

# 硼替佐米与帕米膦酸二钠在大鼠肢体废用性骨质疏松症模型中的疗效比较<sup>△</sup>

程千纲<sup>1,2\*</sup>, 王博<sup>2</sup>, 叶永奇<sup>2</sup>, 吴涛<sup>3</sup>, 梁智锋<sup>1,2</sup>, 贾永兴<sup>1,2</sup>, 杨英才<sup>2#</sup> (1. 山西医科大学临床学科建设中心, 太原 030607; 2. 运城市中心医院手足外科, 山西运城 043200; 3. 四川省第四人民医院骨二科, 成都 610011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)09-1075-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.09.012



**摘要** 目的:探讨硼替佐米与帕米膦酸二钠在废用性骨质疏松症(DOP)大鼠模型中的疗效。方法:选取16周龄雄性SD大鼠40只,随机分为对照组、假手术组、模型组、帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组,每组8只。建立DOP大鼠模型。采用显微-CT测定大鼠后肢胫骨显微结构参数;采用酶联免疫吸附试验测定大鼠血清学指标核因子 $\kappa$ B受体激活蛋白配体(RANKL)/骨保护素(OPG)浓度比值,血清骨硬化蛋白(Sclerostin)、碱性磷酸酶(ALP)的水平;采用定量聚合酶链反应测定骨组织中骨吸收相关因子I型前胶原氨基端前肽(PINP)、I型胶原交联C-末端肽(CTX)-1、基质金属蛋白酶(MMP)-3和MMP-9 mRNA的相对表达水平;采用蛋白质印迹法测定大鼠骨组织中成骨分化关键转录因子钙调磷酸酶(Calcineurin)/活化T细胞核因子(NFAT)信号轴和糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )/蛋白激酶B(Akt)信号通路水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠后肢胫骨骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、连通性密度(Conn.D)、结构模型指数(SMI)和骨密度(BMD)降低,骨小梁分离度(Tb.Sp)升高;血清RANKL/OPG浓度比值、Sclerostin水平升高,血清ALP水平降低;骨组织中PINP、CTX-1 mRNA相对表达水平降低,MMP-3、MMP-9 mRNA相对表达水平升高;Calcineurin相对表达水平降低;p-Akt相对表达水平降低,p-GSK3 $\beta$ 相对表达水平升高,上述差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组部分逆转了上述指标(包括后肢胫骨BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp、Conn.D、SMI和BMD,血清RANKL/OPG浓度比值、Sclerostin水平和ALP水平,骨组织中MMP-3、MMP-9 mRNA相对表达水平,骨组织中Calcineurin相对表达水平,骨组织中p-Akt、p-GSK3 $\beta$ 相对表达水平),差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );且硼替佐米治疗组大鼠骨组织中PINP、CTX-1 mRNA相对表达水平升高,NFAT相对表达水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与帕米膦酸二钠治疗组比较,硼替佐米治疗组逆转上述指标的效果更为显著,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:硼替佐米改善DOP大鼠骨质疏松症的疗效优于帕米膦酸二钠。

**关键词** 废用性骨质疏松症;二磷酸盐;硼替佐米;Calcineurin/NFAT信号轴;GSK3 $\beta$ /Akt信号通路

## Comparison on the Efficacy of Bortezomib and Pamidophosphate in the Rat Model of Disuse Osteoporosis<sup>△</sup>

CHENG Qiangang<sup>1,2</sup>, WANG Bo<sup>2</sup>, YE Yongqi<sup>2</sup>, WU Tao<sup>3</sup>, LIANG Zhifeng<sup>1,2</sup>, JIA Yongxing<sup>1,2</sup>, YANG Yingcai<sup>2</sup> (1. Clinical Discipline Construction Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030607, China; 2. Dept. of Hand and Foot Surgery, Yuncheng Central Hospital, Shanxi Yuncheng 043200, China; 3. the Second Dept. of Orthopedics, the Fourth People's Hospital of Sichuan Province, Chengdu 610011, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To compare the efficacy of bortezomib and pamidophosphate in the rat model of disuse osteoporosis (DOP). **METHODS:** Forty 16-week-old male SD rats were randomly divided into the control group, sham surgery group, model group, pamidophosphate treatment group and bortezomib treatment group, with 8 rats in each group. DOP rat model was established. The microstructural parameters of hind limb tibia were determined by micro-CT. Serological indexes receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) concentration ratio, serum Sclerostin and alkaline phosphatase (ALP) levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay. The mRNA expression levels of bone resorption-related factors type I procollagen amino-terminal prepeptide (PINP), C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen (CTX)-1, matrix metalloproteinase (MMP)-3 were determined by quantitative polymerase chain reaction. Signaling axis of Calcineurin/nuclear factor of activated T-cells isoform (NFAT) and signaling pathway of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )/protein kinase B (Akt), a key

△ 基金项目:山西省卫生健康委科研课题(No. 2023071)

\* 住院医师,硕士研究生。研究方向:骨科学。E-mail:chengqiangang2015@163.com

# 通信作者:主任医师,硕士生导师。研究方向:手足外科。E-mail:yangyingcai2@sina.com

transcription factor for osteogenic differentiation, were determined by Western blotting. RESULTS: Compared with sham surgery group, bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb. N), trabecular thickness (Tb. Th), connectivity density (Conn. D), structural model index (SMI), bone mineral density (BMD) and trabecular separation (Tb. Sp) of the posterior limb tibia in model group rats decreased, trabecular separation (Tb. Sp) increased; serum RANKL/OPG concentration ratio and serum sclerostin level increased, serum ALP level decreased; the relative expression levels of PINP and CTX-1 mRNA in bone tissues decreased, while the relative expression levels of MMP-3 and MMP-9 mRNA increased, the relative expression levels of Calcineurin decreased; the relative expression levels of p-Akt decreased, and the relative expression levels of p-GSK3 increased, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the pamiphosphate treatment group and bortezomib treatment group partially reversed the above indicators (including BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Tb. Sp, Conn. D, SMI and BMD in posterior limb tibia, serum RANKL/OPG concentration ratio, levels of Sclerostin and ALP, the relative expression levels of MMP-3 and MMP-9 mRNA in bone tissues, the relative expression levels of Calcineurin in bone tissues, and the relative expression levels of p-Akt and p-GSK3 $\beta$  in bone tissues), with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of PINP and CTX-1 mRNA and the relative expression levels of NFAT in bone tissues of rats in bortezomib treatment group increased, with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Compared with the pamiphosphate treatment group, bortezomib treatment group had a more significant effect on reversing the above indicators, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: The efficacy of bortezomib for DOP rat model is better than that of pamiphosphate. KEYWORDS Disuse osteoporosis; Biphosphate; Bortezomib; Calcineurin/NFAT signaling axis; GSK3 $\beta$ /Akt signaling pathway

废用性骨质疏松症(disuse osteoporosis, DOP)是由于局部骨骼机械力卸载或全身固定而导致的骨质流失状态<sup>[1]</sup>。DOP的病因包括脊髓损伤、其他神经和神经肌肉疾病、骨折后固定和卧床休息、太空飞行期间微重力诱导的骨质流失以及脑卒中后局部失用性骨质疏松症<sup>[2]</sup>。根据临床影像学证据,发现局部骨骼的固定和废用会导致骨小梁和皮质骨的快速丢失<sup>[3]</sup>。临床检测还发现这种骨丢失源于骨吸收相对增加和骨形成减少<sup>[4-5]</sup>。并且这种长期废用将激活骨细胞大量分泌骨硬化蛋白(Sclerostin)<sup>[6]</sup>。

双磷酸盐(如帕米膦酸二钠)治疗骨质疏松症,在临床上疗效确切。然而,由于双磷酸盐药物价格相对低廉,使用人群数量众多,静脉注射双磷酸盐治疗10年内发生骨质疏松性骨折的概率>10%<sup>[7]</sup>。上述健康经济学分析数据显示了在普通人群中过量使用双磷酸盐处方存在的危险性<sup>[7]</sup>。硼替佐米用于治疗骨质疏松症和多发性骨髓瘤相关骨病等,在临床上已应用多年<sup>[8-9]</sup>。然而,由于DOP特殊的病理机制,硼替佐米是否能够用于DOP的治疗,还有待确认。本研究拟通过建立DOP大鼠模型,并给予帕米膦酸二钠或硼替佐米治疗,探讨硼替佐米缓解DOP大鼠模型骨质疏松症的疗效及其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物:16周龄雄性SD大鼠40只,体重为220~260 g,购自山西医科大学实验动物中心。

1.1.2 仪器: micro-computer tomography-50型显微-CT仪购自瑞士Scanco Medical公司。大鼠核因子 $\kappa$ B受体激活蛋白配体(RANKL, 货号为EK2208)、骨保护素(OPG, 货号为EK1134)、碱性磷酸酶(ALP, 货号为EK361S)和骨Sclerostin(货号为EK261)水平酶联免疫吸附试验(ELISA)测定试剂盒购自杭州

联科生物技术股份有限公司。RNAprep Pure 动物组织总RNA提取试剂盒(货号为DP431)、Quant cDNA 第一链合成试剂盒(货号为KR103)和SuperReal 荧光定量预混试剂增强版(SYBR Green)(货号为KR103FP205)购自天根生化科技(北京)有限公司。ProteinExt Mammalian Total Protein Extraction Kit 试剂盒(货号为DE101-01)、ProteinExt Mammalian Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit 试剂盒(货号为DE201-01)购自北京金式金生物技术股份有限公司。

1.1.3 药品与试剂:注射用帕米膦酸二钠(深圳海王药业有限公司,国药准字H19980200,批号为034M6495),注射用硼替佐米(健进制药有限公司,国药准字H20243569,批号为027J5433)。兔抗大鼠钙调磷酸酶(Calcineurin, 货号为ab109412)、活化T细胞核因子(NFAT, 货号为ab2722)、细胞核蛋白内参Lamin B(货号ab232731)、蛋白激酶B(Akt, 货号为ab8805)、磷酸化Akt(p-Akt, 货号为ab38449)、糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ , 货号为ab32391)、磷酸化GSK3 $\beta$ (p-GSK3 $\beta$ , 货号为ab68476)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 货号为ab8245)和山羊抗免疫球蛋白G(重链+轻链)[IgG(H+L), 货号为ab205718]购自美国Abcam公司。

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物饲养:大鼠饲养于恒温(22~25℃)、恒湿(50%~70%)、配备12h/12h光照/黑暗循环的标准SPF级鼠房。大鼠饲喂标准啮齿类动物饲料,可以自由进食和饮水。大鼠接受造模操作前,先适应性饲养1周。所有动物实验均经运城市中心医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号:YCHH-DW2023001)。

1.2.2 建立DOP大鼠模型:雌性大鼠接受悬尾造模操作,尾巴用胶带固定,使后肢不接触地面,而前肢可以在笼子的地板上自由活动,正常饮食。胶带的另一端固定于大鼠头顶的一根横杆上,使大鼠后肢抬起并保持身体倾斜度约为30°,头朝

下俯卧位。尾悬挂时间持续6周,每周测量1次大鼠体重,并使其保持体重不发生显著降低;6周悬挂期间,防止大鼠尾部溃烂、悬吊脱落或断尾。6周后解除尾悬挂,颈椎脱臼法处死大鼠。取其后肢胫骨,进行下游指标的测定<sup>[10]</sup>。

1.2.3 动物实验分组和处理方式:将大鼠随机分为5组,每组8只。对照组大鼠不进行任何处理;假手术组仅用胶带固定大鼠尾巴,但不使后肢抬起和身体倾斜,后肢仍能着地爬行;模型组建模方法见“1.2.2”项,并在建模后当日开始每周2次腹腔注射无菌0.9%氯化钠溶液20 μL;帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组大鼠于建模后当日开始每周2次分别腹腔注射剂量为20 mg/kg的注射用帕米膦酸二钠和注射用硼替佐米20 μL。

1.2.4 显微-CT:将采集的大鼠胫骨样品浸没于4%多聚甲醛中,在4℃固定超过48 h。使用显微-CT仪对胫骨进行扫描。扫描参数为源电压70 kV,源电流200 μA,空间分辨率10 μm。并利用相关分析软件进行骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨小梁数量(Tb.N)、连通性密度(Conn.D)、结构模型指数(SMI)以及骨密度(BMD)的三维重建和骨量统计分析。

1.2.5 ELISA:颈椎脱臼法处死大鼠前,从大鼠眼眶静脉丛采血。使用大鼠血清RANKL、OPG、ALP和Sclerostin水平ELISA测定试剂盒进行测定,具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 定量聚合酶链反应(qPCR):将采集的大鼠胫骨样品浸没于4%多聚甲醛中,在4℃固定超过24 h,然后浸没于超过胫骨10倍体积的EDTA脱钙液中,每3日更换1次新鲜脱钙液,在4℃连续脱钙4周。脱钙结束后,加入1 mL/mg组织Trizol裂解液,在液氮中研磨裂解骨组织并制备组织匀浆,使用RNAprep Pure动物组织总RNA提取试剂盒提取总RNA。使用Quant cDNA第一链合成试剂盒反转录合成cDNA。使用SuperReal荧光定量预混试剂增强版(SYBR Green)进行qPCR扩增。

qPCR扩增引物如下,I型前胶原氨基端前肽(PINP)上游引物(5'-3'):TGACGCATGGCCAAGAAGAC,PINP下游引物(5'-3'):CTGTCCCAACCCCCAAAAA;I型胶原交联C-末端肽(CTX)-1上游引物(5'-3'):CCGTGGCCTCTGCCCCGAC,CTX-1下游引物(5'-3'):GCTGTTCGTTCAA GGCTA;基质金属蛋白酶(MMP)-3上游引物(5'-3'):GTGTACGGCTGTGTGCTCATCC,MMP-3下游引物(5'-3'):

TGGTCTTGAAGGATGTG;MMP-9上游引物(5'-3'):CAGACTGGTGAGCTGGACA,MMP-9下游引物(5'-3'):TTCGAAGGCCGACCTCAAGTG;GAPDH上游引物(5'-3'):AGAGACAGCCGCATCTTCTT,GAPDH下游引物(5'-3'):CCTGGTTACCAGGGCTGCC。

1.2.7 蛋白质印迹法:大鼠胫骨样品脱钙处理方法同“1.2.6”项。脱钙结束后,加入1 mL/mg组织补充有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂混合物的RIPA裂解液,在液氮中研磨裂解骨组织并制备组织匀浆。使用ProteinExt Mammalian Total Protein Extraction Kit提取总蛋白质,使用ProteinExt Mammalian Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit提取细胞核蛋白质。按照常规流程进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。采用半干转印法,以70 mA恒流,4℃电转印2 h,将PAGE凝胶上的总蛋白质电转印至PVDF膜上。加入5%脱脂奶粉对PVDF膜进行封闭。向PVDF膜上滴加一抗工作液,在4℃使二者共同孵育过夜。次日,向PVDF膜上滴加二抗工作液,在室温(25℃)使二者共同孵育1 h。采用增强化学发光底物对目的条带进行显影。抗体稀释度为兔抗大鼠Calcineurin(1:1 500稀释),NFAT(1:1 000稀释),Lamin B(1:1 000稀释),p-Akt(1:1 000稀释),Akt(1:2 000稀释),p-GSK3β(1:1 000稀释),GSK3β(1:2 000稀释),GAPDH(1:2 000稀释),山羊抗兔IgG(H+L)(1:5 000稀释)。

### 1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism v8软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 硼替佐米与帕米膦酸二钠缓解DOP模型大鼠后肢胫骨显微结构参数恶化的效果比较

根据显微-CT的结果可知,与假手术组比较,模型组大鼠后肢胫骨BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D、SMI和BMD降低,Tb.Sp升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组大鼠后肢胫骨BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D、SMI和BMD升高,Tb.Sp降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与帕米膦酸二钠治疗组比较,硼替佐米治疗组大鼠后肢胫骨BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Conn.D和BMD升高更为显著,Tb.Sp降低更为显著,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 各组大鼠后肢胫骨显微结构参数比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	(BV/TV)/%	Tb.N/mm <sup>-1</sup>	Tb.Th/mm	Tb.Sp/mm	Conn.D/mm <sup>-3</sup>	SMI	BMD/(g/mm <sup>2</sup> )
对照组(n=8)	0.131±0.011	3.843±0.307	0.056±0.002	0.33±0.03	53.8±1.5	3.64±0.19	48.83±2.12
假手术组(n=8)	0.124±0.018	3.810±0.261	0.057±0.004	0.31±0.01	52.6±0.8	3.56±0.21	47.62±1.84
模型组(n=8)	0.032±0.008 <sup>a</sup>	2.330±0.223 <sup>a</sup>	0.037±0.003 <sup>a</sup>	0.42±0.02 <sup>a</sup>	8.8±1.3 <sup>a</sup>	3.01±0.09 <sup>a</sup>	32.86±1.48 <sup>a</sup>
帕米膦酸二钠治疗组(n=8)	0.063±0.007 <sup>ab</sup>	3.080±0.207 <sup>ab</sup>	0.045±0.002 <sup>ab</sup>	0.37±0.01 <sup>ab</sup>	27.7±2.4 <sup>ab</sup>	3.48±0.13 <sup>b</sup>	38.62±1.30 <sup>ab</sup>
硼替佐米治疗组(n=8)	0.105±0.013 <sup>abc</sup>	3.577±0.235 <sup>bc</sup>	0.049±0.002 <sup>abc</sup>	0.34±0.02 <sup>abc</sup>	41.7±1.4 <sup>abc</sup>	3.64±0.16 <sup>b</sup>	43.72±1.22 <sup>abc</sup>
F	98.35	52.13	73.73	38.53	1 162.00	21.22	132.50
P	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与帕米膦酸二钠治疗组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.2 硼替佐米与帕米膦酸二钠缓解DOP模型大鼠血清学指标水平异常的效果比较

根据血清ELISA结果可知,与假手术组比较,模型组大鼠血清RANKL/OPG浓度比值和血清Sclerostin水平升高,血清

ALP水平降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组大鼠血清RANKL/OPG浓度比值和血清Sclerostin水平降低,血清ALP水平升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与帕米膦酸二钠治疗组比

较, 硼替佐米治疗组大鼠血清 RANKL/OPG 浓度比值和血清 Sclerostin 水平降低更为显著, 血清 ALP 水平升高更为显著, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

表 2 各组大鼠血清骨吸收和骨硬化相关因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	血清 RANKL/OPG 浓度比值	血清 ALP/ (U/L)	血清 Sclerostin/ (pg/mL)
对照组 ( $n=8$ )	0.230±0.022	63.24±3.12	438.64±13.03
假手术组 ( $n=8$ )	0.243±0.017	65.58±1.38	431.36±16.14
模型组 ( $n=8$ )	0.541±0.012 <sup>a</sup>	11.34±2.88 <sup>a</sup>	616.22±15.82 <sup>a</sup>
帕米膦酸二钠治疗组 ( $n=8$ )	0.373±0.014 <sup>ab</sup>	44.68±1.82 <sup>ab</sup>	548.42±11.78 <sup>ab</sup>
硼替佐米治疗组 ( $n=8$ )	0.311±0.027 <sup>abc</sup>	59.28±1.92 <sup>abc</sup>	486.78±9.26 <sup>abc</sup>
<i>F</i>	346.60	857.40	269.70
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注: 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与帕米膦酸二钠治疗组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.3 硼替佐米与帕米膦酸二钠缓解 DOP 模型大鼠骨组织中骨吸收相关因子 mRNA 水平异常的效果比较

根据脱钙骨组织 qPCR 测定结果可知, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中 PINP、CTX-1 mRNA 相对表达水平降低, MMP-3 和 MMP-9 mRNA 相对表达水平升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 MMP-3、MMP-9 mRNA 相对表达水平降低, 硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 PINP、CTX-1 mRNA 相对表达水平升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与帕米膦酸二钠治疗组比较, 硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 MMP-3 和 MMP-9 mRNA 相对表达水平降低更为显著, PINP、CTX-1 mRNA 相对表达水平升高更为显著, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 各组大鼠骨组织中骨吸收相关因子 mRNA 相对表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	PINP	CTX-1	MMP-3	MMP-9
对照组 ( $n=8$ )	1.00±0.18	1.00±0.12	1.0±0.06	1.0±0.14
假手术组 ( $n=8$ )	1.05±0.08	1.06±0.04	1.12±0.08	0.92±0.09
模型组 ( $n=8$ )	0.28±0.02 <sup>a</sup>	0.32±0.06 <sup>a</sup>	8.52±2.12 <sup>a</sup>	12.82±1.64 <sup>a</sup>
帕米膦酸二钠治疗组 ( $n=8$ )	0.32±0.04 <sup>a</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	4.38±0.76 <sup>ab</sup>	7.64±1.26 <sup>ab</sup>
硼替佐米治疗组 ( $n=8$ )	5.44±0.66 <sup>abc</sup>	3.78±0.82 <sup>abc</sup>	3.18±0.24 <sup>ab</sup>	5.69±0.77 <sup>abc</sup>
<i>F</i>	394.40	55.77	73.73	207.80
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注: 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与帕米膦酸二钠治疗组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 2.4 硼替佐米与帕米膦酸二钠对 DOP 模型大鼠 Calcineurin/NFAT 信号轴的影响比较

根据脱钙骨组织蛋白质印迹法测定结果可知, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中 Calcineurin 相对表达水平降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 Calcineurin 相对表达水平升高, 硼替佐米治疗组大鼠骨组织中细胞核 NFAT 相对表达水平升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与帕米膦酸二钠治疗组比较, 硼替佐米治疗组大鼠骨组织中细胞核 NFAT、Calcineurin 相对表达水平升高更为显著, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4、图 1。

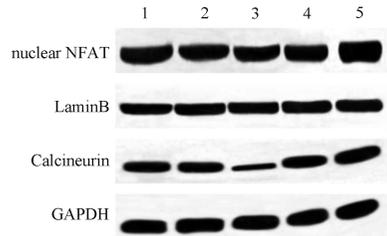
### 2.5 硼替佐米与帕米膦酸二钠对 DOP 模型大鼠 GSK3β/Akt 信号通路的影响比较

根据脱钙骨组织蛋白质印迹法测定结果可知, 与假手术组比较, 模型组大鼠骨组织中 p-Akt 相对表达水平降低, p-GSK3β 相对表达水平升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与模型组

表 4 各组大鼠骨组织中成骨分化关键转录因子信号轴水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞核 NFAT	Calcineurin
对照组 ( $n=8$ )	1.00±0.12	1.00±0.06
假手术组 ( $n=8$ )	0.96±0.06	0.94±0.06
模型组 ( $n=8$ )	1.06±0.10	0.24±0.02 <sup>a</sup>
帕米膦酸二钠治疗组 ( $n=8$ )	0.92±0.08	1.06±0.10 <sup>b</sup>
硼替佐米治疗组 ( $n=8$ )	1.76±0.14 <sup>bc</sup>	1.22±0.12 <sup>abc</sup>
<i>F</i>	90.96	179.70
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1

注: 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与帕米膦酸二钠治疗组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。



1. 对照组; 2. 假手术组; 3. 模型组; 4. 帕米膦酸二钠治疗组; 5. 硼替佐米治疗组。

图 1 蛋白质印迹法测定各组大鼠骨组织中成骨分化关键转录因子细胞核 NFAT 和 Calcineurin 信号轴的表达

比较, 帕米膦酸二钠治疗组和硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 p-Akt 相对表达水平升高, p-GSK3β 相对表达水平降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与帕米膦酸二钠治疗组比较, 硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 p-Akt 对表达水平升高更为显著, p-GSK3β 相对表达水平降低更为显著, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 5、图 2。

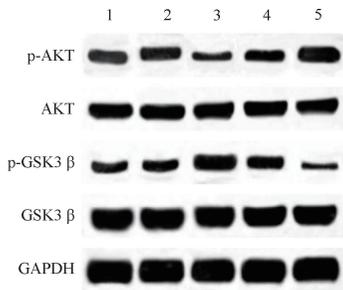
表 5 各组大鼠骨组织中成骨分化关键信号通路相关因子相对表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	p-Akt	Akt	p-GSK3β	GSK3β
对照组 ( $n=8$ )	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.04	1.00±0.10
假手术组 ( $n=8$ )	1.04±0.08	0.98±0.04	0.96±0.02	1.04±0.08
模型组 ( $n=8$ )	0.36±0.04 <sup>a</sup>	1.04±0.06	1.76±0.14 <sup>a</sup>	1.08±0.04
帕米膦酸二钠治疗组 ( $n=8$ )	0.82±0.06 <sup>ab</sup>	1.10±0.06	1.12±0.08 <sup>ab</sup>	0.98±0.06
硼替佐米治疗组 ( $n=8$ )	1.64±0.16 <sup>abc</sup>	0.96±0.08	0.40±0.02 <sup>abc</sup>	0.98±0.12
<i>F</i>	194.80	5.70	331.70	2.09
<i>P</i>	<0.000 1	>0.05	<0.000 1	>0.05

注: 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与帕米膦酸二钠治疗组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

骨质疏松症是由破骨细胞骨吸收和成骨细胞骨合成代谢失衡引起异常骨重塑造成的<sup>[11]</sup>。DOP 引起骨质疏松症的病因是机械力卸载, 但异常骨重塑的病理生理过程类似于骨质疏松症。双磷酸盐缓解骨质疏松症的作用机制主要是抑制破骨细胞的分化和成熟, 但是对成骨细胞分化、成熟和存活没有明显作用<sup>[12]</sup>。然而临床前和临床数据都表明, 硼替佐米不仅可以抑制破骨细胞的发育和活性, 最主要的还是直接刺激成骨细胞的生长和分化<sup>[8, 13-14]</sup>。特别是硼替佐米用于溶解性骨病中, 能促进骨愈合<sup>[15]</sup>。本次显微-CT 研究结果显示, 与模型组相比, 硼替佐米治疗组大鼠后肢胫骨 BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Conn. D、SMI 和 BMD 升高, Tb. Sp 降低, 整体骨质疏松症情况得到缓解, 且疗效优于帕米膦酸二钠治疗组。



1. 对照组;2. 假手术组;3. 模型组;4. 帕米膦酸二钠治疗组;  
5. 硼替佐米治疗组。

图2 蛋白质印迹法测定各组大鼠骨组织中成骨分化关键信号通路 GSK3 $\beta$ /Akt 的活化水平

骨重塑的调控主要是由 RANKL 及其细胞表面受体 RANK 和 RANKL 的诱饵受体 OPG 组成的调节因子系统控制的。RANKL 与 RANK 结合而启动破骨细胞分化和成熟;OPG 与 RANKL 结合可中和配体,从而阻止破骨细胞成熟和骨吸收<sup>[16]</sup>。DOP 患者废用骨硬化程度升高,伴有血清 Sclerostin 水平升高。使用抗 Sclerostin 抗体治疗可缓解这种废用性骨硬化<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,硼替佐米治疗组大鼠血清 RANKL/OPG、Sclerostin 水平均降低,且疗效优于帕米膦酸二钠治疗组。

MMP-3 和 MMP-9 是骨吸收、骨溶解和骨重塑过程中的重要蛋白酶。抑制上述蛋白酶的表达水平或降解其活性将逆转异常骨重塑<sup>[18-19]</sup>。PINP、CTX-1 和 ALP 是成骨细胞骨合成代谢重要标志物<sup>[20-21]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 PINP、CTX-1 mRNA 相对表达水平上调,血清 ALP 水平升高,MMP-3 和 MMP-9 mRNA 相对表达水平降低,且疗效优于帕米膦酸二钠治疗组。

如前所述,硼替佐米最主要的活性是直接刺激成骨细胞的生长和分化。NFAT 是成骨细胞分化最关键的转录因子。由转录调节因子 p65 核因子  $\kappa$ B 磷酸化激活,负责几乎所有成骨分化相关基因的转录。流体剪切应力通过活化 T 细胞核因子/细胞外信号调节激酶 5 (NFATc1/ERK5) 途径促进成骨细胞增殖<sup>[22]</sup>。促进骨合成代谢的重要因子骨形态发生蛋白通过母亲抗肌凝(Smad)/Akt/Ca<sup>2+</sup>信号激活 NFAT 转录<sup>[23]</sup>。Calcineurin/NAFT 信号轴联合作用促进骨合成代谢<sup>[24]</sup>。Calcineurin/NAFT 还通过维持间充质干细胞干性在骨衰老过程中发挥骨保护作用<sup>[25]</sup>。Calcineurin/NAFT 信号轴通过下调 GSK3 $\beta$  的磷酸化活化水平,解除其对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制,促进其激活下游成骨细胞分化信号通路,如磷酸化激活 Akt 信号通路等,促进骨形成<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,硼替佐米治疗组大鼠骨组织中 p-Akt 相对表达水平升高,p-GSK3 $\beta$  相对表达水平降低,且疗效优于帕米膦酸二钠治疗组。

综上所述,基于目前在体动物实验结果可知,硼替佐米改善 DOP 大鼠骨质疏松症疗效优于帕米膦酸二钠。

## 参考文献

[1] ROLVIEN T, AMLING M. Disuse osteoporosis: clinical and mechanistic insights[J]. *Calcif Tissue Int*, 2022, 110(5): 592-604.  
[2] SUTOR T W, KURA J, MATTINGLY A J, et al. The effects of

exercise and activity-based physical therapy on bone after spinal cord injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(2): 608.  
[3] 李伶俐,方真华. 跟骨超声骨密度在足部废用性骨质疏松症诊断中的应用[J]. *骨科*, 2018, 9(2): 141-143.  
[4] EIMORI K, ENDO N, UCHIYAMA S, et al. Disrupted bone metabolism in long-term bedridden patients[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156991.  
[5] BELAVY D L, BAECKER N, ARMBRECHT G, et al. Serum sclerostin and DKK1 in relation to exercise against bone loss in experimental bed rest[J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34(3): 354-365.  
[6] DAS R K, GOACHEVA V, HAMMINK R, et al. Stress-stiffening-mediated stem-cell commitment switch in soft responsive hydrogels [J]. *Nat Mater*, 2016, 15(3):318-325.  
[7] REID I R, BILLINGTON E O. Drug therapy for osteoporosis in older adults[J]. *Lancet*, 2022, 399(10329): 1080-1092.  
[8] KIM S H, KIM M O, KIM H J, et al. Bortezomib prevents ovariectomy-induced osteoporosis in mice by inhibiting osteoclast differentiation[J]. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(5): 537-546.  
[9] 陈琦,陈仁利,聂成军,等. 硼替佐米治疗多发性骨髓瘤伴肾功能不全患者的临床研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(6): 776-780.  
[10] BIE M M, TANG Y, XIA Y X, et al. HIF-1 $\alpha$  mediates osteoclast-induced disuse osteoporosis via cytoophidia in the femur of mice [J]. *Bone*, 2023, 168: 116648.  
[11] KIM J M, LIN C J, STAVRE Z, et al. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2073.  
[12] DING X Q, YANG L, HU Y, et al. Effect of local application of bisphosphonates on improving peri-implant osseointegration in type-2 diabetic osteoporosis[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5417-5437.  
[13] FANG Y P, LIU Y, ZHAO Z J, et al. Bortezomib rescues ovariectomy-induced bone loss via SMURF-mediated ubiquitination pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9661200.  
[14] TAN C R C, ABDUL-MAJIED S, CAEL B, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of bortezomib [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2019, 58(2): 157-168.  
[15] ZHANG Z W, FU X W, XU L, et al. Nanosized alumina particle and proteasome inhibitor bortezomib prevented inflammation and osteolysis induced by titanium particle via autophagy and NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5562.  
[16] TOBEIHA M, MOGHADASIAN M H, AMIN N, et al. RANKL/RANK/OPG pathway: a mechanism involved in exercise-induced bone remodeling[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6910312.  
[17] BRENT M B, BRÜEL A, THOMSEN J S. Anti-sclerostin antibodies and abaloparatide have additive effects when used as a countermeasure against disuse osteopenia in female rats[J]. *Bone*, 2022, 160: 116417.  
[18] STONE J A, MCCREA J B, WITTER R, et al. Clinical and translational pharmacology of the cathepsin K inhibitor odanacatib studied for osteoporosis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2019, 85(6): 1072-1083.  
[19] AZEVEDO A, PRADO A F, FELDMAN S, et al. MMPs are involved in osteoporosis and are correlated with cardiovascular diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(16): 1801-1810.

(下转第 1084 页)