸腺指数显著增加( $P < 0.05$ )。上述结果表明,骨膳食补充剂有促进体长,提高胸腺指数的作用。

### 2.2 骨膳食补充剂对股骨骨密度和生物力学的影响

骨力学参数可以反映缺钙对骨骼的影响。如

表 4 所示, 低钙饲喂使大鼠骨密度和最大载荷极显著降低( $P<0.01$ ), 改变了骨力学参数<sup>[13]</sup>。与低钙组相比, 各干预组在骨密度、最大载荷均有显著性增加( $P<0.05, P<0.01$ ), 柠檬酸钙与维生素 D<sub>3</sub> 联用有利于增强股骨最大载荷, 而补充剂在股骨长度、股骨干重、最大挠度和骨骼干重均有显著提高作

用( $P<0.05, P<0.01$ ), 尤其是增强骨密度的效果要优于柠檬酸钙+VD<sub>3</sub> 以及碳酸钙( $P<0.01$ ), 提示补充剂干预有利于大鼠在缺钙状态下的骨基质矿物质沉积量和骨胶原含量升高。上述结果表明, 骨膳食补充剂能够有效抑制低钙饮食所造成的骨质流失, 增加骨密度, 提高骨强度。

表 3 大鼠体质量、体长、采食量及脏器指数

Table 3 Rat body weight, body length, feed intake and organ index

组别	正常组	低钙模型组	碳酸钙组	柠檬酸钙+VD <sub>3</sub> 组	补充剂组
体质量/g	312.84 ± 4.46	295.01 ± 7.33	317.81 ± 12.64	311.40 ± 15.95	336.11 ± 10.57
体长/cm	18.37 ± 0.20	17.50 ± 0.15	18.42 ± 0.27	18.80 ± 0.46	19.30 ± 0.29 <sup>#</sup>
采食量/(g/d)	16.09 ± 0.24	15.58 ± 0.52	15.61 ± 0.45	15.59 ± 0.51	15.91 ± 0.40
胸腺指数/%	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.12 ± 0.01 <sup>#</sup>
肝脏指数/%	2.60 ± 0.06	2.42 ± 0.14	2.43 ± 0.12	2.53 ± 0.17	2.65 ± 0.16
脾脏指数/%	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.06	0.18 ± 0.05
肾脏指数/%	0.65 ± 0.05	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.09	0.64 ± 0.08	0.64 ± 0.14

注: 数据以“平均值±标准差”表示,  $n=8$ 。与正常组相比, \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ ; 与低钙模型组相比, <sup>#</sup>,  $P<0.05$ , <sup>##</sup>,  $P<0.01$ ; 与柠檬酸钙+VD<sub>3</sub> 组相比, <sup>△</sup>,  $P<0.05$ , <sup>△△</sup>,  $P<0.01$ , 下同。

表 4 大鼠股骨力学参数和 Micro-CT 扫描

Table 4 Rat femoral mechanics parameters and Micro-CT scan

组别	正常组	低钙模型组	碳酸钙组	柠檬酸钙+VD <sub>3</sub> 组	补充剂组
骨密度/(g/mm <sup>3</sup> )	1.26 ± 0.02	1.11 ± 0.02**	1.21 ± 0.01 <sup>#</sup>	1.22 ± 0.01 <sup>##</sup>	1.31 ± 0.02 <sup>###△△</sup>
股骨长度/mm	35.80 ± 0.21	35.30 ± 0.18	35.74 ± 0.46	36.52 ± 0.60	36.87 ± 0.44 <sup>#</sup>
外长骨径/mm	3.93 ± 0.05	3.82 ± 0.04	3.94 ± 0.21	3.95 ± 0.33	4.14 ± 0.10
外短骨径/mm	3.15 ± 0.10	3.10 ± 0.15	2.96 ± 0.20	3.11 ± 0.29	3.11 ± 0.17
最大载荷/g	14 402.75 ± 272.71	10 846.67 ± 243.72*	13 752.48 ± 478.05 <sup>#</sup>	14 292.13 ± 743.65 <sup>#</sup>	16 153.38 ± 734.65 <sup>##</sup>
最大挠度/mm	1.50 ± 0.06	1.39 ± 0.16	1.48 ± 0.19	1.73 ± 0.31	1.88 ± 0.11 <sup>##</sup>
股骨干重/g	0.73 ± 0.03	0.63 ± 0.02	0.72 ± 0.03	0.73 ± 0.02	0.76 ± 0.02 <sup>#</sup>

经 Micro-CT 分析股骨远心端可获得骨小梁形态和网状结构。结果如图 1 所示, 与正常组相比, 低钙饲喂使大鼠股骨远心端骨小梁形态和网状结构受到破坏, 出现较大连接空洞; 而经补充剂

干预后, 股骨微观结构得到明显改善, 骨小梁连接度明显增加, 网状结构更为密集。股骨微观结构图像表明, 补充剂能有效改善低钙饮食造成的骨微结构破坏, 明显修复骨骼功能。

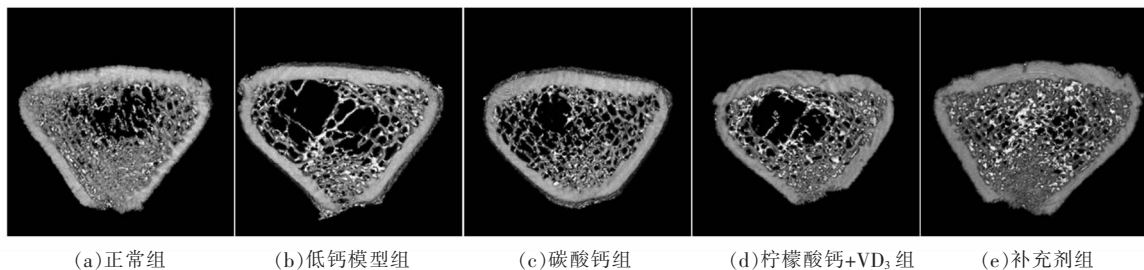


图 1 骨膳食补充剂对骨小梁三维立体重建图的影响

Fig.1 Effects of bone dietary supplements on three-dimensional reconstruction of bone trabeculae

### 2.3 骨膳食补充剂对大鼠钙吸收和贮留率的影响

如图2所示,与正常组相比,低钙饲喂导致大鼠钙吸收和钙贮留率显著升高( $P<0.01$ ),这是由于机体处于极度缺钙状态而发生的补偿性反应<sup>[14]</sup>。

碳酸钙组、柠檬酸钙+VD<sub>3</sub>组和补充剂组有相同的钙摄入,而灌胃补充剂可提高钙吸收和贮留率( $P<0.01$ ),提示骨膳食补充剂具有较高的促钙吸收和贮留能力。

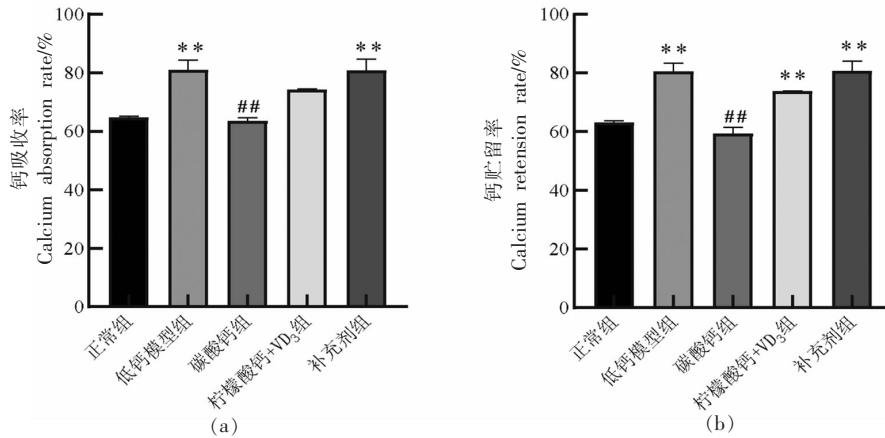


图2 骨膳食补充剂对大鼠的钙吸收和贮留率的影响

Fig.2 Effect of bone dietary supplements on calcium absorption and retention in rats

### 2.4 骨膳食补充剂对大鼠股骨钙含量、血清钙、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>浓度的影响

如图3所示,低钙饲喂使大鼠血清钙浓度显著下降( $P<0.01$ ),股骨钙含量和1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>浓度有降低趋势,无显著性改变( $P>0.05$ );各干预组

均使大鼠血钙和1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>浓度得到不同程度的恢复,其中补充剂组骨钙含量最高( $P<0.05$ )。综合分析,在相同钙摄入条件下,补充剂可达到最大促钙吸收作用的同时增加血清维生素D的水平。

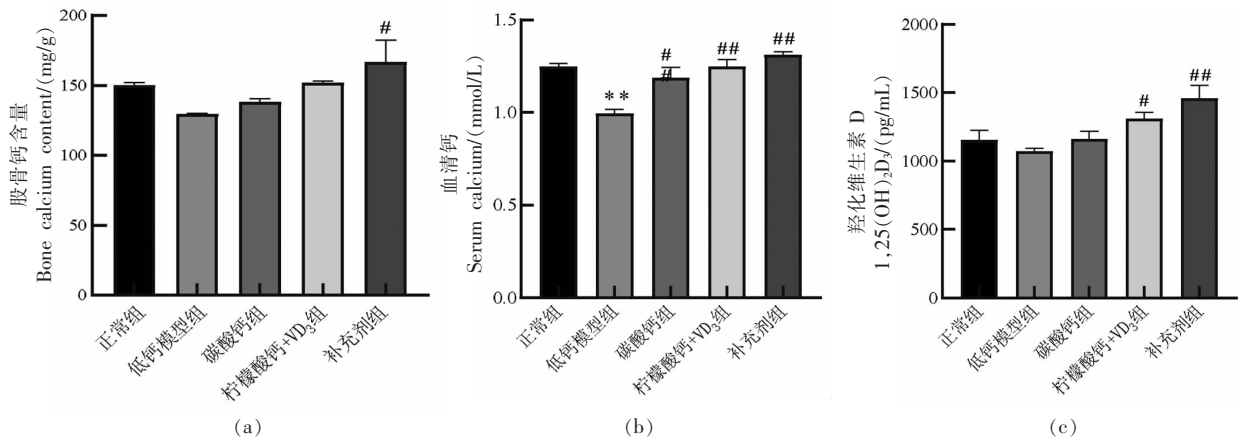


图3 大鼠骨钙、血清钙、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>浓度水平

Fig.3 Bone calcium, serum calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentration levels in rats

### 2.5 骨膳食补充剂对大鼠骨形成的影响

ALP和OC是由成骨细胞在骨形成和骨重塑过程中分泌的表征骨形成强弱的重要产物<sup>[15]</sup>。如图4所示,与正常组相比,低钙组大鼠血清ALP

显著降低( $P<0.05$ ),OC含量亦有降低趋势( $P>0.05$ ),说明骨形成能力减弱;柠檬酸钙+VD<sub>3</sub>和补充剂灌胃恢复血清ALP浓度效果好于碳酸钙( $P<0.01$ ),且补充剂组显著高于柠檬酸钙+VD<sub>3</sub>组( $P<$

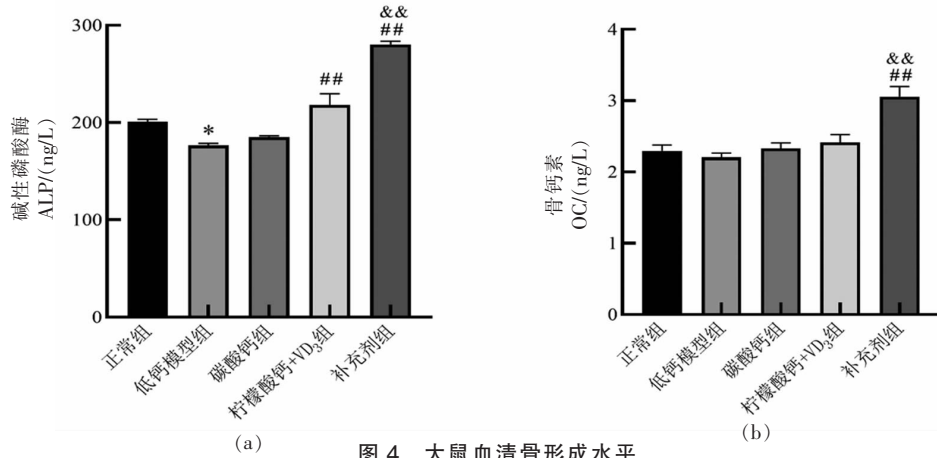


图 4 大鼠血清骨形成水平  
Fig.4 Serum bone formation level in rats

0.01), 提示骨膳食补充剂刺激成骨细胞, 促进骨质生成, 与其含有乳清蛋白和亮氨酸有关。

2.6 骨膳食补充剂对大鼠骨吸收的影响

TRAP 是骨吸收过程中由破骨细胞分泌的重要产物, 表征骨吸收作用的强弱; CTX-1 在骨吸收作用增强, 骨骼发生降解时被释放进入血液。如图 5 所示, 与正常组相比, 低钙组血清 TRAP 浓度略

有升高 ( $P>0.05$ ), CTX-1 浓度显著升高 ( $P<0.05$ ), 说明骨吸收作用增强; 与低钙组相比, 各干预组血清 TRAP、CTX-1 浓度均有显著降低的趋势, 且补充剂组作用更显著 ( $P<0.01$ )。上述结果表明, 长期低钙饲喂导致大鼠骨代谢紊乱, 破骨细胞活动加剧, 骨吸收作用增强, 灌胃补充剂可抑制并扭转这一趋势。

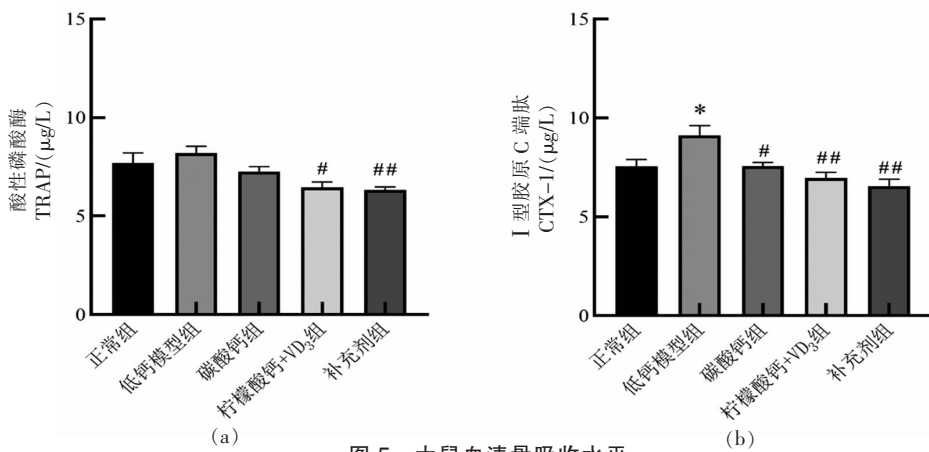


图 5 大鼠血清骨吸收水平  
Fig.5 Serum bone resorption level in rats

2.7 骨膳食补充剂对大鼠腓肠肌质量、腿肌率和前肢拉力的影响

肌肉与骨骼之间存在生物力学作用, 肌肉对骨骼产生机械刺激, 骨量维持需要一定的肌肉量。由表 5 可知, 低钙饲喂条件下, 大鼠腓肠肌质量、腿肌率和前肢拉力略有降低, 而无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 与低钙组相比, 灌胃钙制剂可在一定程度

上提高腓肠肌质量、腿肌率或前肢拉力 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。值得注意的是, 补充剂组的腿肌率最高, 且显著高于柠檬酸钙+VD<sub>3</sub>组, 这使其在前肢拉力上亦有较强表现 ( $P<0.05$ )。

2.8 骨膳食补充剂对大鼠血清 Irisin 水平的影响

Irisin 是由骨骼肌分泌的纤维连接蛋白 III 型结构域 5 (FNDC5) 蛋白, 经水解裂解后得到的含

表5 大鼠腓肠肌质量、腿肌率和前肢拉力

Table 5 Rat gastrocnemius muscle mass, leg muscle rate and forelimb pull

组别	腓肠肌质量/mg	腿肌率/%	前肢拉力/g
正常组	3.65 ± 0.05	6.35 ± 0.28	816.23 ± 28.43
低钙模型组	3.02 ± 0.09	5.71 ± 0.36	643.04 ± 9.60
碳酸钙组	3.47 ± 0.16	6.47 ± 0.37	803.20 ± 23.66 <sup>#</sup>
柠檬酸钙+VD <sub>3</sub> 组	3.50 ± 0.13	7.24 ± 0.30 <sup>#</sup>	931.49 ± 40.63 <sup>#</sup>
补充剂组	3.93 ± 0.17 <sup>###</sup>	9.13 ± 0.35 <sup>###</sup>	976.51 ± 52.55 <sup>###</sup>

有112个氨基酸的片段。Irisin是肌肉与骨骼密切联系的重要信息因子,一方面,刺激激酶信号通路调控肌肉合成基因,增加肌肉质量<sup>[16]</sup>;另一方面,刺激间充质干细胞向成骨细胞分化,增加骨形成<sup>[17]</sup>。如图6所示,与正常组相比,低钙组大鼠血清Irisin质量浓度显著降低( $P < 0.05$ );灌胃碳酸钙和柠檬酸钙+VD<sub>3</sub>无显著恢复作用( $P > 0.05$ ),而补充剂可显著提高Irisin质量浓度( $P < 0.01$ ),这与卜文倩<sup>[18]</sup>在Irisin在运动预防骨质疏松的研究结果一致。提示补充剂由于添加了乳清蛋白和亮氨酸而发挥作用,可升高血清Irisin水平。

### 2.9 骨膳食补充剂对大鼠Runx2、ALP、OC基因表达水平的影响

Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2,Runx2)是Wnt信号通路中的重要转录因子,是调控成骨细胞增殖、分化的重要因素<sup>[19]</sup>。Irisin通过激活Wnt/b-catenin信号通路,上调Runx2基因表达,刺激成骨细胞增殖并分泌ALP、OC等标志物,增加骨形成<sup>[20]</sup>。如图7所示,与正常组相比,低钙组大鼠Runx2 mRNA表达水平降低而不显著( $P > 0.05$ ),ALP表达水平显著降低( $P <$

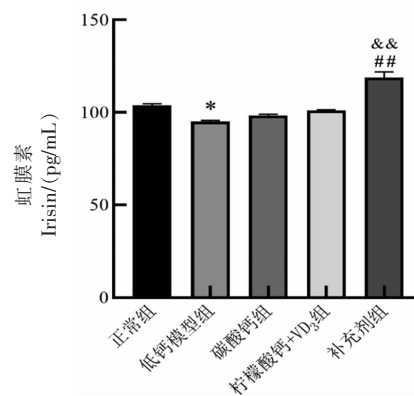


图6 大鼠血清Irisin水平

Fig.6 Serum Irisin level in rats

0.05),OC则极显著降低( $P < 0.01$ ),表明长期低钙饲喂导致成骨细胞分化被抑制,骨形成减弱。与低钙组相比,各干预组上述基因表达水平均有升高,其中补充剂组各基因表达水平均显著升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且相比于柠檬酸钙+VD<sub>3</sub>组OC表达水平极显著增加( $P < 0.01$ )。结果表明,补充剂能够上调骨生成转录因子,刺激成骨细胞增殖分化,促进骨生成。

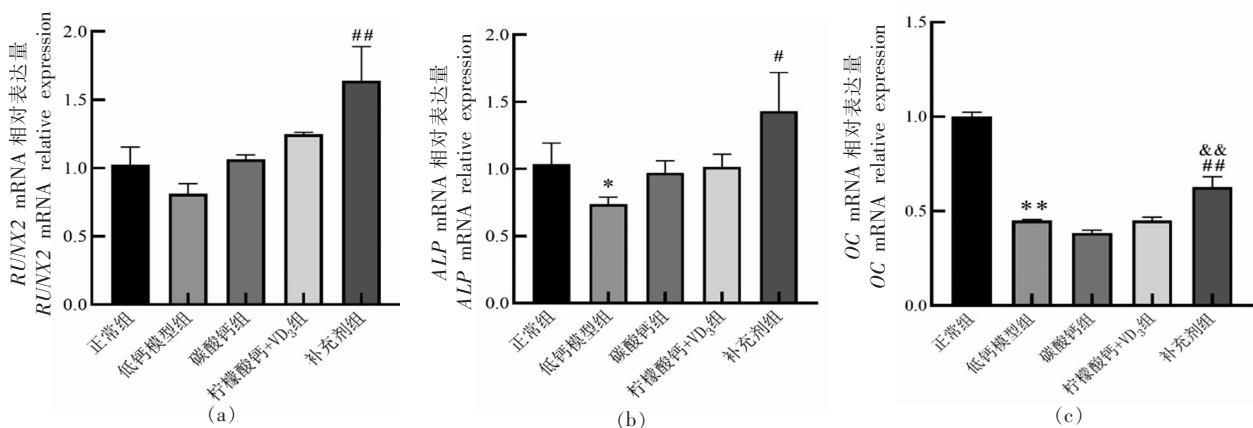


图7 骨膳食补充剂对大鼠股骨成骨细胞基因表达水平的影响

Fig.7 Effect bone dietary supplements on the mRNA expressions of osteoblast in rats femur

### 3 讨论与结论

骨骼在整个生命过程中需要不断重塑,处于骨形成与骨吸收共同维持的动态平衡<sup>[21]</sup>。一旦平衡被打破,骨吸收作用大于骨形成作用,骨基质降解,骨量大量流失,严重时发生骨质疏松<sup>[22]</sup>。钙作为骨基质的矿物质成分之一,对骨代谢平衡起着重要作用,膳食钙摄入不足是引起骨质流失的重要因素之一<sup>[23-24]</sup>。本实验发现,长期低钙饲喂显著降低大鼠钙吸收和钙贮存量、血清钙水平和  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  浓度,这与 Chen 等<sup>[25]</sup>的研究结果一致,表明体内骨矿分解加快。

骨矿物质含量下降造成骨质流失,导致骨密度降低,进而骨骼载荷降低,严重时还会发生骨折<sup>[26]</sup>。骨密度是诊断骨质疏松症的重要指标。本研究中低钙饲喂后大鼠骨密度和最大载荷极显著降低,改变了骨力学参数。Micro-CT 分析显示股骨远心端骨小梁形态和网状结构受到破坏,出现较大连接空洞,这是骨质疏松的典型病理表征。通过补充剂的干预可显著抑制骨矿分解,增加维生素 D 水平,使得大鼠骨力学参数恢复至正常状态,有效改善骨微结构。

骨形成和矿化均依赖于成骨细胞分泌大量骨胶原、骨基质蛋白等细胞因子以及酶类。一方面,成骨细胞负责骨骼的合成、分泌和矿化,其中 ALP 是成骨细胞分泌的特异性碱性磷酸酶,可为骨骼提供大量骨矿和骨盐<sup>[27]</sup>;OC 是由成骨细胞分泌的非胶原类骨蛋白,最终沉积为骨基质<sup>[28]</sup>。另一方面,破骨细胞负责骨骼的分解与吸收,其分泌的酸性磷酸酶是反映骨吸收强度的重要指标之一<sup>[29]</sup>,而 CTX-1 是骨吸收过程中 I 型胶原蛋白的重要降解产物,稳定性高,是表征骨吸收活动强弱的重要标志物之一<sup>[30]</sup>。通过血清相关指标测定发现,补充剂能显著升高低钙饲喂引起的大鼠 ALP 和 OC 血清浓度下降,并显著降低 CTX-1 和 TRAP 浓度,使破骨细胞活动受到抑制,成骨细胞活动增强。

补充钙制剂和维生素 D 是维持骨密度、减少骨质流失的常见膳食干预措施。近年来,越来越多种类的钙制剂进入大众视野,然而功效参差不齐,不能完全达到预期效果。究其原因,一是钙的生物利用率不同。目前,常见钙制剂主要分为以碳酸

钙、氯化钙等为主的不溶性无机钙和以柠檬酸钙、乳酸钙等为主的可溶性有机钙<sup>[9]</sup>。相比于无机钙,有机钙的溶解度大大提高,易于吸收且对胃刺激较小。本实验发现柠檬酸钙与维生素  $\text{D}_3$  联用,在增强股骨最大载荷,提高钙吸收和贮存量、骨钙含量,以及血清骨形成和吸收标志物含量的效果均优于碳酸钙,不仅吸收好,而且生物利用率高。二是骨骼健康不仅仅是单纯的补钙,而应从肌肉组织与骨骼健康的相互作用深入思考。本研究在柠檬酸钙与维生素  $\text{D}_3$  的基础上添加乳清蛋白和亮氨酸复配得到一款骨膳食补充剂,在灌胃缺钙大鼠后,不仅能有效改善骨力学参数和股骨微观结构,而且在增强骨形成能力和骨密度方面要优于碳酸钙和柠檬酸钙与维生素  $\text{D}_3$  联用。值得注意的是,补充剂具有明显的增肌作用,不仅提高腓肠肌质量、腿肌率,而且对前肢拉力有显著提升。乳清蛋白是一种富含  $\beta$ -乳球蛋白、 $\alpha$ -乳白蛋白、免疫球蛋白和乳铁蛋白等多种生物活性因子的功能性蛋白,不仅能提高矿物质的转运和吸收,还能维持肌肉质量和强度,有效减少骨骼肌丢失<sup>[10]</sup>。亮氨酸既是蛋白质合成底物,又可作为信号分子直接启动蛋白质合成,激活 mTOR 信号通路,刺激下游蛋白磷酸化,加速肌肉蛋白合成<sup>[31]</sup>。这可能是骨膳食补充剂能刺激肌肉合成,提高肌肉比例,以及前肢拉力的主要原因。

研究指出,骨骼与肌肉不仅存在生物力学作用,还会以内分泌的方式相互调控<sup>[32]</sup>。一方面,肌肉对骨骼产生机械刺激,即肌肉收缩后产生的物理刺激传递到骨骼以刺激骨形成<sup>[33]</sup>。早期研究发现,瘦肌肉量与骨密度呈正相关,与骨折风险呈负相关<sup>[34]</sup>。另一方面,肌肉通过分泌多种细胞因子调控肌肉和骨骼代谢,其中 Irisin 是肌骨代谢中的重要调节因子之一。本研究发现,缺钙大鼠在灌胃补充剂后,刺激骨骼肌分泌大量 Irisin,有效上调血液 Irisin 浓度,比单纯补充碳酸钙或柠檬酸钙,与维生素  $\text{D}_3$  联用更为显著。Irisin 是骨骼肌中的 FNDC5 经水解裂解后形成含有纤连蛋白 III 型结构域的多肽,可广泛结合不同受体。在肌骨代谢中,Irisin 与  $\alpha\text{V}$  整合素受体结合后使得激酶(FAK)磷酸化,直接靶向成骨细胞,调控骨骼重塑<sup>[35]</sup>。研究发现,Irisin 不仅刺激间充质干细胞向成骨细胞



分化,还能激活 Wnt 信号通路,刺激成骨细胞表达 ALP、OC 等,增加骨形成。Irisin 主要通过上调 *Runx2*、*ALP* mRNA 表达水平诱导成骨细胞分化<sup>[36]</sup>。因此,本研究通过基因表达水平检测发现,补充剂显著上调 *Runx2* mRNA、*ALP* 和 *OC* 表达水平显著升高,促进成骨细胞表达 ALP、OC 等成骨标志物,有效改善长期低钙饮食造成的骨质疏松。

本研究采用长期饲喂低钙饲料建立大鼠骨质疏松模型,初步探究了骨膳食补充剂对骨骼健康的影响及其作用机制。结果显示,补充剂能恢复低钙饲喂引起的骨性能降低,提高钙吸收,减少骨矿流失,具有增强骨密度,改善骨微观结构的效果。同时,补充剂能有效提高肌肉比例,增强肌肉对骨骼的生物力学作用;通过分泌 Irisin 激活 Wnt 信号通路,刺激成骨细胞增殖、分化,增强骨形成和矿化作用,这与添加乳清蛋白和亮氨酸密切相关。

### 参 考 文 献

- [1] PRICE C P, THOMPSON P W. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis [J]. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1995, 32: 244–260.
- [2] 钱治. T 细胞与骨代谢[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(11): 1401–1410.  
QIAN Z. T lymphocyte cells and bone metabolism[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2021, 37(11): 1401–1410.
- [3] HAMRICK M W, SHI X, ZHANG W, et al. Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading[J]. *Bone*, 2007, 40(6): 1544–1553.
- [4] VERSCHUEREN S, GIELEN E, O'NEILL T W, et al. Sarcopenia and its relationship with bone mineral density in middle-aged and elderly European men[J]. *Osteoporosis International*, 2013, 24(1): 87–98.
- [5] HUO Y R, SURIYAARACHCHI P, GOMEZ F, et al. Phenotype of osteosarcopenia in older individuals with a history of falling[J]. *Journal of the American Medical Directors Association*, 2015, 16(4): 290–295.
- [6] COIN A, PERISSINOTTO E, ENZI G, et al. Predictors of low bone mineral density in the elderly: The role of dietary intake, nutritional status and sarcopenia[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 62(6): 802–809.
- [7] CASHMAN K D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health[J]. *British Journal of Nutrition*, 2002, 87(Suppl.2): 169–177.
- [8] HENDY G N, CANAFF L. Calcium-sensing receptor, proinflammatory cytokines and calcium homeostasis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 49: 37–43.
- [9] ZITTERMANN A, DRUMMER C, SCHELD K, et al. Lactose does not enhance calcium bioavailability in lactose-tolerant, healthy adults[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71(4): 931–936.
- [10] PHILLIPS S M, TANG J E, MOORE D R, et al. The role of milk- and soy-based protein in support of muscle protein synthesis and muscle protein accretion in young and elderly persons[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2009, 28(4): 343–354.
- [11] 李莹, 林晓明. 乳清蛋白组分及其对骨代谢的影响[J]. *中国食物与营养*, 2008, 11: 52–54.  
LI Y, LI X M. Whey protein fractions and their effects on bone metabolism[J]. *China Food and Nutrition*, 2008, 11: 52–54.
- [12] RIEU I, BALAGE M, SORNET C, et al. Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats[J]. *Nutrition*, 2007, 23(4): 323–331.
- [13] 陈哲彬. 海参酶解物对增加骨密度功效的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.  
CHEN Z B. Study on the effect of sea cucumber enzymatic hydrolysates on increasing bone mineral density[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [14] 卢玉坤, 姜慧明, 王景峰, 等. 鳕鱼皮胶原蛋白肽的促钙吸收作用[J]. *中国海洋药物*, 2013, 32(4): 49–56.  
LU Y K, JIANG H M, WANG J F, et al. Calcium absorption increasing effect of collagen peptide from skin of walleye pollock[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2013, 32(4): 49–56.
- [15] 马淑华. 高脂饮食和丁酸钠干预对大鼠十二指肠线粒体能量代谢和肠钙吸收的影响[J]. *食品科学*, 2020, 40(1): 147–156.  
MA S H. Effects of high-fat diet and sodium butyrate intervention on intestinal mitochondrial energy

- metabolism and intestinal calcium absorption in rats [J]. *Food Science*, 2020, 40(1): 147–156.
- [16] REZA M M, SUBRAMANIYAM N, SIM C M, et al. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1104.
- [17] ZHANG J, VALVERDE P, ZHU X F, et al. Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism [J]. *Bone Res*, 2017, 5: 16056.
- [18] 卜文倩. Irisin 在运动预防骨质疏松小鼠骨量丢失中调节的作用及其机制 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- BU W Q. Irisin in regulating exercise to prevent bone loss in osteoporosis mice [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020.
- [19] KORNEL A, DEN HARTOGH D J, KLENTROU P, et al. Role of the myokine irisin on bone homeostasis: Review of the current evidence [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9136.
- [20] PERRINI S, LAVIOLA L, CARREIRA M C, et al. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: Mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis [J]. *Journal of Endocrinology*, 2010, 205(3): 201–210.
- [21] OMATA Y, FRECH M, SAITO T, et al. Inflammatory arthritis and bone metabolism regulated by type 2 innate and adaptive immunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1104.
- [22] 王冰梅, 赵娜, 于洪宇, 等. 骨质疏松的中西医研究进展 [J]. *中医药信息*, 2016, 33(6): 128–131.
- WANG B M, ZHAO N, YU H Y, et al. Advances in Chinese and Western medicine research on osteoporosis [J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*, 2016, 33(6): 128–131.
- [23] CORMICK G, BELIZAN J M. Calcium intake and health [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 8–16.
- [24] BEGGS M R, ALEXANDER R T. Intestinal absorption and renal reabsorption of calcium throughout postnatal development [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2017, 242(8): 840–849.
- [25] CHEN Z B, LIU D S, TANG X, et al. Sea cucumber enzymatic hydrolysates relieve osteoporosis through OPG/RANK/RANKL system in ovariectomized rats [J]. *Food Bioscience*, 2022, 46: 101572.
- [26] 王晓红, 李媛媛, 王静风, 等. 海洋鱼骨胶原低聚肽及杜仲协同氨基葡萄糖-硫酸软骨素对去势大鼠骨密度及骨代谢的影响 [J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 124–129.
- WANG X H, LI Y Y, WANG J F, et al. Mechanism of improvement of bone mineral density in ovariectomy-induced osteoporotic mice by sea cucumber saponin [J]. *Food Science*, 2019, 40(5): 124–129.
- [27] 王智存, 施婕, 邹远妩, 等. 骨代谢生化指标对骨质疏松的诊断价值 [J]. *实用医技杂志*, 2016, 23(1): 70–72.
- WANG Z C, SHI J, ZOU Y W, et al. Diagnostic value of biochemical indicators of bone metabolism for osteoporosis [J]. *Journal of Practical Medical Technology*, 2016, 23(1): 70–72.
- [28] NAKAJIMA A, SHIMOJI N, SHIOMI K, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1–34) [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17(11): 2038–2047.
- [29] WHEATER G, ELSHAHALY M, TUCK S P, et al. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2013, 11: 201.
- [30] ABLES G P, PERRONE C E, ORENTREICH D, et al. Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51357.
- [31] KARELIS A D, MESSIER V, SUPPERE C, et al. Effect of cysteine-rich whey protein (ImmunocalA (R)) supplementation in combination with resistance training on muscle strength and lean body mass in non-frail elderly subjects: A randomized, double-blind controlled study [J]. *Journal of Nutrition Health & Aging*, 2015, 19(5): 531–536.
- [32] TAGLIAFERRI C, WITTRANT Y, DAVICCO M J, et al. Muscle and bone, two interconnected tissues [J]. *Aging Research Reviews*, 2015, 21: 55–70.
- [33] CHENG Q, ZHU X Y, ZHANG X M, et al. A cross-sectional study of loss of muscle mass corresponding to sarcopenia in healthy Chinese men and women: Reference values, prevalence, and association with bone mass [J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2014, 32(1): 78–88.
- [34] HONG W, CHENG Q, ZHU X Y, et al. Preva-

- lence of sarcopenia and its relationship with sites of fragility fractures in elderly Chinese men and women [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138102.
- [35] KIM H, WRANN C D, JEDRYCHOWSKI M, et al. Irisin mediates effects on bone and fat via alphaV integrin receptors [J]. *Cell*, 2018, 175 (7): 1756–1768.
- [36] COLAIANNI G, CUSCITO C, MONGELLI T, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112 (39): 12157–12162.

### Modulation of Bone Performance by Bone Dietary Supplements in Low-calcium-fed Rats

Shao Ru<sup>1</sup>, Zhao Xianfeng<sup>2</sup>, Mao Jiangyi<sup>2</sup>, Tang Xue<sup>1\*</sup>, Wang Yi<sup>2\*</sup>, Zhou Peng<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu*

<sup>2</sup>*Danone Open Science Research Center for Life-Transforming Nutrition, Shanghai 200135*

<sup>3</sup>*State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu*

**Abstract** Objective: To investigate the effects of the dietary bone supplement consisting of whey protein, leucine, calcium citrate and vitamin D<sub>3</sub> on bone performance in low-calcium fed rats. Methods: 40 female SD rats were randomly divided into normal group, low-calcium model group, calcium carbonate group, calcium citrate + VD<sub>3</sub> and supplement groups. After administration for 90 days, growth performance, femur biomechanical parameters and femur microstructure, calcium metabolism levels, bone formation and bone resorption markers, myocytic factor Irisin levels were detected. The relative mRNA expression of ALP, OC and key genes were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction. Results: Compared with the normal group, the rats in low-calcium model group showed no significant changes in body weight and organ index ( $P>0.05$ ), but a highly significant decrease in bone mineral density and maximum load ( $P<0.01$ ). Compared with the low-calcium model group, the values of femoral bone density, maximum load ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and the content of the bone formation markers (alkaline phosphatase and osteocalcin) in serum were significantly increased in the other three groups, the bone dietary supplements not only significantly increased femoral length, femoral dry weight, maximum deflection and femoral dry weight ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), but also was superior to calcium citrate+VD<sub>3</sub> and calcium carbonate in enhancing bone density, restoring bone microstructure and bone formation markers content ( $P<0.01$ ). In addition, the bone dietary supplements effectively improved gastrocnemius muscle mass, hamstring rate or forelimb tension in low-calcium fed rats ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and enhanced muscle biomechanical effects on bone, which also activated Wnt signaling pathway by increasing muscle secretion of Irisin, up-regulated mRNA expression of *Runx2*, *ALP* and *OC*, stimulated osteoblast proliferation, differentiation and enhanced bone formation and mineralization. Conclusion: Bone dietary supplements increased bone formation by activating the Wnt signaling pathway, inhibited bone mineral loss, and restored bone microstructure, increased bone mineral density and bone strength, and improved osteoporosis. This may be related to it improved muscle mass and Irisin secretion, enhanced the biomechanical effect of muscle on bone.

**Keywords** osteoporosis; whey protein; leucine; bone dietary supplements; bone metabolism