朱慧明, 张会欣, 周子喆, 等. 骨多肽通过调控自噬与凋亡改善去卵巢大鼠骨质疏松的作用及机制 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(6): 387−396. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030061
ZHU Huiming, ZHANG Huixin, ZHOU Zizhe, et al. Effects and Mechanisms of Bone Polypeptide on Improving Osteoporosis in Ovariectomized Rats via Regulation of Autophagy and Apoptosis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(6): 387−396. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030061

·营养与保健·

骨多肽通过调控自噬与凋亡改善去卵巢大鼠骨质疏松的作用及机制

朱慧明[1], 张会欣[1], 周子喆[1], 张亚楠[2], 王羽然[1], 刘颜松[1], 许　峰[3,4], 冯小龙[1,*]
（1.石家庄学院化工学院, 河北石家庄 050035;
2.河北医科大学第二医院心内科, 河北石家庄 050061;
3.河北智同生物制药股份有限公司, 河北保定 072656;
4.河北省动物源性肽类生化药物技术创新中心, 河北石家庄 050035）

摘　要: 目的：探讨骨多肽是否通过自噬与凋亡途径对骨质疏松大鼠发挥保护作用。方法：建立去卵巢骨质疏松大鼠模型（Postmenopausal osteoporosis，POMP），随机分为假手术组、模型组、己烯雌酚组（25 μg/kg）及骨多肽低中高剂量组（50、100、200 mg·kg^{-1}）。术后灌胃给药 90 d，采用双能 X 射线法检测骨密度（Bone mineral density，BMD），三点弯曲试验检测骨生物力学指标，形态计量学观察骨微结构，酶联免疫吸附实验法（ELISA）检测血清骨代谢指标，RT-qPCR 和 Western blot 方法检测自噬相关基因（*p62*、*Beclin-1*、*LC3-II*）与凋亡相关基因（*Caspase-3*、*Caspase-9*、*BAX*、*Bcl-2*）的 mRNA 和蛋白表达。结果：骨多肽可显著提高骨质疏松大鼠骨组织钙、镁、磷、羟脯氨酸含量（P<0.05 或 P<0.01），增加血清甲状旁腺素 (parathyroid hormone，PTH)、雌二醇（estradiol，E2）水平，降低骨钙素（osteocalcin，BGP）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate resistant acid phosphatase，TRAP）、睾酮（testosterone，T）水平，改善骨代谢；增加骨质疏松大鼠骨小梁数量，减小骨小梁分离度，增强骨生物力学特性和骨密度，改善骨微结构。骨多肽在 50~200 mg·kg^{-1} 剂量范围内，激活自噬通路并抑制凋亡，*p62* 的 mRNA 和蛋白表达降低，*Beclin-1*、*LC3-II* 的 mRNA 和蛋白表达升高；*BAX*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 的 mRNA 和蛋白表达降低，*Bcl-2* 的 mRNA 和蛋白表达升高，其中高剂量组与模型组相比均具有统计学差异（P<0.05 或 P<0.01）。结论：骨多肽可通过 *Beclin-1/LC3-II* 轴激活自噬通路、*Bcl-2/BAX-Caspase* 级联抑制线粒体凋亡双重调控机制改善骨质疏松，为骨质疏松的靶向治疗提供了新策略。

关键词: 骨多肽, 去卵巢大鼠, 自噬, 凋亡, 骨质疏松
中图分类号: R965.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)06−0387−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030061
本文网刊:

Effects and Mechanisms of Bone Polypeptide on Improving Osteoporosis in Ovariectomized Rats via Regulation of Autophagy and Apoptosis

ZHU Huiming[1], ZHANG Huixin[1], ZHOU Zizhe[1], ZHANG Yanan[2], WANG Yuran[1], LIU Yansong[1], XU Feng[3,4], FENG Xiaolong[1,*]
（1.School of Chemical Engineering, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, China;
2.Department of Cardiology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050061, China;
3.Hebei Zhitong Bio Pharmaceutical Co., Ltd., Baoding 072656, China;
4.Hebei Province Animal Derived Peptide Biochemical Drug Technology Innovation Center, Shijiazhuang 050035, China）

收稿日期: 2025−03−07
基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目（216Z2401G）; 河北省创新能力提升计划项目（235A2402D）。
作者简介: 朱慧明（1976−）, 女, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 多肽类功能性食品研究与开发, E-mail: zhmoon22@163.com。
*** 通信作者:** 冯小龙（1976−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能性食品开发, E-mail: 15031137856@163.com。

Abstract: Objective: To investigate whether bone polypeptide (GDT) exerts protective effects against osteoporosis in rats through autophagy and apoptosis pathways. Methods: A postmenopausal osteoporosis rat model (POMP) was established via ovariectomy. Rats were randomly divided into Sham-operated, model, diethylstilbestrol (25 μg/kg), and GDT low-, medium-, and high-dose groups (50, 100, 200 mg·kg^{-1}). Intragastric administration was performed for 90 days post-surgery. Bone mineral density (BMD) was measured using dual-energy X-ray absorptiometry. Bone biomechanical properties were evaluated via three-point bending tests. Bone microstructure was analyzed by morphometry. Serum bone metabolism markers were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). mRNA and protein expressions of autophagy-related genes (*p62*, *Beclin-1*, *LC3-II*) and apoptosis-related genes (*Caspase-3*, *Caspase-9*, *BAX*, *Bcl-2*) were determined by RT-qPCR and Western blot. Results: GDT significantly increased calcium, magnesium, phosphorus, and hydroxyproline contents in bone tissues (P<0.05 or P<0.01), elevated serum parathyroid hormone (PTH) and estradiol (E2) levels, reduced osteocalcin(BGP), alkaline phosphatase (ALP), tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), and testosterone (T) levels, and improved bone metabolism. Bone trabecular number was increased, trabecular separation was decreased, and biomechanical properties and BMD were enhanced, with improved bone microstructure. Within the 50~200 mg·kg^{-1} dose range, GDT activated the autophagy pathway and inhibited apoptosis. mRNA and protein expressions of *p62* were down regulated, while *Beclin-1* and *LC3-II* were upregulated. Expressions of *BAX*, *Caspase-3*, and *Caspase-9* were reduced, whereas *Bcl-2* was increased. Significant differences were observed in the high-dose group compared to the model group (P<0.05 or P<0.01). Conclusion: GDT ameliorates osteoporosis through dual regulatory mechanisms: Activating the autophagy pathway via the *Beclin-1*/*LC3-II* axis and inhibiting mitochondrial apoptosis via the *Bcl-2*/*BAX*-*Caspase* cascade. This study provides a novel strategy for targeted osteoporosis therapy.

Key words: bone polypeptide; ovariectomy rats; apoptosis; autophagy; osteoporosis

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, POMP)是一种因雌激素缺乏而诱发的系统性骨代谢失衡疾病。流行病学调查数据显示, POMP 是发病率最高的骨质疏松症[1], 50 岁以上女性 POMP 的患病率高达 32.1%, 同时 POMP 所致髋骨骨折后 1 年内死亡率高达 23.5%[2]。随着全球老龄化的加剧, POMP 已成为世界卫生组织高度关注并亟待解决的主要公共卫生问题[3]。目前临床 POMP 药物治疗策略以抗骨吸收药物(如双膦酸盐、雌激素等)和促骨形成药物(如特立帕肽)为主, 但存在长期安全性风险、患者依从性差及部分药物疗效局限性等不足[4−6]。因此, 寻求疗效确切、毒副作用小, 可口服的新型治疗药物成为迫切需求。

近年研究表明, 哺乳动物骨骼来源骨多肽作为一种内源性成骨生长因子, 具有富含 Gly-Pro-Hyp 三肽序列、分子量小于 10 kDa 的独特分子特征, 其氨基酸序列保守, 高度同源, 参与骨细胞间的通讯[7], 具有骨靶向性[8], 具有刺激骨细胞增殖和分化、调节骨矿物质代谢、促进骨骼生长与修复以及加速骨折愈合等多重作用, 已成为功能性食品、药品研发的热点。鹿茸多肽通过 PI3K/AKT 信号通路促进成骨细胞的增殖、分化和骨形成进而抑制 POMP[9]; 羊骨肽钙螯合物可促进小鼠胚胎成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 细胞增殖, 增加矿化染色面积和矿化结节数量, 提高 *Runx2*、*CoL I*、*Osterix* 等分化相关基因 mRNA 的表达量, 促进骨形成抑制骨吸收而改善大鼠 POMP[10]; 注射用骨肽可上调 ALP 促进骨形成, 下调 TRAP 抑制骨吸收, 增加骨矿物质元素钙、磷含量, 增强骨密度, 改善骨形态而改善大鼠 POMP[11]; 复方骨肽注射液可加快骨质疏松症伴转子下粉碎性骨折患者内固定术后关节功能恢复, 减轻疼痛, 改善骨密度, 促进骨折端愈合[12]。目前临床上骨多肽研究多以改善骨质疏松, 促进骨折愈合临床观察为主, 改善 POMP 分子机制尚不明确。

自噬与凋亡的动态平衡对维持骨组织稳态具有决定性作用, 是骨代谢调控的核心机制。近年来研究证实, 骨细胞自噬-凋亡轴的功能失调是骨质疏松症发生发展的关键病理基础[13−14], 在骨关节炎等骨疾病中发挥重要作用[15]。从药理学角度分析, 衰老或雌激素缺乏导致的自噬抑制与凋亡激活, 不仅破坏了骨重建的精细平衡, 还可能通过影响成骨细胞存活和功能发挥, 导致骨量流失[14]。在分子机制层面, 自噬相关基因(如 *Beclin 1*、*DRAM*)的异常表达可通过调控线粒体途径等凋亡信号通路, 直接影响骨细胞的命运决定: *Beclin 1* 基因突变不仅抑制自噬活性, 还可能通过激活凋亡信号通路加剧骨丢失; 而 DRAM 基因的调控则展现出保护性作用。深入研究自噬凋亡途径可为骨质疏松症的治疗提供新的靶点和策略[16−18]。POMP 模型能够重现人类绝经后因雌激素缺乏导致的骨质疏松[19−20], 是骨质疏松药物评价推荐模型。本研究采用大鼠去卵巢骨质疏松模型, 探究猪骨来源的骨多肽对骨质疏松大鼠的骨保护作用以及是否与调节自噬与凋亡途径有关。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雌性 SPF 级 SD 大鼠　60 只, 3 月龄, 体质量 220~240 g, 斯贝福(北京)有限公司, 许可证号: SCXK(京)2019-0010; 大鼠维持饲料　批号 20230614, 斯贝福(北京)有限公司, 许可证号: SCXK(京)2019-0010; 骨多肽　河北智同生物制药股份有限公司; 猪

筒骨(冷冻)　石家庄双鸽食品有限责任公司；动物蛋白酶(4000 U/g)　南宁东恒华道生物科技有限责任公司；己烯雌酚片　合肥久联制药有限公司；碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)、骨钙素(osteocalcin, OC)、甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)、雌二醇(estradiol, E2)、睾酮(testosterone, T)测试盒　上海酶联生物科技有限公司；镁(Magnesium, Mg)、磷(phosphorus, P)、羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)、总蛋白(BCA protein)测试盒　南京建成生物工程研究所；小鼠抗人 B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)单克隆抗体　美国 Santa Cruz Biotechnology；兔抗人 BCL2-Associated X 的蛋白质(BCL2-Associated X, BAX)多克隆抗体、兔抗人自噬相关基因(B-cell lymphoma-2-interacting myosin-like coiled-coil protein 1, Beclin1)多克隆抗体　美国 Proteintech Group, Inc.；兔抗人半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cysteine aspastic acid-specific protease 3, Caspase-3)单克隆抗体、兔抗人胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(cysteine aspastic acid-specific protease 9, Caspase-9)多克隆抗体、兔抗人 p62 多克隆抗体　美国 Abcam Plc；兔抗人微管相关蛋白轻链 3 II(Human microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II)单克隆抗体　碧云天生物技术公司；RT-qPCR 引物　上海生工生物技术公司。

Leica 2155 硬组织切片机、MC170HD 成像系统　德国徕卡公司；Nikon NIS-Elements 半自动图像数字化分析仪　日本尼康株式会社；YM-Ⅲ型石膏打磨机　西北医疗仪器集团有限公司；RS36 全自动染色机　常州派斯杰医疗设备有限公司；PHY-Ⅲ病理组织漂烘仪　杭州中威电子股份有限公司；XD 711 酶标分析仪　上海迅达医疗仪器公司；GE Lunarprodigy 骨密度测试仪　美国 General Electric Company 公司；7300 型实时荧光定量(qRT-PCR)仪　美国 Applied Biosystems Inc.公司；EPS-300 电泳仪　上海天能科技有限公司；Mini Trans-Blot 蛋白转印系统　伯乐生命医学产品有限公司；KSS 图像分析软件　KSS Scientific Consultants, UT, USA。

1.2　实验方法

1.2.1　骨多肽制备及成分分析　本课题组参照专利[21]，选用健康新鲜(刚解冻)猪筒骨，经自来水清洗、剔肉后粉碎，按照 1:4 比例加入水性介质 140 ℃ 提取 3 h，提取液降至 40 ℃ 时分离除去脂肪，提取液加 5% 骨蛋白酶水解 40 ℃ 水解 2 h，100 ℃ 加热 15 min 使酶灭活，130 ℃ 高温灭菌 50 s，用 1 μm 滤膜预过滤滤液后，滤器预滤物再经过 10 kDa 超滤收集滤液，旋转蒸发仪浓缩至干，倒入玻璃板冷冻干燥，获得骨多肽。高效液相色谱法测定骨多肽中游离氨基酸含量和多肽含量[22]。骨多肽冷冻保存，现用现配。

1.2.2　动物分组、造模和给药　大鼠适应性喂养 1 周后，按体重随机分为 6 组：假手术组(Sham)、模型组(OVX)、阳性药组己烯雌酚组(DES, 25 μg/kg·day)，骨多肽低剂量组(GDTL, 50 mg/kg·day, 0.5 倍临床等效剂量)、中剂量组(GDTM, 100 mg/kg·day, 临床等效剂量[23])、高剂量组(GDTH, 200 mg/kg·day, 2 倍临床等效剂量)，每组 10 只。除假手术组外，其余各组腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉，结扎子宫，切除双侧卵巢，复制绝经后骨质疏松模型[24]，Sham 组仅切除卵巢周围部分等量的脂肪组织。术后连续 3 d 给予青霉素钠预防感染；术后第 4 d 起各组灌胃予以相应药物，Sham 组和 OVX 组予以等量 0.5% CMC-Na, 10 mL·kg^{-1}，每日 1 次，连续给药 12周。实验过程遵守石家庄学院生物医学伦理委员会相关规定，伦理号：20230216002。

1.2.3　样本采集　实验期间，观察大鼠体重、饮食、活动等一般状况。给药结束，大鼠禁食过夜，腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，腹动脉采血，全血静置后离心制备血清。快速取骨组织，分离除净附着肌肉及结缔组织，右侧胫骨、右侧股骨生理盐水润湿的纱布包裹，铝箔纸包裹，编号，−20 ℃ 保存备测；左侧股骨液氮转−80 ℃ 超低温冰箱保存备检，子宫、左侧胫骨用 10% 福尔马林磷酸缓冲液固定备测。

1.2.4　骨密度检测　取 1.2.3 右侧胫骨，采用双能 X 线吸收扫描仪检测骨密度。

1.2.5　骨生物力学检测　取 1.2.3 各组大鼠右侧股骨，设置支点距离 20 mm，股骨中段载荷速度 2 mm·min^{-1}，直至股骨断裂，采用三点弯曲实验，描计负荷-位移曲线，并测量最大弯曲力、抗弯强度、断裂挠度、弹性段终点荷等生物力学参数。

1.2.6　骨微结构观察　取福尔马林固定的左侧胫骨，经不脱钙包埋、硬组织切片机切片，甲苯胺蓝(toluidineblue, TB)染色，脱水、透明、封片，于显微镜下放大 100 倍观察骨组织形态变化，并采用图像分析系统进行骨形态计量学测定，参数包括骨小梁体积百分比(percentage of trabecular bone volume, TBV%)、骨小梁吸收表面百分比(percentage of trabecular bone resorbed surface, TRS%)、骨小梁形成表面百分比(percentage of bonetrabeculation surface, TFS%)、活性生成表面百分比(active surface fraction, AFS%)、骨小梁矿化率(mineralization rate of trabecular bone, MAR)、类骨质平均宽度(average osteoid width, OSW)、骨皮质矿化率(mineralization rate of cortical bone, mAR)[25]。

1.2.7　骨生化检测　取 1.2.4 检测完骨密度的右侧胫骨烘干至恒重，盐酸消化过滤，取滤液调 pH 至 6，按试剂盒说明依次检测 Ca、Mg、P、Hyp。

1.2.8　血清骨代谢指标检测　腹主动脉采血，静置 4 h 后，4 ℃，3000 r·min^{-1} 离心 10 min 分离血清，按照试剂盒说明书测定骨代谢指标 ALP、TRAP、PTH、BGP、E2、T。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

基因名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	长度(bp)
p62	GAAGATAGCCTTGGAGTCGGT	CTGGAGTTCACCTGTGGATG	127
Beclin-1	GCCTCTGAAACTGGACACGA	CCTGGGCTGTGGTAAGTAATG	86
LC3-Ⅱ	CTCCCAAGAAACCTTCGGCT	AAGCCTAACAAGACTGGCCC	215
BAX	GGTTGCCCTCTTCTACTTTGC	TCTTCCAGATGGTGAGCGAG	239
Caspase-3	GCGGTATTGAGACAGACAGTG	GGGTGCGGTAGAGTAAGCATA	95
Caspase-9	ACTGCTTCGTGGTGGTCATC	CATCCATCTGTGCCATAGACA	85
Bcl-2	GGATGACTTCTCTCGTCGCTAC	TGACATCTCCCTGTTGACGCT	100
GAPDH	TG AACGGGAAGCTCACTGG	GCTTCACCACCTTCTTGATGTC	120

1.2.9 RT-qPCR 检测自噬与凋亡相关基因 mRNA 表达 将左侧股骨于液氮中研碎,于无核酸酶的离心管中,按照试剂盒提取总 RNA 并定量,逆转录成 cDNA,RT-qPCR 扩增检测 *p62*、*Beclin-1*、*LC3-Ⅱ*、*BAX*、*Caspase-3*、*Caspase-9*、*Bcl-2* 的 mRNA 表达。PCR 扩增程序:95 ℃ 变性 30 s,95 ℃ 退火 5 s,60 ℃ 延伸 30 s,进行 40 个循环,以 *GAPDH* 为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目标 mRNA 相对表达量。引物信息见表 1。

1.2.10 蛋白免疫印迹法(Western Blot) 检测自噬相关基因蛋白表达 *p62*、*Beclin1* 和 *LC3-Ⅱ*以及凋亡相关基因的 *BAX*、*Caspase-3*、*Caspase-9*、*Bcl-2* 蛋白表达。

采用 RIPA 法裂解大鼠骨组织碎片,提取总蛋白,BCA 法测各组骨组织总蛋白浓度。上样、电泳后进行转膜,PVDF 膜 5% 脱脂牛奶中封闭 30 min,加入一抗(1∶1000),4 ℃ 孵育过夜,回收一抗,次日加入二抗(1∶10000),室温慢摇孵育 60 min,回收二抗,用 TBST 清洗膜,最后加入 ECL 显影液进行显影。采用 ImageJ 软件对凝胶条带灰度值分析,以 *β*-actin 为内参,计算各目的蛋白的相对表达量。

1.3 数据处理

实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 26.0 处理,符合正态分布的数据进行单因素方差分析,若方差齐,两两比较采用最小显著差法(LSD)-*t* 检验,若方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验行两两比较;如不符合正态分布,则用非参数检验进行统计分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 骨多肽中多肽和游离氨基酸的含量

骨多肽中多肽量(以总氮计)为 11.11 g/100 g,含量为 69.43%,其中分子量小于 10 kDa 的多肽占比 100%;游离氨基酸(以总氮计)为 3.30 g/100 g,含量为 20.63%,精氨酸是最主要的氨基酸,其次是赖氨酸、缬氨酸、组氨酸、丙氨酸、亮氨酸和甘氨酸,共计 17 种游离氨基酸(附表 1,详见本刊官网 http://www.spgykj.com/文章的网络版)。

2.2 骨多肽对骨质疏松大鼠体重的影响

由图 1 可见,各组初始体重无统计学差异($P>0.05$),去卵巢 4 周起,OVX 组大鼠体重增长明显快于假手术组($P<0.01$),与 Yeh 等[26] 报道一致,OVX 大鼠体重异常增加与切除卵巢后雌激素、孕激素合成骤减有关。雌激素参与脂肪代谢的调控,影响基础代谢率;雌激素水平降低可使基础代谢率下降,脂肪沉积而出现肥胖现象[27−28]。与 OVX 组相比,阳性药 DES 组 4 周起体重极显著降低($P<0.01$);GDTL、GDTM、GDTH 均有轻微体重下降趋势,但均无统计学差异($P>0.05$),说明骨多肽对 POMP 大鼠体重增加无明显影响。

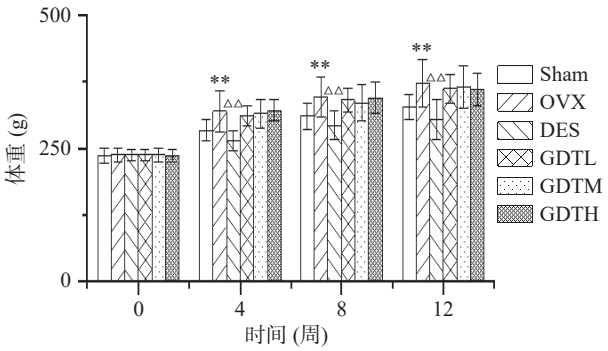


图 1 骨多肽对去卵巢大鼠体重的影响

Fig.1 Effects of bone polypeptides on body weight of ovariectomy rats

注:与 Sham 比较,*表示 $P<0.05$,**$P<0.01$;与 OVX 比较,Δ表示 $P<0.05$,ΔΔ$P<0.01$;图 2、图 4~图 8 同。

2.3 GDT 对骨质疏松大鼠骨密度和骨生物力学指标的影响

骨密度测量是一种具有较高检测准确度和灵敏度,可直接反映骨量和骨结构变化,估计骨质疏松的程度,评价骨质疏松药物疗效的必要手段,是公认的诊断骨质疏松的“金标准”[1,17]。骨生物力学指标反映骨的强度和韧性[29]。由图 2 可见,与 Sham 组相比,OVX 组骨密度及各项骨生物力学指标均极显著下降($P<0.01$),表明 POMP 模型构建成功。与 OVX 组相比,各治疗组大鼠的骨密度及骨生物力学指标均不同程度升高,且骨多肽治疗组上述指标作用随着剂量增加而增强,其 GDTH 和 DES 作用相当,均较 OVX 组显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与韩龙等[25] 报道一致,表明口服骨多肽可以增强 POMP 大鼠骨密度和骨强度。

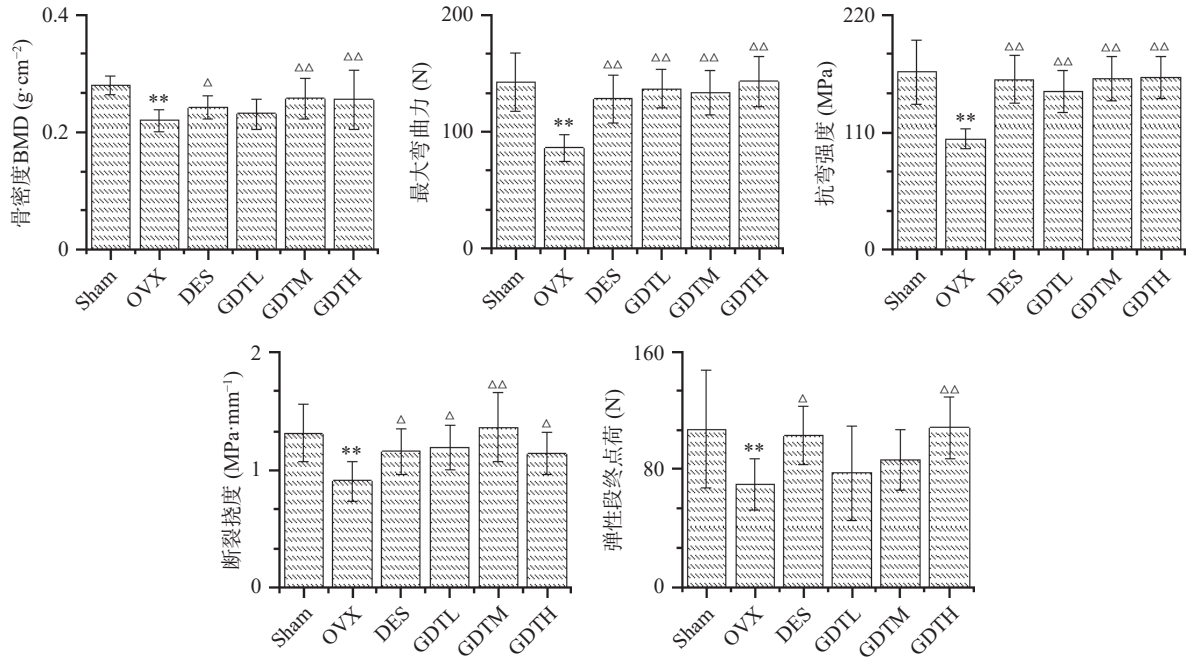


图 2　骨多肽对去卵巢大鼠骨密度和骨生物力学的影响

Fig.2　Effects of bone polypeptides on bmd and bone biomechanics in ovariectomy rats

2.4　GDT 对骨质疏松大鼠骨微结构的影响

图 3 直观反映了胫骨骨组织病理学变化：Sham 组大鼠骨小梁组织分布均匀，排列致密，骨小梁网状结构正常；OVX 组骨小梁组织疏松，排列紊乱，骨小梁数量减少、分离度增加，网状结构破坏。各治疗组较 OVX 组骨小梁数目增多，分离度减小，排列相对有序，其中 DES 对造模造成的骨小梁损伤改善尤为明显。图 4 表征胫骨骨形态计量学变化：与 Sham 组相比，OVX 组 TBV% 降低，TRS%、TFS%、AFS%、MAR、OSW、mAR 极显著增高（$P<0.01$），呈现典型的骨质疏松状态。与 OVX 组相比，骨多肽各剂量组均可不同程度增加骨小梁数目、骨小梁面积、减小骨小梁分离度，修复网状结构，且随剂量增加作用增

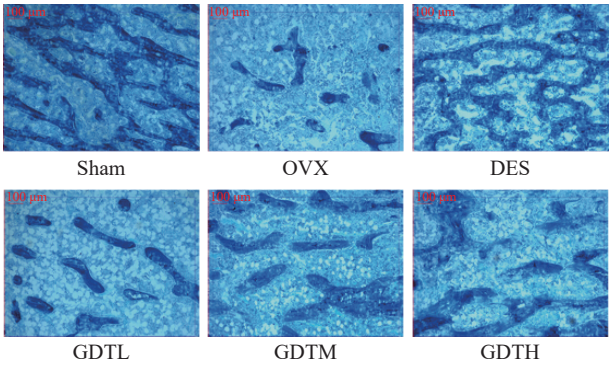


图 3　大鼠胫骨骨小梁数目、形态及分布情况（TB 染色，100 μm）

Fig.3　Number, morphology, and distribution of tibial trabeculae in rats (TB, 100 μm)

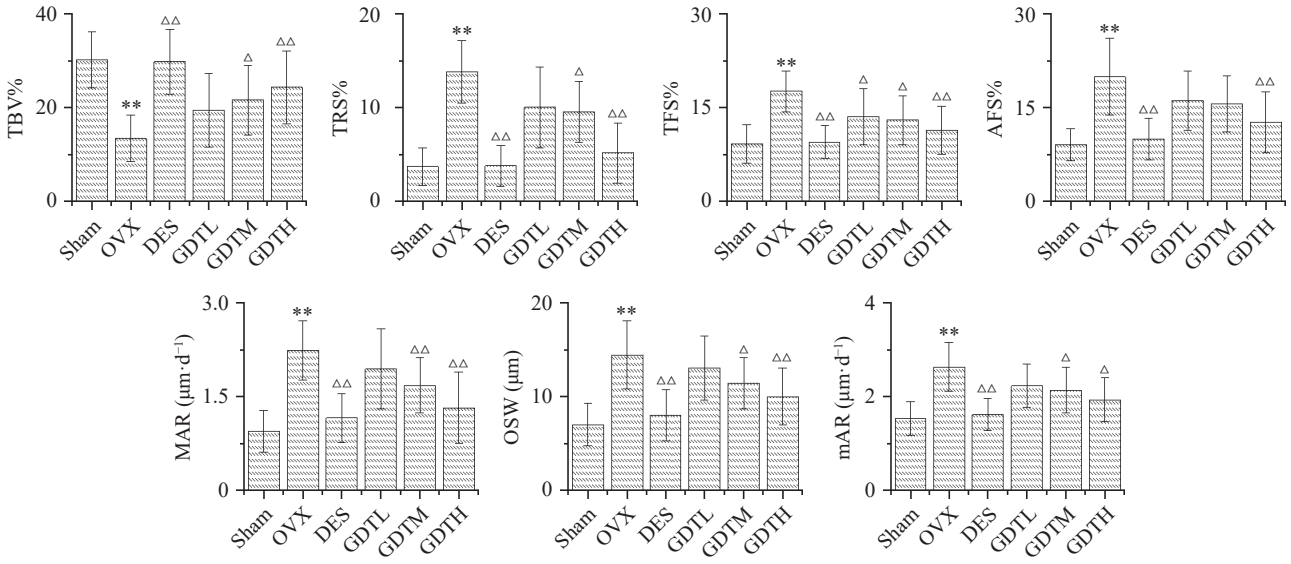


图 4　骨多肽对去卵巢大鼠胫骨骨微结构参数的影响

Fig.4　Effects of bone polypeptides on the microstructure parameters of tibial bone in ovariectomy rats

强，其中 DES 和 GDTH 对 TBV%、TRS%、TFS%、AFS%、MAR、OSW 和 mAR 的作用有显著统计学差异（P<0.05 或 P<0.01），与文献 [25] 报道一致，说明骨多肽对骨质疏松症状具有一定的改善作用。

2.5 GDT 对骨质疏松大鼠骨 Ca、Mg、P、Hyp 含量的影响

血清钙、磷、镁是骨矿化指标，具有促骨基质合成作用，是骨骼强度和硬度基础。羟脯氨酸是构成骨骼和软骨组织的关键物质胶原蛋白的重要组成部分，其含量变化可以反映骨健康状态。由图 5 可见，与 Sham 组相比，OVX 组大鼠骨 Ca、Mg、P、Hyp 极显著下降（P<0.01），提示去卵巢可造成骨有机质与骨无机质同时丢失，呈现明显 POMP 表现。与 OVX 组相比，GDT 各治疗组均可以明显提高骨钙、骨镁、磷、Hyp（P<0.05 或 P<0.01）。表明 GDT 具有促进骨矿物质沉积，同步减少骨无机质和有机质丢失，促进成骨细胞增殖作用，与周广运等[24] 报道一致。

2.6 GDT 对血清骨代谢相关指标的影响

如图 6 所示，与 Sham 组相比，OVX 组血清 E2 显著下降（P<0.05），血清 T（P>0.05，）、血清 BGP 升高（P<0.05），PTH 略有下降（P>0.05）；骨形成和成骨细胞活性标志物 ALP 与骨吸收和破骨细胞活性的标志物 TRAP 均显著增高（P<0.01），符合绝经期高转换型骨质疏松特点[30−31]。与 OVX 组相比，GDT 有明显改变上述变化的趋势，且 GDT 对上述指标的作用随剂量增加而增强，GDTH 组各骨代谢指标较 OVX 组改善具有统计学意义（P<0.05 或 P<0.01），说明 GDT 可以代偿去卵巢导致的雌激素骤减，同步提高血清雄激素水平，改善体内激素紊乱，通过调节 BGP、PTH 和 ALP 促进骨形成，调节 TRAP 抑制骨吸收，多途径改善大鼠 POMP。

2.7 GDT 对骨质疏松大鼠骨组织自噬与凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

自噬和凋亡与骨质疏松的发生发展，特别是在绝经后雌激素水平快速下降和氧化应激增加的情况下的骨质疏松密切相关[32−33]。雌激素具有维持骨细胞活力作用，去卵巢后雌激素缺乏会降低自噬并增加凋亡[34]。图 7 显示，相较于 Sham 组，OVX 组骨组织自噬相关基因 *p62* mRNA 表达升高，*Beclin1*、*LC3-Ⅱ* mRNA 表达降低，凋亡相关基因 *BAX*、*Caspase-3*、*Caspase-9* mRNA 表达显著升高，*Bcl-2* mRNA 表达显著降低，上述指标变化具有显著统计学差异（P<0.01），与文献 [35−36] 报道一致。与 OVX 组相比，DES 组和 GDT 不同剂量组均可不同程度逆转上述指标变化，除 GDTL 组 *Caspase-3*、*p62* 表达外，其余各组对上述指标的作用均具有显著统计学意义（P<0.05 或 P<0.01）。

2.8 GDT 对骨质疏松大鼠骨组织凋亡与自噬相关蛋白表达的影响

如图 8~图 10 所示，在蛋白表达水平，去卵巢后骨组织自噬与凋亡对应相关蛋白表达变化趋势与其各自 mRNA 表达一致：与 Sham 组相比，OVX 组骨组织 p62 表达显著升高（P<0.01），Beclin1、LC3-Ⅱ表达显著降低（P<0.01，P<0.01）；BAX、Caspase-3、Caspase-9 蛋白显著升高（P<0.01、P<0.01、P<0.01），

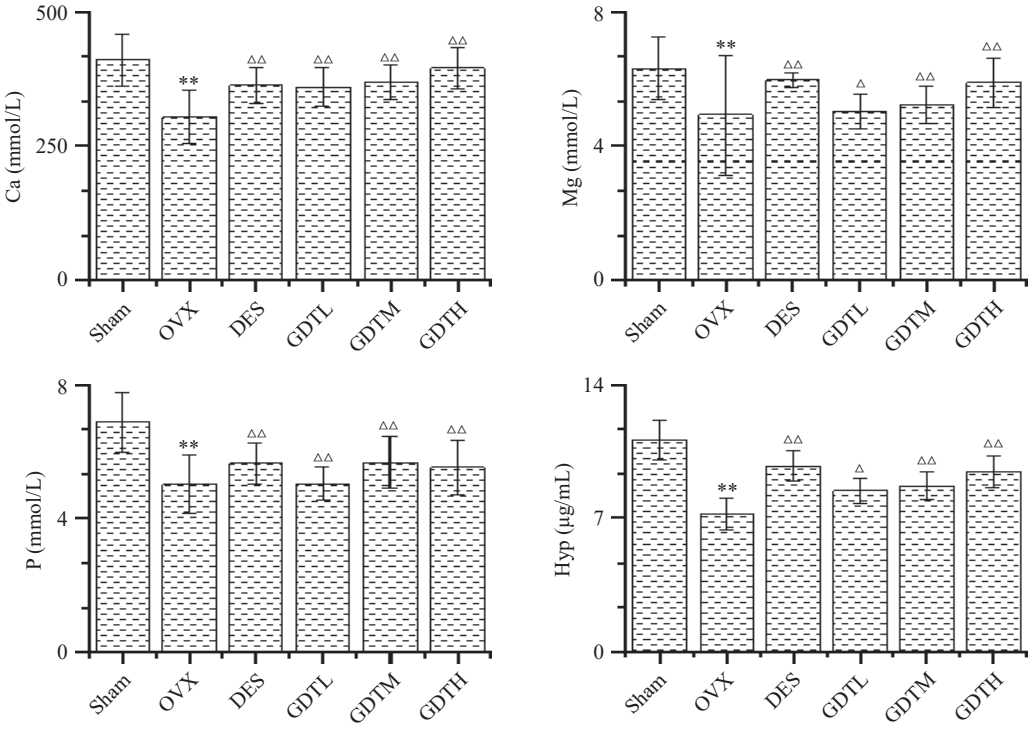


图 5 骨多肽对去卵巢大鼠胫骨 Ca、Mg、P、Hyp 含量的影响

Fig.5 Effects of bone polypeptides on the content of Ca, Mg, P, and Hyp in the tibia of ovariectomy rats

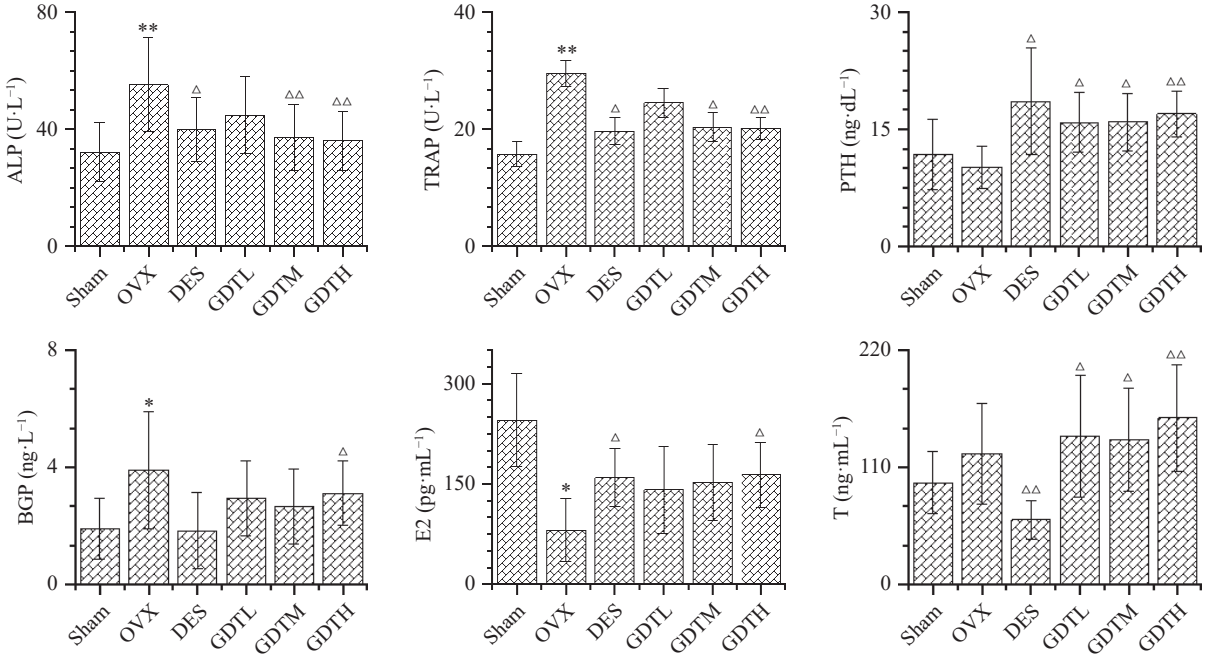


图 6　骨多肽对去卵巢大鼠血清骨代谢相关指标的影响

Fig.6　Effects of bone polypeptides on serum bone metabolism related indicators in ovariectomy rats

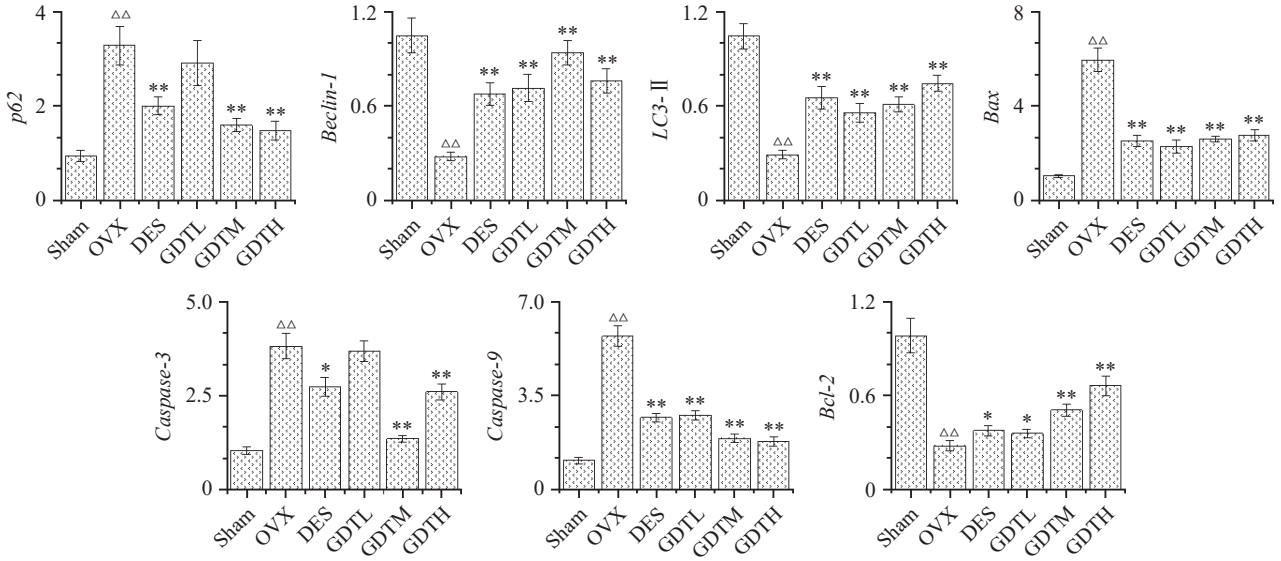
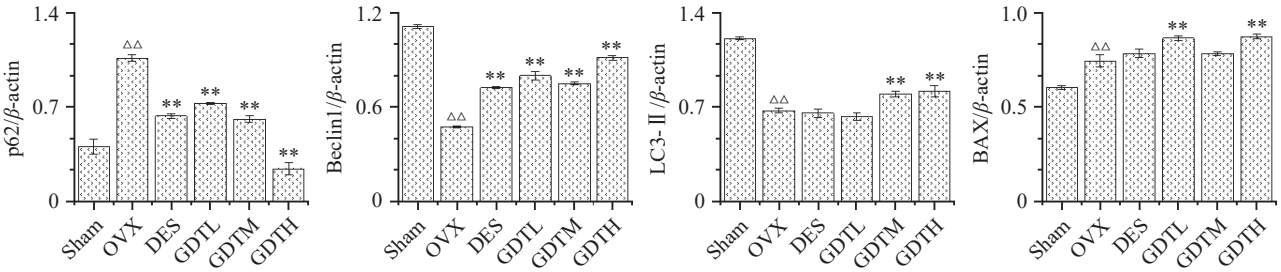


图 7　骨多肽对骨质疏松大鼠 *p62*、*Beclin-1*、*LC3*-Ⅱ、*BAX*、*Caspase-3*、*Caspase-9*、*Bcl-2* mRNA 表达的影响

Fig.7　Effects of GDT on expression of *p62*, *Beclin-1*, *LC3*-Ⅱ, *BAX*, *Caspase-3*, *Caspase-9* and *Bcl-2* mRNA in osteoporosis rats

Bcl2 显著降低（P<0.01）；与 OVX 组相比，各治疗组对造模引起的 p62、Beclin1、Caspase-3、Caspase-9 和 Bcl2 蛋白表达变化有逆转趋势，且均具有显著统计学差异（P<0.01）；另外 GDTM、GDTH 组还可显著升高造模导致的 LC3-Ⅱ蛋白表达减少（P<0.01），但各组对 BAX 蛋白表达变化无逆转趋势，且 GDTL 和 GDTH 组 BAX 蛋白表达较 OVX 组升高有显著统计学意义（P<0.01）。实验数据显示 GDT 可以增强大鼠股骨骨细胞自噬，抑制骨细胞凋亡，而改善去卵巢导致的骨质疏松[34−35]。



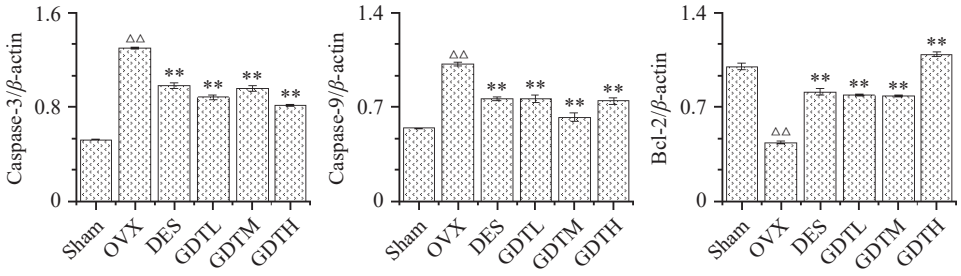


图 8 骨多肽对骨质疏松大鼠 p62、Beclin-1、LC3-Ⅱ、Bax、Caspase-3、Caspase-9、Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig.8 Effects of GDT on p62, Beclin-1, LC3-Ⅱ, Bax, Caspase-3, Caspase-9, Bcl-2 protein expression in osteoporosis rats

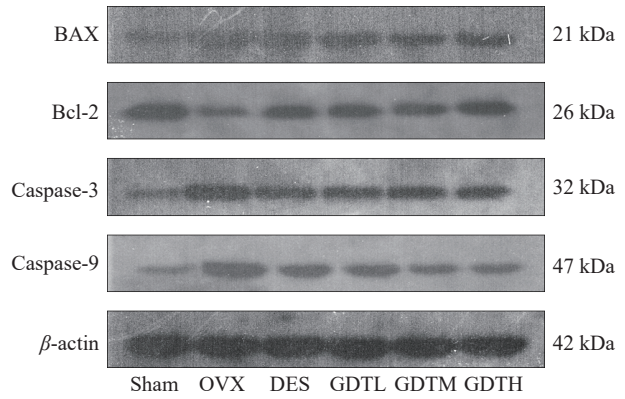


图 9 骨多肽对骨质疏松大鼠凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.9 Effects of GDT on apoptosis-related protein expressions in osteoporosis rats

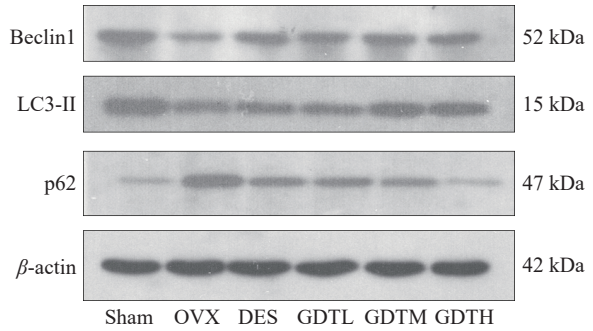


图 10 骨多肽对骨质疏松大鼠自噬相关蛋白表达的影响

Fig.10 Effects of GDT on autophagy-related protein expressions in osteoporosis rats

3 结论

本研究通过建立去卵巢骨质疏松大鼠模型，系统评估了骨多肽对骨代谢的调控作用及其分子机制。结果表明，骨多肽能显著改善骨质疏松大鼠的骨密度、骨生物力学特性及骨微结构，表现为骨小梁数量增加、分离度降低，骨矿物质（钙、镁、磷）及胶原成分（羟脯氨酸）含量回升，血清骨形成标志物（ALP、PGH、E2）水平上调，骨吸收标志物（TRAP、BGP）水平下调。机制研究表明，骨多肽通过上调 *Beclin-1*、*LC3-II* 表达，下调 *p62* 表达激活自噬相关信号通路，增强骨组织自噬活性，同时通过下调 *BAX*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 表达，上调 *Bcl-2* 表达抑制凋亡相关通路，从而减轻骨细胞凋亡，维持骨代谢平衡，提示骨多肽能通过自噬与凋亡途径对骨质疏松大鼠发挥骨保护作用。

本研究充分论证了骨多肽口服治疗骨质疏松的功效性，丰富了骨多肽功效性基础研究数据。本研究所用骨多肽来源于与人类高度同源的猪的四肢骨，具有骨靶向性，是 69.43% 多肽（分子量小于 10 kDa）、17 种游离氨基酸和少量矿物质元素的天然组合物。若用于改善骨质疏松、促进骨折愈合等骨相关疾病预防，与中医的“以形补形、以脏补脏”理论及饮食滋养人体的观念相契合；专利酶解工艺可以保证口服骨多肽的生物利用度和稳定性；猪四肢骨相对廉价易得，经济性高，市场开发前景广阔。本研究也为自噬凋亡途径作为骨质疏松症的治疗新的策略提供了新思路。但不同相对分子量、不同来源、不同给药途径的骨多肽的功效关系还有待验证，其质量控制和功能食品开发等相关法规标准也有待规范健全。骨多肽的产品开发与推广应用还面临一些问题。随着新技术研究手段的不断出现，分离纯化工艺升级精进，相关法规标准的逐步完善，骨多肽的开发将迎来跨越式发展。

本项目组后续将进一步深入探讨骨多肽介导自噬与凋亡途径的具体作用靶点和信号通路，明确主要药效成分或肽段，以期为其产品转化提供更坚实的理论基础和实践案例。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317−318. [Chinese society of osteoporosis and bone mineral medical. Epidemiological survey of osteoporosis in China and release of results of the "Healthy Bones" special action[J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research, 2019, 12(4): 317−318.]

[2] PHUETTHIPHAT O A, RUNGRATTANAWILAI N, SRISAWAT P, et al. Comparative one year mortality rate between treated and untreated for osteoporosis therapy after surgical intervention for hip fracture[J]. Journal of Orthopaedic Clinical Studies and Advanced Research, 2017, 1(1): 1−8.

[3] WHO, IOF, EFFORT, et al. Zasady profilaktyki, rozpoznawania i leczenia osteoporotycznych złamań kości[J]. Ortopedia, Trau-

matologia, Rehabilitacja, 2007, 9(5(6)): 548−554.
[4] CHENG Chuhu, CHEN Liru, CHEN Kuohu. Osteoporosis due to hormone imbalance: An overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1376.
[5] FINK H, MACDONALD R, FORTE M, et al. Long-term drug therapy and drug discontinuations and holidays for osteoporosis fracture prevention[J]. Annals of Internal Medicine, 2019, 171(1): 37−50.
[6] JUNAID F, ENRIQUETA V Y, STEFAN W, et al. Cardiovascular safety profle of romosozumab: a pharmacovigilance analysis of the us food and drug administration adverse event reporting system (FAERS)[J]. Journal of Clinical Medicine 2021, 10(8): 1−14.
[7] WONG S K, CHIN K Y, IMA-NIRWANA S. The effects of tocotrienol on bone peptides in a rat model of osteoporosis induced by metabolic syndrome: The possible communication between bone cells[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(18): 3313.
[8] WANG Liting, CHEN Liru, CHEN Kuohu. Hormone-related and drug-induced osteoporosis: a cellular and molecular overview [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5814.
[9] 迟雪婷, 陈芳园, 皮子凤, 等. 鹿茸多肽对大鼠绝经后骨质疏松的改善作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2024, 50(4): 963−969. [CHI Xueting, CHEN Fangyuan, PI Zifeng, et al. Improvement effect of velvet antler peptides on postmenopausal osteoporosis in rats and its mechanism[J]. Journal of Jilin University (Medical Edition), 2024, 50(4): 963−969.]
[10] 胡冠华. 羊骨肽钙螯合物的制备及其预防骨质疏松的作用机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024. [HU Guanhua. Preparation of sheep bone peptide calcium chelate and its mechanism of actiong in preventing osteoporosis[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.]
[11] 陈晨, 张媛, 吴彦霖, 等. 骨肽原液抗骨质疏松的药效学研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 1012−1018. [CHEN Chen, ZHANG Yuan, WU Yanlin, et al. Pharmacodynamic study of ossotide stock solution against osteoporosis[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2020, 36(7): 1012−1018.]
[12] 安玉章, 蒋电明. 复方骨肽注射液对骨质疏松症伴转子下粉碎性骨折患者内固定手术术后恢复的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(13): 1851−1855. [AN Yuzhang, JIANG Dianming. Clinical trial of compound ossotide injection on the recovery of patients with osteoporosis and subtrochanteric comminuted fracture after internal fixation[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2023, 39(13): 1851−1855.]
[13] WANG J, ZHANG Y, CAO J, et al. The role of autophagy in bone metabolism and cinical significance[J]. Autophagy, 2023, 19(9): 2409−2427.
[14] LI Xu, XU Jiankun, DAI Bingyang, et al. Targeting autophagy in osteoporosis: From pathophysiology to potential therapy [J]. Ageing Research Review, 2020, 9(62): 101098.
[15] 赵奎, 潘润桑, 蓝奉军, 等. 骨关节炎中自噬与凋亡相互作用的分子机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(18): 2912−2917. [ZHAO Kui, PAN Runsang, LAN Fengjun, et al. Molecular mechanisms of the autophagy-apoptosis interactions in osteoarthritis[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2024, 28(18): 2912−2917.]
[16] 赵瑞, 林燕平, 黄佳纯, 等. *Beclin 1* 基因突变对成骨细胞自噬-凋亡表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(6): 790−795,812. [ZHAO Rui, LIN Yanping, HUANG Jiachun, et al. Effect of Beclin1 gene mutation on autophagy and apoptosis expression in osteoblasts[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2024, 30(6): 790−795,812.]
[17] TANG Ning, ZHAO Hong, ZHANG Hengyan, et al. Effect of autophagy gene DRAM on proliferation, cell cycle, apoptosis, and autophagy of osteoblast in osteoporosis rats[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(4): 5023−5032.
[18] SARDAR A, RAI D, TRIPATHI A K, et al. FDA-approved polypeptide pth 1-34 impedes palmitic acid-mediated osteoblasts dysfunction by promoting its differentiation and thereby improving skeletal health[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2025, 597(1): 112445.
[19] 沈赞, 王冠尹, 张镒, 等. 绝经后骨质疏松症鼠模型的研究进展[J]. 中医正骨, 2023, 35(12): 46−49. [SHEN Zan, WANG Guanyin, ZHANG Yi, et al. Research progress on postmenopausal osteoporosis mouse model[J]. The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology, 2023, 35(12): 46−49.]
[20] 李彦冉, 闫盼盼, 苗艳艳, 等. 骨质疏松动物模型构建进展与应用特点分析[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 928−934. [LI Yanran, YAN Panpan, MIAO Yanyan, et al. Eatabishment and application of Osteoporosis animal models[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2023, 31(7): 928−934.]
[21] 河北智同生物制药股份有限公司. 一种用于促进骨生长、维持骨健康的骨多肽组合物和口服液: 中国, 202010661996.6[P]. 2023-09-12. [Hebei Zhitong Biopharmaceutical Co., Ltd. A bone polypeptide composition and oral liquid for promoting bone growth and maintaining bone health: China, 202010661996.6[P]. 2023-09-12.]
[22] XIAO Yingying, WANG Jianan, ZHANG Ying, et al. Hepatic polypeptide nutrient solution improves high-cholesterol diet-induced rats with nonalcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase signaling pathway[J]. Food Science & Nutrition, 2024, 12(5): 3225−3236.
[23] ZHANG C H, JIA W, SHEN Q S, et al. Metabolomics strategy reveals the osteogenic mechanism of Yak (Bos Grunniens) bone collagen peptides on ovariectomy-induced osteoporosis in rats[J]. Food & Function, 2020, 11(2): 1498.
[24] 周广运, 樊雨梅, 刘楚怡, 等. 驴骨胶原蛋白肽对骨质疏松大鼠的改善作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 336−343. [ZHOU Guangyun, FAN Yumei, LIU Chuyi, et al. Effect of donkey bone collagen peptide on improving osteoporosis in rats[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 336−343.]
[25] 韩龙, 吴水培. 注射用骨肽对去卵巢骨质疏松大鼠骨微结构、骨密度和骨生物力学性能的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 79−83. [HAN Long, WU Shuipei. Effects of ossotide injection on bone mineral density (BMD), bone microstructure and biomechanical properties in ovariectomized rats[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2018, 28(6): 79−83.]
[26] YEH Jhihhan, TUNG Yutang, YEH Yusheng, et al. Effects of dietary fatty acid composition on lipid metabolism and body fat accumulation in ovariectomized rats[J]. Nutrients, 2021, 13(6): 2022.
[27] ARISAWA K, KANEKO, MATSUOKA, et al. Piceatannol prevents obesity and fat accumulation caused by estrogen deficiency in female mice by promoting lipolysis[J]. Nutrients, 2023, 15(6): 1374.
[28] SEONG Heeko, JUNG Yunjae. Energy metabolism changes and dysregulated lipid metabolism in postmenopausal women[J]. Nutrients. 2021, 13(12): 4556.

［29］ 罗添润, 孙继超, 王玮, 等. 灵芝孢子粉对去卵巢大鼠骨量、骨生物力学和骨代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(3): 374−378,384. ［LUO Tianrun, SUN Jichao, WANG Wei, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* spores on bone mass, bone biomechanics, and bone metabolism in ovariectomized rats[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2024, 30(3): 374−378,384.］

［30］ 李梅, 夏维波, 章振林. 骨转换生化标志物临床应用指南[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2021, 14(4): 321−336. ［LI Mei, XIA Weibo, ZHANG Zhenlin. Guidelines for clinical application of bone turnover biomarkers[J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Diseases, 2021, 14(4): 321−336.］

［31］ 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会, 章振林. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2022, 15(6): 573−611. ［Chinese society of osteoporosis and bone mineral medical, ZHANG Zhenlin. Guidelines for diagnosis and treatment ofprimary osteoporosis (2022)[J]. Chinese General Practice, 2022, 15(6): 573−611.］

［32］ 崔红旺, 蒋电明. 骨细胞程序性死亡在骨质疏松中作用的研究进展[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2016, 2(3): 181−184. ［CUI Hongwang, JIANG Dianming. Effect of programmed cell death of osteocyte on osteoporosis[J]. Chinese Journal of Geriatric Orthopedics and Rehabilitation, 2016, 2(3): 181−184.］

［33］ WEI Qingquan, LIANG Xiuwei, PENG Ye, et al. 17*β*-Estradiol ameliorates oxidative stress and blue light-emitting diode-induced retinal degeneration by decreasing apoptosis and enhancing autophagy[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2018, 12(9): 2715−2730.

［34］ FLORENCIO-SILVA R, SASSO G R S, SASSO-CERRI E, et al. Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 98(2): 406−415.

［35］ 何丽君, 黄巧文, 马黄璜, 等. 淫羊藿苷通过自噬与凋亡途径保护去卵巢大鼠骨质疏松的机制探究[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(2): 149−155. ［HE Lijun, HUANG Qiaowen, MA Huanghuang, et al. Mechanism of icariin-mediated autophagy and apoptosis pathway on protecting ovariectomized rats against osteoporosis[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2023, 34(2): 149−155.］

［36］ 有曼, 魏立伟, 柴爽, 等. 骨松益骨方调控 Beclin 1/Bcl-2 对去卵巢大鼠骨细胞凋亡和自噬的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(5): 655−661. ［YOU Man, WEI Liwei, CHAI Shuang, et al. The osteoprotective effect of GSYG on apoptosis and autophagy of regulating Beclin 1/Bcl-2 in ovariectomized rats[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2024, 30(5): 655−661.］