



# 跑台运动通过抑制骨吸收CN/NFATc1信号通路改善慢性肾病小鼠骨代谢和骨结构

## Treadmill Exercise Improves Bone Metabolism and Bone Structure in Mice with Chronic Nephropathy by Inhibiting CN/NFATc1 Signal Pathway of Bone Absorption

马涛\*

MA Tao\*

**摘要:**目的:通过肾部分切除手术造慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)小鼠模型,研究跑台运动对CKD小鼠骨代谢和骨结构的影响,以及对CKD小鼠骨吸收CN/NFATc1信号通路的作用。方法:4周龄30只C57BL/6雄性小鼠,随机分为CKD对照组(CKD)、CKD运动组(CKD+E)和假手术对照组(SHAM),每组10只。CKD组和CKD+E组小鼠通过肾部分切除手术造成CKD小鼠模型,SHAM小鼠行假手术作为对照;CKD+E组小鼠进行为期8周的跑台训练,末次训练24 h后处死各组小鼠。Micro-CT法检测股骨和第三腰椎骨组织形态计量学指标,ELISA法测试血清骨代谢指标,Quantitative Real-time PCR法测定股骨中CN/NFATc1信号通路相关细胞因子mRNA表达,Western Blot检测骨中Src1和NFATc1的蛋白表达。结果:与SHAM组相比,CKD组小鼠股骨和第三腰椎松质骨BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N和BMD显著降低( $P<0.01$ ),Tb.Sp和Po(tot)显著升高( $P<0.01$ ),血清骨形成指标OC、PICP、PINP和BALP显著降低( $P<0.01$ ),血清骨吸收指标CTX、NTX和TRACP显著升高( $P<0.01$ ),骨组织TRAF6、Src1、PLC、CN、NFATc1、TRAP mRNA表达和Src1、NFATc1蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );与CKD组相比,CKD+E组小鼠股骨和第三腰椎松质骨BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N和BMD显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),Tb.Sp和Po(tot)显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),血清骨形成指标OC、PICP、PINP和BALP显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),血清骨吸收指标CTX、NTX和TRACP显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),骨组织TRAF6、Src1、PLC、CN、NFATc1、TRAP mRNA表达和Src1、NFATc1蛋白表达显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论:跑台运动通过抑制骨吸收CN/NFATc1信号通路,改善CKD小鼠骨代谢和骨结构。

**关键词:**跑台运动;骨代谢;CN/NFATc1信号通路

**Abstract:** Objective: To explore the effect of treadmill exercise on bone metabolism and bone structure in mice with CKD, and the effect of treadmill exercise on CN/NFATc1 signal pathway of bone absorption in mice with CKD. Methods: Thirty C57BL/6 male mice aged 4 weeks were randomly divided into CKD control group (CKD), CKD and exercise group (CKD+E) and sham operation control group (SHAM). CKD group and CKD+E group mice were treated with partial nephrectomy to create CKD model, and SHAM group mice were treated with sham operation as control. The mice in CKD+E group were trained on treadmill for 8 weeks. The mice in each group were killed 24 hours after the last training. The bone histomorphometric indexes of femur and the third lumbar vertebrae were measured by Micro-CT methods; the bone metabolism indexes of serum were measured by ELISA method; the mRNA expression of CN/NFATc1 signal pathway related cytokines in femur was measured by Quantitative Real-time PCR method, and the protein expression of SRC1 and NFATc1 in bone was detected by Western Blot. Results: Compared with SHAM group, BV, BV/TV, IS, TB.Th, TB.N and BMD of femur and the third lumbar vertebrae in CKD group were significantly decreased ( $P<0.01$ ), while TB.SP and

### 基金项目:

国家体育总局全民健身研究领域课题(2015B059)

### \*通信作者简介:

马涛(1979-),男,教授,博士,主要研究方向为骨组织运动适应的生物学研究,E-mail:matao8668@126.com。

### 作者单位:

齐鲁师范学院,山东 济南 250200  
Qilu Normal University, Jinan 250200, China.

Po(tot) were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and OC, PICP, PINP and BALP were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while CTX, NTX and TRACP were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression of TRAF6, SRC1, PLC, CN, NFATc1 and TRAP and the protein expression of SRC1 and NFATc1 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with CKD group, BV, BV/TV, IS, TB.Th, TB.N and BMD of femur and the third lumbar vertebrae in CKD+E group were significantly higher ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while TB.SP and Po(tot) were significantly lower ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and OC, PICP, PINP and BALP were significantly higher ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while CTX, NTX and TRACP were significantly lower ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The mRNA expression of TRAF6, SRC1, PLC, CN, NFATc1 and TRAP and the protein expression of SRC1 and NFATc1 were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Conclusions: Treadmill exercise improved the bone metabolism and bone structure of the mice with CKD by inhibiting the CN/NFATc1 signal pathway of bone absorption.

**Keywords:** treadmill exercise; bone metabolism; CN/NFATc1 signaling pathway

**中图分类号:** G804.2 **文献标识码:** A

2017 年,改善全球肾脏病预后组织(Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO)更新发布了慢性肾病矿物质和骨代谢紊乱的诊断、评估、预防和治疗指南,该指南指出慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)在全球普通成年人中的患病率很高( $> 10\%$ )(Ketteler et al., 2017),除了与心血管疾病的高风险相关外,CKD 还可导致骨矿物质代谢紊乱继而导致骨质疏松(Hruska et al., 2017)。临床治疗骨质疏松症常用的药物是抗分解代谢药物,如甲状旁腺激素为基础的骨合成代谢药物(Bover et al., 2016),但使用该药物治疗 CKD 患者的骨质疏松症存在争议,因为 CKD 患者本身就存在甲状旁腺功能亢进问题,再使用该药物无疑会大大增加 CKD 患者心血管疾病的风险(Pontes et al., 2018)。骨细胞作为机械感受器,在受到运动或机械刺激时可以促发骨重建。有研究(Watson et al., 2019)证实,运动可以提高骨量和骨强度,积极的体力活动可降低骨吸收和促进骨形成。那么,能否通过运动改善 CKD 患者的骨重建,从而防治 CKD 患者骨质疏松症的发生?此外,CN/NFATc1 信号通路已被证实为破骨细胞生成和骨吸收的主要信号通路之一,且其在 CKD 导致的骨质疏松中扮演了重要角色(Ma et al., 2019)。那么,运动能否通过 CN/NFATc1 信号通路改变 CKD 患者的骨重建以防治骨质疏松症的发生?目前鲜见此方面的研究。本研究通过肾部分切除两步法诱导 CKD 模型小鼠,研究跑台运动是否通过 CN/NFATc1 信号通路抑制 CKD 小鼠骨吸收,从而改善 CKD 模型小鼠骨密度和骨结构。

## 1 研究材料与方法

### 1.1 实验动物造模及分组

30 只 4 周龄 C57BL/6 雄性小鼠,购于上海西普尔-必凯公司[生产证号:SYXX(沪)2015-0011],在温度( $22 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 的恒温动物房适应性饲养 1 周,光照条件遵守 12:12 小时明暗交替规律,普通啮齿类动物饲料购于上海斯莱克公司(含 0.95% 钙和 1.07% 磷酸盐),整个研究过程中动

物随意饮水、进食。

将小鼠随机分为 CKD 组和假手术对照组(SHAM)。参照 Liao 等(2019)的造模方法,采用肾部分切除两步法诱导 CKD 模型,具体操作步骤:小鼠购回适应性饲养 1 周后,麻醉小鼠,切除 1/3 右肾,1 周后,切除整个左肾。造模成功后,CKD 模型小鼠被随机分为 CKD 对照组(CKD)和 CKD 运动组(CKD+E)。假手术对照组小鼠只进行造模手术中切除肾脏之前的步骤,不切除肾脏。

### 1.2 实验动物训练方案

CKD+E 组小鼠在手术后第 3 天开始跑台运动,跑台型号为段式跑台 ZH-PT,具体参照 Liao 等(2019)的运动方案:第 1 周跑台速度为 9 m/min,每天训练 10 min;第 2 周跑台速度为 12 m/min,每天训练 1 h;从第 3 周开始,跑台速度固定为 16 m/min,每天训练 1 h;共计训练 8 周。

### 1.3 实验动物取材

在末次训练 24 h 后,对 CKD+E 组小鼠眼球摘除取血,将血液收集于 1.5 mL 离心管中,1 000 rpm 离心 10 min,取血清保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中待测;取小鼠左右两侧股骨、胫骨和腰椎骨,将肌肉、软组织等去除干净,待测。动物实验均在标准动物实验室进行。

### 1.4 指标检测

#### 1.4.1 Micro-CT 法检测股骨和第三腰椎骨组织形态计量学指标

将小鼠左侧股骨和腰椎骨用 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定 24 h 后,利用微计算机断层扫描技术(micro computed tomography, Micro-CT)检测股骨近端和第三腰椎骨组织形态计量学指标(Micro-CT 仪器型号:Bruker SkyScan 1278,德国),并利用 CT An 软件对松/皮质骨组织形态计量学参数进行分析。

#### 1.4.2 ELISA 法测试血清骨代谢指标

取血清,酶联免疫法测定血清骨代谢标志物(ELISA 试剂盒购自 SIGMA),骨形成标志物:血清骨钙素(osteocalcin, OC)、血清骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)、血清 I 型原胶原 C 端前肽(procollagen type I

C propeptide, PICP)、血清 I 型胶原 N 端前肽 (procollagen type I N propeptide, PINP); 骨吸收标志物: 血清 I 型胶原交联 C-末端肽 (C-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen, CTX)、血清 I 型胶原交联 N-末端肽 (N-terminal crosslinking telopeptide of type I collagen, NTX)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRACP)。

### 1.4.3 Quantitative Real-time PCR 法测定股骨中 CN/NFATc1 信号通路相关细胞因子 mRNA 表达

参照马涛(2012)的步骤提取右侧股骨中 RNA, 反转录为 cDNA (试剂盒购自 Takara Bio)。按实时荧光定量 PCR 试剂盒 (试剂盒购自 Takara Bio) 步骤对股骨中骨吸收相关因子的 mRNA 表达进行检测。利用 Primer Premier 引物设计软件进行引物序列 (表 1) 设计, 引物的合成由上海生物工程技术有限公司完成。

表 1 引物序列  
Table 1 List of Primer Sequence

Primer 名称	序列 (5' to 3')
TRAF6-Forward	5'-GAATCACTTGGCAGCAGACTT-3'
TRAF6-Reverse	5'-GAGTTTCCATTTTGGCAGTCA-3'
Src-1-Forward	5'-TACAGACTAGAGGAGCTCTACAGG-3'
Src-1-Reverse	5'-TAAAAGTGTTATTCAGTCAGTAGC-3'
Src-3-Forward	5'-GATGCCCCAGCAGGCTT-3'
Src-3-Reverse	5'-GAAACTGTTGTGGAGGGGCT-3'
PLC-Forward	5'-GTGAGGTTCTTTCCCGCC-3'
PLC-Reverse	5'-CCCCTCACTTGGCATGAGTA-3'
CN-Forward	5'-CAAAGCGCTACTGTTGAGGC-3'
CN-Reverse	5'-TTACTGCCATTGCTGTCCGT-3'
NFATc1-Forward	5'-CCCCTCACATTCTGGTCCAT-3'
NFATc1-Reverse	5'-CAAGTAACCGTGTAGCTGCACAA-3'
TRAP-Forward	5'-TAGGTGCCAAGGTCAAAAGG-3'
TRAP-Reverse	5'-CATGTAACAGCCCCCTGTCT-3'
$\beta$ -actin-Forward	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'
$\beta$ -actin-Reverse	5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'

### 1.4.4 Western Blot 检测骨中 Src1 和 NFATc1 的蛋白表达

参照马涛(2012)的步骤提取左侧股骨和两侧胫骨中蛋白, BCA 法测定浓度、蛋白变性、转膜、封闭, 分别用 I 抗 4 °C 和 II 抗室温孵育, 所需抗体为  $\beta$ -actin 一抗 (兔抗鼠, Santa Cruz)、Src1 和 NFATc1 一抗 (兔抗鼠, Santa Cruz)、Odyssey 荧光二抗 (山羊抗兔, Odyssey)。洗膜后, Odyssey 荧光凝胶成像系统 (eBioscience) 扫描、拍照, 并用 Odyssey 凝胶图像处理系统进行数据分析, 以待测蛋白与内参蛋白的平均密度之比作为待测蛋白的相对表达水平。

### 1.5 统计学方法

各检测结果以  $M \pm S$  表示, SPSS 12.0 软件进行统计分析。使用多因素方差分析 (MANOVA) 对数据进行统计学检验, 如果发现有显著性差异, 组间采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行检验,  $P < 0.05$  差异显著性,  $P < 0.01$  差异非常显著性。

## 2 结果

### 2.1 骨组织形态计量学指标

#### 2.1.1 股骨组织形态计量学指标

SHAM 组小鼠股骨近端松质骨骨小梁三维空间结构良好, 骨小梁排列有序且致密, 骨小梁间隙较小; 与 SHAM 组相比, CKD 组小鼠股骨近端松质骨骨小梁三维空间结构遭到破坏, 骨小梁排列凌乱且疏松, 骨小梁间隙较大; CKD+E 组小鼠股骨近端松质骨骨小梁三维空间结构优于 CKD 组, 但与 SHAM 组仍存在一定差异 (图 1, 图 2)。数据显示, 与 SHAM 组相比, CKD 组小鼠股骨近端松质骨骨体积 (BV)、骨体积分数 (BV/TV)、横断面积 (IS)、骨小梁厚度 (Tb.Th)、骨小梁数量 (Tb.N) 和骨密度 (BMD) 均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 骨小梁分离度 (Tb.Sp) 和总孔隙度 [Po (tot)] 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 CKD 组相比, CKD+E 组小鼠股骨近端松质骨 BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N 和 BMD 显著升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), Tb.Sp 和 Po (tot) 显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与 SHAM 组相比, CKD+E 组小鼠股骨近端松质骨 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 和 BMD 显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), Po (tot) 显著升高 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。各组小鼠股骨皮质骨各指标未见显著性差异 ( $P > 0.05$ , 表 3)。

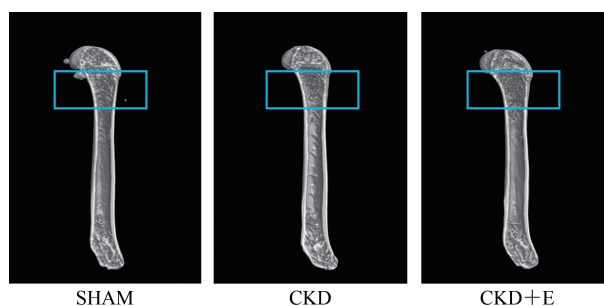


图 1 各组小鼠股骨 Micro-CT 扫描部位示意图 (40×)  
Figure 1. Micro CT Scanning Site of Femur of Mice in Each Group (40×)

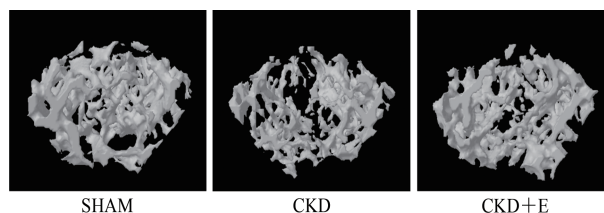


图 2 各组小鼠股骨近段松质骨 Micro-CT 扫描结果 (100×)  
Figure 2. Micro CT Scanning Results of Cancellous Bone in the Proximal Femur of Mice in Each Group (100×)

表 2 各组小鼠股骨近端松质骨组织形态计量学指标

Table 2 Histomorphometric Indexes of Cancellous Bone in Proximal Femur of Mice in Each Group

	SHAM	CKD	CKD+E
BV/mm <sup>3</sup>	0.56±0.08	0.38±0.03**	0.48±0.06 <sup>#</sup>
TV/mm <sup>3</sup>	2.98±0.15	2.76±0.09	2.89±0.13
BV/TV/%	18.39±1.24	12.32±0.93**	15.43±1.03 <sup>##&amp;</sup>
IS/mm <sup>2</sup>	2.73±0.11	2.01±0.13**	2.38±0.09 <sup>##</sup>
Tb.Th/mm	0.12±0.01	0.08±0.02**	0.10±0.01 <sup>##&amp;</sup>
Tb.N/mm <sup>-1</sup>	1.95±0.08	1.33±0.12**	1.62±0.06 <sup>##&amp;</sup>
Tb.Sp/mm	0.24±0.01	0.44±0.03**	0.32±0.01 <sup>##</sup>
Po(tot)/%	81.61±3.76	87.68±5.61**	84.57±2.58 <sup>&amp;</sup>
BMD/(g·cc <sup>-1</sup> )	0.49±0.06	0.37±0.01**	0.43±0.03 <sup>##&amp;&amp;</sup>

注:与 SHAM 组相比,\*表示  $P<0.05$ ,\*\*表示  $P<0.01$ ;与 CKD 组相比,<sup>#</sup>表示  $P<0.05$ ,<sup>##</sup>表示  $P<0.01$ ;与 SHAM 组相比,<sup>&</sup>表示  $P<0.05$ ,<sup>&&</sup>表示  $P<0.01$ ;下同。

表 3 各组小鼠股骨皮质骨组织形态计量学指标

Table 3 Histomorphometric Indexes of Femur Cortex of Mice in Each Group

	SHAM	CKD	CKD+E
BV/mm <sup>3</sup>	1.86±0.12	1.71±0.08	1.76±0.07
TV/mm <sup>3</sup>	2.13±0.06	1.96±0.11	2.04±0.07
BV/TV/%	90.76±5.23	86.16±3.66	88.03±7.53
IS/mm <sup>2</sup>	13.24±0.98	10.22±0.52	11.78±0.84
Tb.Th/mm	0.32±0.05	0.23±0.01	0.28±0.02
Tb.N/mm <sup>-1</sup>	4.13±0.12	3.41±0.34	3.84±0.09
Tb.Sp/mm	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01
Po(tot)/%	9.24±0.08	13.84±1.20	11.97±0.06
BMD/(g·cc <sup>-1</sup> )	1.84±0.06	1.67±0.13	1.72±0.08

2.1.2 腰椎骨组织形态计量学指标

SHAM 组小鼠第三腰椎松质骨骨小梁三维空间结构良好,骨小梁排列有序且致密,骨小梁间隙较小;与 SHAM 组相比,CKD 组小鼠第三腰椎松质骨骨小梁三维空间结构遭到破坏,骨小梁排列凌乱且疏松,骨小梁间隙较大;CKD+E 组小鼠第三腰椎松质骨骨小梁三维空间结构优于 CKD 组,但与 SHAM 组仍存在一定差异(图 3,图 4)。数据显示,与 SHAM 组相比,CKD 组小鼠第三腰椎松质骨 BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N 和 BMD 显著降低( $P<0.01$ ),Tb.Sp 和 Po(tot)显著升高( $P<0.01$ );与 CKD 组相比,CKD+E 组小鼠第三腰椎松质骨 BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N 和 BMD 显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),Tb.Sp 和 Po(tot)显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与 SHAM 组相比,CKD+E 组小鼠第三腰椎松质骨 BV、BV/TV 和 Tb.N 显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),Po(tot)显著升高( $P<0.05$ ),其他指标未见显著变化( $P>0.05$ ;表 4)。

2.2 血清骨代谢指标

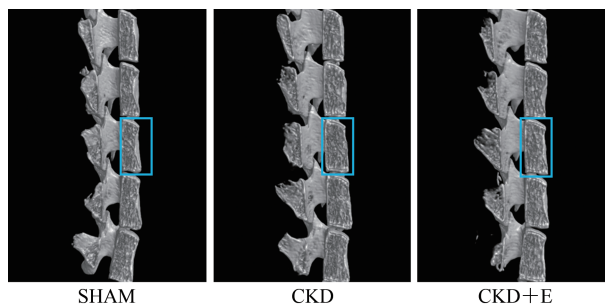


图 3 各组小鼠腰椎骨 Micro-CT 扫描部位示意图(40×)

Figure 3. Micro CT Scanning Site of Lumbar Vertebrae in Each Group (40×)

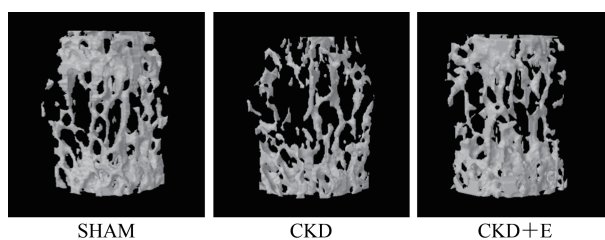


图 4 各组小鼠第三腰椎松质骨 Micro-CT 扫描结果(100×)

Figure 4. Micro CT Scanning Results of the Cancellous Bone of the Third Lumbar vertebrae in Each Group (100×)

表 4 各组小鼠第三腰椎松质骨组织形态计量学指标

Table 4 Histomorphometric Indexes of Cancellous Bone in the Third Lumbar Vertebrae of Mice in Each Group

	SHAM	CKD	CKD+E
BV/mm <sup>3</sup>	0.38±0.02	0.23±0.03**	0.31±0.01 <sup>##&amp;&amp;</sup>
TV/mm <sup>3</sup>	1.81±0.12	1.72±0.06	1.77±0.15
BV/TV/%	22.33±1.23	13.51±0.95**	17.62±1.06 <sup>##&amp;&amp;</sup>
IS/mm <sup>2</sup>	2.24±0.18	1.74±0.06**	2.06±0.17 <sup>#</sup>
Tb.Th/mm	0.08±0.01	0.06±0.00**	0.08±0.01 <sup>##</sup>
Tb.N/mm <sup>-1</sup>	2.98±0.26	1.87±0.11**	2.56±0.30 <sup>#&amp;</sup>
Tb.Sp/mm	0.19±0.01	0.31±0.05**	0.22±0.03 <sup>##</sup>
Po(tot)/%	77.67±5.23	86.49±4.67**	82.38±8.26 <sup>#&amp;</sup>
BMD/(g·cc <sup>-1</sup> )	0.65±0.02	0.48±0.03**	0.63±0.05 <sup>##</sup>

与 SHAM 组相比,CKD 组小鼠血清骨形成指标 OC、PICP、PINP 和 BALP 显著降低( $P<0.01$ ),血清骨吸收指标 CTX、NTX 和 TRACP 显著升高( $P<0.01$ );与 CKD 组相比,CKD+E 组 OC、PICP、PINP 和 BALP 显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),CTX、NTX 和 TRACP 显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );与 SHAM 组相比,CKD+E 组小鼠 PICP 显著降低( $P<0.05$ ),CTX、NTX 和 TRACP 显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),其他指标未见显著变化( $P>0.05$ ;表 5)。

2.3 股骨中 CN/NFATc1 相关细胞因子 mRNA 表达

与 SHAM 组相比,CKD 组小鼠股骨骨吸收相关因子 TRAF6、Src1、PLC、CN、NFATc1 和 TRAP 显著升高( $P<0.01$ ),而 Src3 未见显著变化( $P>0.05$ );与 CKD 组相比,CKD+E 组 TRAF6、Src1、PLC、CN、NFATc1 和 TRAP 显著

降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), Src3 没有显著变化( $P > 0.05$ ); 与 SHAM 组相比, CKD+E 组 PLC、NFATc1 和 TRAP 显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其他指标未见显著变化( $P > 0.05$ ; 表 6)。

表 5 各组小鼠血清骨代谢指标

**Table 5 Serum Bone Metabolism Indexes of Mice in Each Group**

	SHAM	CKD	CKD+E
OC/(ng·mL <sup>-1</sup> )	3.26±0.23	2.53±0.12**	2.98±0.05###
PICP/(ng·mL <sup>-1</sup> )	506.24±23.54	373.56±19.08**	452.08±34.09###&
PINP/(ng·mL <sup>-1</sup> )	106.27±9.82	68.53±3.21**	89.62±6.58###
BALP/(U·L <sup>-1</sup> )	31.74±1.08	25.33±0.94**	29.61±1.26#
CTX/(ng·mL <sup>-1</sup> )	30.26±0.64	47.27±3.27**	36.76±1.66#&
NTX/(ug·mL <sup>-1</sup> )	2.26±0.10	3.87±0.09**	2.89±0.18###&
TRACP/(U·L <sup>-1</sup> )	3.28±0.16	6.57±0.42**	4.76±0.26#&&

表 6 股骨中骨吸收相关细胞因子 mRNA 表达

**Table 6 mRNA Expression of Bone Resorption Related Cytokines in Femur**

	SHAM	CKD	CKD+E
TRAF6	0.58±0.06	0.91±0.10**	0.67±0.03#
Src1	2.97±0.13	3.92±0.22**	3.17±0.18#
Src3	1.16±0.05	1.42±0.14	1.20±0.08
PLC	1.85±0.11	4.36±0.24**	2.34±0.16###&
CN	0.83±0.06	1.26±0.13**	0.98±0.07#
NFATc1	3.25±0.25	4.66±0.33**	3.86±0.18###&&
TRAP	2.16±0.08	3.52±0.06**	2.88±0.14###&

2.4 骨组织中 Src1 和 NFATc1 的蛋白表达

与 SHAM 组相比, CKD 组小鼠骨组织中 Src1 和 NFATc1 蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ ); 与 CKD 组相比, CKD+E 组显著降低( $P < 0.01$ ); 与 SHAM 组相比, CKD+E 组显著升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ; 表 7, 图 5)。

表 7 骨组织中 Src1 和 NFATc1 的蛋白表达

**Table 7 Protein Expression of Src1 and NFATc1 in Bone Tissue**

	SHAM	CKD	CKD+E
Src1	0.86±0.05	1.96±0.22**	1.23±0.06###&&
NFATc1	0.73±0.06	1.57±1.20**	0.92±0.03###&

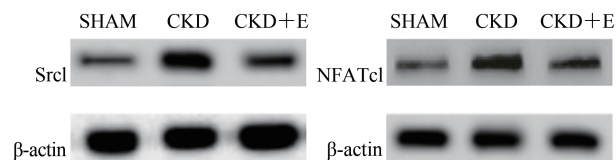


图 5 骨组织中 Src1 和 NFATc1 的蛋白表达

Figure 5. Protein Expression of Src1 and NFATc1 in Bone Tissue

3 分析与讨论

3.1 CKD 对小鼠骨结构和骨代谢的影响

骨是一种矿物质储存库, 有助于维持血清钙和磷酸盐的稳态 (Roschger et al., 2019)。当肾功能恶化时, 骨-甲状腺旁腺-肾轴被破坏, 随后发生各种矿物质和激素紊乱 (Wang et al., 2019)。CKD 导致的矿物质骨紊乱主要表现在甲状腺旁腺激素、维生素 D、成纤维细胞生长因子 23 (FGF-23)、钙和磷酸盐水平以及骨转换的代谢紊乱, 这些电解质、激素和骨代谢之间的代谢紊乱不仅导致骨质疏松, 而且还增加了血管钙化的风险, 骨和矿物质电解质代谢紊乱以及心血管并发症增加 CKD 患者的死亡率 (Jin et al., 2018)。本研究中, 与 SHAM 组相比, CKD 组小鼠股骨近端松质骨和第三腰椎松质骨骨小梁三维空间结构遭到破坏, 骨小梁排列凌乱且疏松, 骨小梁间隙较大, BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N 和 BMD 显著降低而 Tb.Sp 和 Po (tot) 显著升高, 说明采取的肾部分切除两步法成功诱导 CKD 模型小鼠。血清骨代谢指标显示, 与 SHAM 组相比, CKD 组小鼠血清骨形成指标 OC、PICP、PINP 和 BALP 显著降低而血清骨吸收指标 CTX、NTX 和 TRACP 显著升高, 进一步证明 CKD 小鼠骨代谢的失衡, 骨形成和骨吸收的动态平衡被破坏, 骨吸收大于骨形成, 从而造成骨质疏松。

值得注意的是, 本实验中 CKD 对小鼠骨质的影响仅表现在血清骨代谢指标和松质骨方面, 皮质骨方面表现并不明显。与 SHAM 组相比, CKD 组小鼠股骨皮质骨各指标未见显著性改变。提示, 本实验可能是因为手术造模之后的时间不够长, CKD 对骨质的损害还未能能在皮质骨方面显示出来。近年研究显示, CKD 对骨质的影响是逐步深入的过程, 肾功能障碍对骨质的影响最初可能仅表现在代谢指标方面, 随着病情的延长, 松质骨结构开始出现变化, 如果病情时间进一步延长, 皮质骨结构才会出现改变 (Donderski et al., 2017; Massy et al., 2017)。

3.2 跑台运动对 CKD 小鼠骨结构和骨代谢的影响

据报道, 运动可以改善老年和绝经后女性的骨质疏松症 (Chan et al., 2018; Yuan et al., 2016)。然而, CKD 患者表现为慢性代谢功能障碍, 是特殊人群, 运动改善老年和绝经后女性骨质疏松症的研究结论并不能直接推论至 CKD 患者 (Bellasi et al., 2018)。在临床实践中, 医生由于担心运动可能会加重 CKD 患者的负担, 所以对 CKD 患者的运动干预措施通常采取保守态度 (Hiraki et al., 2017; Watson et al., 2020)。然而, 《KDIGO 临床实践指南: 慢性肾脏病患者的血压管理》建议 CKD 患者应进行适当的体力活动 (Levin et al., 2014)。对透析前 CKD 患者进行的几项运动研究表明, 至少在轻度 CKD 患者中, 运动是安全的 (Heiwe et al., 2011; Johansen et al., 2012), 运动被认为对 CKD 患者的血管健康有益 (Deligiannis et al., 1999; Van Craenenbroeck et al., 2014)。

关于运动对 CKD 患者骨质疏松影响的研究很有限。本研究通过肾部分切除两步法诱导建立 CKD 模型小鼠,

在对 CKD 模型小鼠进行跑台训练时,考虑到动物手术后恢复期的身体状况以及动物对跑台训练的适应过程,参照 Liao 等(2019)采取逐步增加运动强度和运动时间的训练方案。事实证明,这种循序渐进的运动方法是安全可靠的,在训练和饲养过程中没有动物受伤或死亡。结果显示,与 CKD 组相比,CKD+E 组小鼠股骨近端松质和第三腰椎松质骨骨小梁三维空间结构得到优化,骨小梁排列有序且紧密,骨小梁间隙变小,BV、BV/TV、IS、Tb.Th、Tb.N 和 BMD 显著升高而 Tb.Sp 和 Po (tot) 显著降低,说明运动能够改善 CKD 小鼠的骨质结构,使 CKD 对骨结构的破坏得到恢复。血清骨代谢指标也显示,与 CKD 组相比,CKD+E 组小鼠血清骨形成指标 OC、PICP、PINP 和 BALP 显著升高而血清骨吸收指标 CTX、NTX 和 TRACP 显著降低,进一步证明了运动可以改善 CKD 小鼠骨代谢失衡,使骨形成和骨吸收的动态平衡得到恢复,并最终使骨密度和骨结构得到改善。

值得注意的是,由于人与小鼠在对运动应激和机体适应方面存在差异,本研究所采用的较大运动强度是否也适用于人体和 CKD 患者仍需更多的实证研究进行验证。

### 3.3 CN/NFATc1 信号通路在跑台运动抑制 CKD 小鼠骨吸收中的作用

CN/NFATc1 信号通路是破骨细胞分化的主要信号通路之一(Yang et al., 2019),其上游细胞因子核因子  $\kappa$ B 受体激活因子配体(RANKL)与核因子  $\kappa$ B 受体激活因子(RANK)结合后,将信号传递给链接蛋白肿瘤坏死因子受体(TNFRs)家族,继而激活其下游一系列信号通路,包括 NF- $\kappa$ B 信号通路、MAPK 信号通路、CN/NFATc1 信号通路、PI3K/Akt 信号通路和蛋白激酶 C 信号通路等(Li et al., 2019; Wang et al., 2018)。其中,CN/NFATc1 信号通路是经肿瘤坏死因子受体 TNFR6 激活的重要通路,活化 T 细胞核因子(NFAT)是一种钙离子调节性转录因子,包括 NFAT1~4,被钙调磷酸酶(CN)活化后,快速转为进入细胞核并与相应启动子结合启动基因的转录(Li et al., 2017)。将 CN 和 NFATc1 特异性阻断后,单核巨噬细胞系统将不能分化为破骨细胞(Zeng et al., 2017)。有实验证明,在没有 RANKL 存在的情况下单独激活 NFATc1,可以诱导破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞,单独激活 AP-1 或 NF- $\kappa$ B 则无法诱导破骨细胞的分化(Xu et al., 2016)。因此,CN/NFATc1 可能是破骨细胞分化的关键性通路。CN/NFATc1 两条信号通路可以简单表示为:RANKL+RANK $\rightarrow$ TRAF6 $\rightarrow$ Src $\rightarrow$ PLC $\rightarrow$ IP3 $\rightarrow$ Ca<sup>2+</sup> $\rightarrow$ CN $\rightarrow$ NFATc1 $\rightarrow$ 促进破骨细胞分化;RANKL+RANK $\rightarrow$ TRAF6 $\rightarrow$ Src $\rightarrow$ PLC $\rightarrow$ PI3K $\rightarrow$ Akt 抑制 GSK-3 $\rightarrow$ NFATc1 活化 $\rightarrow$ 促进破骨细胞分化(Shen et al., 2015)。

本研究中,通过荧光定量 PCR 的方法测试小鼠股骨中 CN/NFATc1 信号通路相关细胞因子的 mRNA 表达。结

果显示,与 SHAM 组相比,CKD 组小鼠股骨 CN/NFATc1 信号通路相关因子 TRAF6、Src1、PLC、CN、NFATc1 和 TRAP 显著升高;与 CKD 组相比,CKD+E 组小鼠股骨骨吸收相关因子 TRAF6、Src1、PLC、CN、NFATc1 和 TRAP 显著降低。说明 CKD 可以通过上调 CN/NFATc1 信号通路相关因子的基因表达,促进破骨细胞的生成和活化,使骨吸收大于骨形成,从而破坏骨密度和骨结构,而运动则可以抑制 CN/NFATc1 信号通路相关因子的基因表达,改善骨代谢,降低 CKD 造成的骨质损害。Western Blot 检测结果显示,与 SHAM 组相比,CKD 组小鼠胫骨中 Src1 和 NFATc1 蛋白表达显著升高;与 CKD 组相比,CKD+E 组显著降低,进一步从蛋白水平上揭示了 CN/NFATc1 信号通路在 CKD 骨损害中的作用,以及运动通过 CN/NFATc1 信号通路抑制 CKD 小鼠的骨吸收。值得注意的是,在本研究中各组之间 Src3 的 mRNA 表达未见显著差异,提示,Src3 在 CKD 引起的骨损害以及运动调节 CKD 骨代谢过程中未发挥主要作用。

## 4 结论

CKD 对小鼠松质骨骨密度和骨结构的影响大于皮质骨;跑台运动可改善 CKD 小鼠的骨代谢,提高其骨密度和骨结构;跑台运动通过抑制骨吸收 CN/NFATc1 信号通路改善 CKD 小鼠骨代谢和骨结构。

## 参考文献:

- 马涛,2012.上下坡跑台运动对去卵巢小鼠破骨细胞分化的影响[D].上海:华东师范大学.
- BELLASI A, MORRONE L, MEREU M C, et al., 2018. CKD-MBD management: What is the role of parathyroidectomy? Results from a nationwide survey in Italy[J]. *J Nephrol*, 31(4):585-591.
- BOVER J, UREÑA-TORRES P, LLORET M J, et al., 2016. Integral pharmacological management of bone mineral disorders in chronic kidney disease (part II): From treatment of phosphate imbalance to control of PTH and prevention of progression of cardiovascular calcification[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 17(10):1363-1373.
- CHAN D C, CHANG C B, HAN D S, et al., 2018. Effects of exercise improves muscle strength and fat mass in patients with high fracture risk: A randomized control trial[J]. *J Formos Med Assoc*, 117(7):572-582.
- DELIGIANNIS A, KOUIDI E, TASSOULAS E, et al., 1999. Cardiac effects of exercise rehabilitation in hemodialysis patients[J]. *Int J Cardiol*, 70(3):253-266.
- DONDERSKI R, STRÓŻECKI P, SULIKOWSKA B, et al., 2017. Aldosterone antagonist therapy and its relationship with inflammation, fibrosis, thrombosis, mineral-bone disorder and cardiovascular complications in peritoneal dialysis (PD) patients[J]. *Int Urol Nephrol*, 49(10):1867-1873.
- HEIWE S, JACOBSON S H, 2011. Exercise training for adults with chronic kidney disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 96(10):1002-1006.

- HIRAKI K, SHIBAGAKI Y, IZAWA K P, et al., 2017. Effects of home-based exercise on pre-dialysis chronic kidney disease patients: A randomized pilot and feasibility trial[J]. *BMC Nephrol*, 118(10):1186-1198.
- HRUSKA K A, SUGATANI T, AGAPOVA O, et al., 2017. The chronic kidney disease-Mineral bone disorder (CKD-MBD): Advances in pathophysiology[J]. *Bone*, 100(1):80-86.
- JIN J J, ZHANG S L, XU J S, et al., 2018. Prevalence of chronic kidney disease-mineral bone disorder in hemodialysis patients in Hebei, China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 131(22):2749-2751.
- JOHANSEN K L, PAINTER P, 2012. Exercise in individuals with CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 59(1):126-134.
- KETTELER M, BLOCK G A, EVENEPOEL P, et al., 2017. Executive summary of the 2017 KDIGO chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) guideline update: What's changed and why it matters[J]. *Kidney Int*, 92(1):26-36.
- LEVIN A, STEVENS P E, 2014. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: Behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward[J]. *Kidney Int*, 85(1):49-61.
- LI J, LI Y, PAN S, et al., 2019. Paeonol attenuates ligation-induced periodontitis in rats by inhibiting osteoclastogenesis via regulating Nrf2/NF- $\kappa$ B/NFATc1 signaling pathway[J]. *Biochimie*, 156(1):129-137.
- LI X, YE J X, XU M H, et al., 2017. Evidence that activation of ASIC1a by acidosis increases osteoclast migration and adhesion by modulating integrin/Pyk2/Src signaling pathway[J]. *Osteoporos Int*, 28(7):2221-2231.
- LIAO H W, HUANG T H, CHANG Y H, et al., 2019. Exercise alleviates osteoporosis in rats with mild chronic kidney disease by decreasing sclerostin production[J]. *Int J Mol Sci*, 20(8):1-14.
- MA Z, YU R, ZHAO J, et al., 2019. Constant hypoxia inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by regulating phosphorylation of JNK and I $\kappa$ B $\alpha$ [J]. *Inflamm Res*, 68(2):157-166.
- MASSY Z, DRUEKE T, 2017. Adynamic bone disease is a predominant bone pattern in early stages of chronic kidney disease [J]. *J Nephrol*, 30(5):629-634.
- PONTES F S C, LOPES M A, DE SOUZA L L, et al., 2018. Oral and maxillofacial manifestations of chronic kidney disease-mineral and bone disorder: A multicenter retrospective study[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125(1):31-43.
- ROSCHGER A, ROSCHGER P, WAGERMAIER W, et al., 2019. The contribution of the pericanalicular matrix to mineral content in human osteonal bone[J]. *Bone*, 123(1):76-85.
- SHEN C L, HAN J, WANG S, et al., 2015. Green tea supplementation benefits body composition and improves bone properties in obese female rats fed with high-fat diet and caloric restricted diet[J]. *Nutr Res*, 35(12):1095-1105.
- VAN CRAENENBROECK A H, VAN CRAENENBROECK E M, KOUIDI E, et al., 2014. Vascular effects of exercise training in CKD: Current evidence and pathophysiological mechanisms[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(7):1305-1318.
- WANG A Y, AKIZAWA T, BAVANANDAN S, et al., 2019. 2017 Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) guideline update implementation: Asia summit conference report[J]. *Kidney Int Rep*, 4(11):1523-1537.
- WANG M Y, SHEN C, AN M F, et al., 2018. Combined treatment with dendrobium candidum and black tea extract promotes osteoprotective activity in ovariectomized estrogen deficient rats and osteoclast formation[J]. *Life Sci*, 200(1):31-41.
- WATSON E L, BAKER L A, WILKINSON T J, et al., 2020. Reductions in skeletal muscle mitochondrial mass are not restored following exercise training in patients with chronic kidney disease [J]. *FASEB J*, 34(1):1755-1767.
- WATSON S L, WEEKS B K, WEIS L J, et al., 2019. High-intensity exercise did not cause vertebral fractures and improves thoracic kyphosis in postmenopausal women with low to very low bone mass: The LIFTMOR trial[J]. *Osteoporos Int*, 30(5):957-964.
- XU X, QI X, YAN Y, et al., 2016. Synthesis and biological evaluation of rhein amides as inhibitors of osteoclast differentiation and bone resorption[J]. *Eur J Med Chem*, 123(1):769-776.
- YANG Y, CHUNG M R, ZHOU S, et al., 2019. STAT3 controls osteoclast differentiation and bone homeostasis by regulating NFATc1 transcription[J]. *J Biol Chem*, 294(42):15395-15407.
- YUAN Y, CHEN X, ZHANG L, et al., 2016. The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and treatment of osteoporosis[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 122(2):122-130.
- ZENG X, ZHANG Y, WANG S, et al., 2017. Artesunate suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis through inhibition of PLC $\gamma$ 1-Ca<sup>2+</sup>-NFATc1 signaling pathway and prevents ovariectomy-induced bone loss[J]. *Biochem Pharmacol*, 124(1):57-68.

(收稿日期:2020-02-03; 修订日期:2021-10-26; 编辑:尹航)

