doi:10.11659/jjssx.10E025037

·基础研究·

乳酸介导高强度间歇训练骨合成代谢的作用机制

张文华[1],徐智韬[2],管 璇[1],曹韵秋[1] (1.昆山市中西医结合医院康复医学科,江苏 昆山 215332;2.浙江省人民医院康复医学科,浙江 杭州 310015)

[摘 要] **目的** 探究乳酸(Lact)在高强度间歇训练(HIIT)介导的骨合成代谢中的作用及机制。**方法** ①将18只小鼠分为Con组(不进行任何处理)、HT组(仅进行HIIT)、Lact组(仅注射L-乳酸钠),每组6只,然后取血进行Lact检测。②通过卵巢切除术(OVX)建立绝经后骨质疏松小鼠模型,然后分为OVX组(仅建模)、OVX+HIIT组(建模后进行HIIT)、OVX+HIIT+乳酸转运体抑制剂α-氰基-4-羟基肉桂酸(α-CHCA)组(建模后,进行HIIT的同时腹腔注射α-CHCA)及OVX+Lact组(建模后皮下注射L-乳酸钠),每组10只;Sham组小鼠不建模(n=10)。采用Micro-CT扫描分析骨微结构参数,通过HE染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色分别计数成骨细胞数量(N. Ob)和破骨细胞数量(N. Oc/BS);使用Scanco Micro-CT40扫描仪扫描分析以下微结构参数:骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)、皮质骨厚度(Ct. Th)及骨面积分数(BA/TA)。③体外培养小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1,并分为Control组(正常培养)、Lact-C组(给予20 mmol/L的L-乳酸钠)、α-CHCA组(给予0.4 mmol/L α-CHCA)及Lact+α-CHCA组(同时加入20 mmol/L L-乳酸钠和0.4 mmol/L α-CHCA)。碱性磷酸酶(ALP)染色、茜素红染色观察成骨分化和矿化结节;免疫荧光染色检测微管相关蛋白1轻链3(LC3)表达;Western blot检测Runt相关转录因子2(Runx2)、Osterix(Osx)和骨桥蛋白(OPN)、自噬相关蛋白Beclin-1、自噬接头蛋白p62、GATA结合蛋白4(GATA4)、Parkin蛋白表达及LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平。**结果** ①小鼠进行HIIT 30 min后血浆Lact水平达峰值,Lact注射60 min后血浆Lact水平达峰值。②与OVX组相比,OVX+HIIT组和OVX+Lact组骨组织中的BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、BA/TA和N. Ob均增加,Tb. Sp、N. Oc/BS减少,差异均有统计学意义(P<0.05)。③体外实验显示:Lact处理增加成骨细胞矿化和分化活性,显著增强自噬流,表现为LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin-1及成骨分化标志物Runx2、Osx和OPN表达升高,同时p62及GATA4蛋白表达下降,而抑制Lact转运削弱此效应。**结论** 在HIIT介导的骨合成代谢中,Lact通过激活自噬相关蛋白促进GATA4蛋白表达下降,进而驱动成骨细胞分化,缓解骨质疏松。

[关键词]乳酸;高强度间歇训练;骨形成;成骨细胞分化;自噬;GATA结合蛋白4

[中图分类号]R322.8 [文献标志码]A [收稿日期]2025-10-14

Mechanism of lactate in mediating bone anabolism induced by high-intensity interval training

ZHANG Wen-hua[1], XU Zhi-tao[2], GUAN Xuan[1], CAO Yun-qiu[1] (1. Department of Rehabilitation Medicine, Kunshan Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Kunshan Jiangsu 215332, China; 2. Department of Rehabilitation Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou Zhejiang 310015, China)

Abstract: Objective To investigate the role and mechanism of lactate (Lact) in bone anabolism mediated by high-intensity interval training (HIIT). **Methods** ①Eighteen mice were divided into Con group (no treatment), HT group (underwent HIIT only), and Lact group (injected with sodium L-lactate only), with 6 mice in each group. Blood samples were then obtained for Lact detection. ②Postmenopausal osteoporosis mouse model was established by ovariectomy (OVX). The mice were then divided into OVX group (OVX only), OVX+HIIT group (underwent HIIT after modeling), OVX+HIIT+lactate transporter inhibitor α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (α-CHCA) group (underwent HIIT combined with intraperitoneal injection of α-CHCA after modeling), and OVX+Lact group (underwent subcutaneous injection of sodium L-lactate after modeling), with 10 mice in each group. Mice in the Sham group (n=10) did not undergo modeling. Bone microstructural parameters were analyzed using Micro-CT scanning. The number of osteoblasts (N. Ob) and number of osteoclasts (N. Oc/BS) were assessed by HE staining and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, respectively. The following microstructural parameters were measured using a Scanco Micro-CT40 scanner: bone mineral density (BMD), bone volume over total volume (BV/TV), trabecular number (Tb. N), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular separation (Tb. Sp), cortical thickness (Ct. Th), and bone area over total area (BA/TA). ③Mouse preosteoblast MC3T3-E1 cells were cultured in vitro and divided into the Control group (normal culture), Lact-C group (treated with 20 mmol/L sodium L-lactate), α-CHCA group (treated with 0.4 mmol/L α-CHCA), and Lact+α-CHCA group (treated with both 20 mmol/L sodium L-lactate and 0.4 mmol/L α-CHCA). Osteogenic differentiation and mineralized nodule formation were evaluated by alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red S staining. LC3 expression was detected by immunofluorescence staining.

[基金项目]浙江省医药卫生科技计划项目(2025KY642)

[通信作者]曹韵秋,E-mail:15862665927@163.com

Western blot was used to detect the expression of Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix (Osx), osteopontin (OPN), autophagy-related protein Beclin-1, autophagy adaptor protein p62, GATA-binding protein 4 (GATA4), Parkin protein, and the LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio. **Results** ①In mice, plasma Lact levels peaked at 30 minutes after HIIT and at 60 minutes after Lact injection. ②Compared with the OVX group, the OVX+HIIT and OVX+Lact groups exhibited increased BMD, BV/TV, Tb. N, Tb. Th, Ct. Th, BA/TA and N. Ob in bone tissue, as well as decreased Tb. Sp and N. Oc/BS, all with statistically significant differences (P<0.05). ③In vitro experiments showed that Lact treatment enhanced osteoblast mineralization and differentiation activity, significantly promoted autophagic flux, as evidenced by increased LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ratio, Beclin-1 level and osteogenic markers Runx2, Osx, and OPN expression, decreased p62 and GATA4 proteins. These effects were attenuated by inhibiting Lact transport. **Conclusion** In HIIT-mediated bone anabolism, Lact promotes the decrease of GATA4 protein expression by activating autophagy-related proteins, thereby driving osteoblast differentiation and alleviating osteoporosis.

Keywords: lactate; high-intensity interval training; bone formation; osteoblast differentiation; autophagy; GATA-binding protein 4

骨质疏松症是一种以骨量减少和骨微结构退变为特征的全身性骨骼疾病,其发病机制与年龄相关的成骨细胞功能衰退密切相关[1]。高强度间歇训练(high-intensity interval training, HIIT)过程中可产生骨骼肌并释放大量乳酸(lactate,Lact)进入循环系统,其被证实能够有效改善骨代谢并增加骨密度(bone mineral density, BMD)[2],但其发挥骨合成代谢作用的具体分子机制尚不明确。研究发现,外源性Lact注射能够模拟HIIT的促成骨效应,而阻断Lact转运体则消除了运动的骨保护作用[3],提示Lact可能是介导HIIT骨合成代谢的关键信号分子。

自噬作为细胞内重要的降解通路,可通过降解GATA结合蛋白4(GATA-binding protein 4, GATA4)发挥生物学效应[4]。在骨关节炎中,METTL3介导的m6A修饰通过降低自噬相关基因的表达,抑制自噬流,导致GATA4累积,从而诱导关节软骨退化[5]。在椎间盘退变中,自噬受损同样通过GATA4轴加剧髓核细胞的衰老和细胞外基质降解[6-8]。这些研究揭示了“自噬-GATA4”轴在维持骨骼细胞稳态中的核心地位。基于此,本研究提出科学假说:Lact作为HIIT的关键效应分子,通过激活成骨细胞自噬,从而驱动骨形成,并在体内外验证这一机制,为理解运动益骨作用提供新的理论依据,也为开发靶向“Lact-自噬-GATA4”轴的骨质疏松症治疗策略奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物来源及主要试剂

73只2月龄雌性C57BL/6小鼠,体质量(20.2±2.3)g,均购自北京斯贝福生物技术有限公司[使用许可证号:SYXK(京)2020-0047]。动物饲养于SPF级屏障环境内,湿度50%~60%,温度(22±1)℃,12 h/12 h明暗间断照明,自由饮水和摄食。本动物实验符合伦理要求(批准号:20250613)。

乳酸转运体抑制剂氰基-4-羟基肉桂酸(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid,α-CHCA;美国Selleck),苏木精染液、伊红染液(北京索莱宝),Lact、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂盒、茜素红S(美国Sigma-Aldrich),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒(上海碧云天),α-MEM培养基、胎牛血清(美国Gibco),兔抗Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)单克隆抗体、兔抗微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)多克隆抗体、兔抗Beclin-1单克隆抗体、兔抗Parkin单克隆抗体(美国CST),兔抗Osterix(Osx)多克隆抗体、兔抗骨桥蛋白(osteopontin,OPN)多克隆抗体、兔抗GATA4多克隆抗体(英国Abcam),鼠抗p62单克隆抗体(美国Santa Cruz),鼠抗GAPDH单克隆抗体、HRP标记山羊抗兔IgG、HRP标记山羊抗鼠IgG(美国Proteintech),Alexa Fluor 488标记驴抗兔IgG(美国Invitrogen)。

1.2 动物实验

1.2.1 动物模型构建和分组 骨质疏松症模型构建:采用卵巢切除术(ovariectomy, OVX)构建骨质疏松症小鼠模型。55只小鼠术前12 h禁食不禁水,随后通过腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉;消毒背部术区后,于脊柱旁开约1 cm纵向切口,钝性分离肌肉,暴露并结扎切除卵巢(Sham组10只小鼠仅暴露不切除)。依次缝合切口,术后保暖、预防性注射青霉素3 d。术后常规饲养8周。在模型构建终点,通过Micro-CT扫描显示小鼠BMD降低、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)减少,即表明骨质疏松模型构建成功[9]。

共40只小鼠造模成功,将其随机分为OVX组(仅建模)、OVX+HIIT组(建模2个月后进行HIIT 7周)、OVX+HIIT+INH组(建模2个月后,进行7周的HIIT,同时每日腹腔注射α-CHCA 100 mg/kg[3])、OVX+Lact组(建模2个月后,每日皮下注射L-乳酸钠2 g/kg[7]),每组10只。

HIIT方案:坡度为10°,以5 m/min的速度热身

10 min;以25 m/min的速度快跑4 min,然后休息2 min,共10个循环,每周5 d,持续7周[10]。

1.2.2 Micro-CT扫描 取各组小鼠右侧胫骨,使用Scanco Micro-CT40扫描仪进行扫描,并分析以下微结构参数:BMD、骨体积分数(bone volume over total volume, BV/TV)、Tb. N、骨小梁厚度(trabecular thickness,Tb. Th)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp)、皮质骨厚度(cortical thickness, Ct. Th)及骨面积分数(bone area over total area, BA/TA)。

1.2.3 HE染色 取各组小鼠右侧股骨,多聚甲醛溶液固定、10%乙二胺四乙酸脱钙液、梯度乙醇脱水、二甲苯透明,切片后经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,用苏木精染液染色6~8 min,流水冲洗返蓝,再以0.5%伊红染液复染30 s;经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,用中性树胶封片,光学显微镜下观察成骨细胞数量(number of osteoblasts,N. Ob)。

1.2.4 TRAP染色 取各组小鼠右侧股骨切片,经脱蜡水化后,置于37 ℃预温的TRAP染色工作液中避光孵育45~60 min,苏木精复染细胞核30 s,室温晾干,封片剂封片。光学显微镜下观察股骨远端干骺部次级海绵骨区域,特异性识别位于骨小梁表面、胞质呈鲜红色或深红色颗粒状沉积且细胞核≥3个的成熟破骨细胞数量(number of osteoclasts,N. Oc/BS)。

1.2.5 Lact检测 另将18只小鼠分为Con组(不进行任何处理)、HT组(仅进行HIIT)、Lact组(仅注射10 mg/kg L-乳酸钠),每组6只。分组处理后,于小鼠眼眶取血,血清以12 000 r/min的速度离心10 min,按照Lact检测试剂盒说明书进行Lact检测。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞培养及分组 小鼠成骨前体细胞MC3T3-E1购自武汉普诺赛生物技术有限公司。细胞添加至含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗的α-MEM完全培养基中,并在37 ℃、5%CO_2及饱和湿度的细胞培养箱中进行常规培养。为诱导成骨分化,在细胞融合度达70%时更换为成骨诱导培养基(在完全培养基中添加50 μg/mL抗坏血酸和10 mmol/L β-甘油磷酸钠),每2~3 d更换1次诱导培养基以持续促进细胞外基质矿化[3]。

将细胞分为Control组(正常培养,无任何处理)、Lact-C组(给予20 mmol/L的L-乳酸钠)、α-CHCA组(给予0.4 mmol/L α-CHCA)、Lact+α-CHCA组(同时加入20 mmol/L L-乳酸钠和0.4 mmol/L α-CHCA[7])。

1.3.2 茜素红染色 将各组细胞接种至12孔板,在成骨诱导培养基中连续培养14 d,每2 d更换新鲜诱导培养基;诱导结束后弃去培养基,用预冷的PBS轻柔漂洗2次,随后加入4%多聚甲醛溶液室温固定30 min;用去离子水充分清洗3次以去除残留固定剂,每孔加入1 mL 0.5%茜素红S溶液,室温避光孵育30 min;染色结束后用去离子水反复冲洗至冲洗液无色,自然晾干后在体视显微镜下观察见橙红色钙化结节分布于细胞层,采集图像。

1.3.3 ALP染色 将各组细胞接种至12孔板,在成骨诱导培养基中培养7 d后,弃去培养基,用预冷PBS轻柔漂洗2次,加入4%多聚甲醛溶液室温固定15 min;用去离子水清洗3次去除固定剂,每孔加入500 μL现配的BCIP/NBT ALP显色工作液,室温避光孵育30 min,显微镜下观察紫色沉淀形成情况。待阳性对照组出现明显紫色颗粒状沉淀,而阴性对照组无明显着色时,用去离子水终止反应,采集图像。

1.3.4 Western blot 各组细胞经相应处理后收集蛋白,80 V恒压30 min后转为120 V至电泳结束;200 mA恒流将蛋白转移至PVDF膜;将膜于5%脱脂牛奶封闭2 h,随后与Runx2、Osx、OPN、LC3B、Beclin-1、p62、Parkin及GATA4(工作浓度均为1∶1 000)一抗于4 ℃孵育过夜,以GAPDH(1∶5 000)或β-actin(1∶5 000)为内参;次日用TBST清洗后,与相应HRP标记的二抗(1∶5 000)室温孵育2 h,经ECL化学发光试剂显影后,使用Image J软件分析各目标条带与内参的灰度值比值。

1.3.5 免疫荧光染色 将各组细胞以5×10^4个/孔的密度接种于24孔板,按照1.3.1分组进行处理;加入4%多聚甲醛室温固定20 min,用0.1% Triton X-100透化10 min;5% BSA室温封闭1 h,加入LC3B抗体(1∶200)于4 ℃湿盒中孵育过夜;次日PBST清洗3次,每次5 min,随后加入Alexa Fluor 488标记的驴抗兔IgG(1∶500)室温避光孵育2 h;再用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片,于激光扫描共聚焦显微镜下观察。

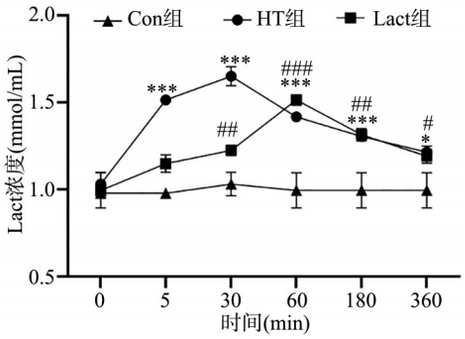
1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据分析,计量数据先行正态性检验和方差齐性检验,若数据符合正态分布且方差齐,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较使用*Tukey*事后检验。以$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Lact处理后小鼠Lact变化

小鼠在HIIT后5 min血浆Lact水平显著升高,在HIIT后30 min达到峰值。与HT组小鼠相比,Lact组小鼠血浆Lact水平增加速度较慢,在注射后60 min达到峰值,证明注射Lact会使小鼠体内Lact增加,见图1。

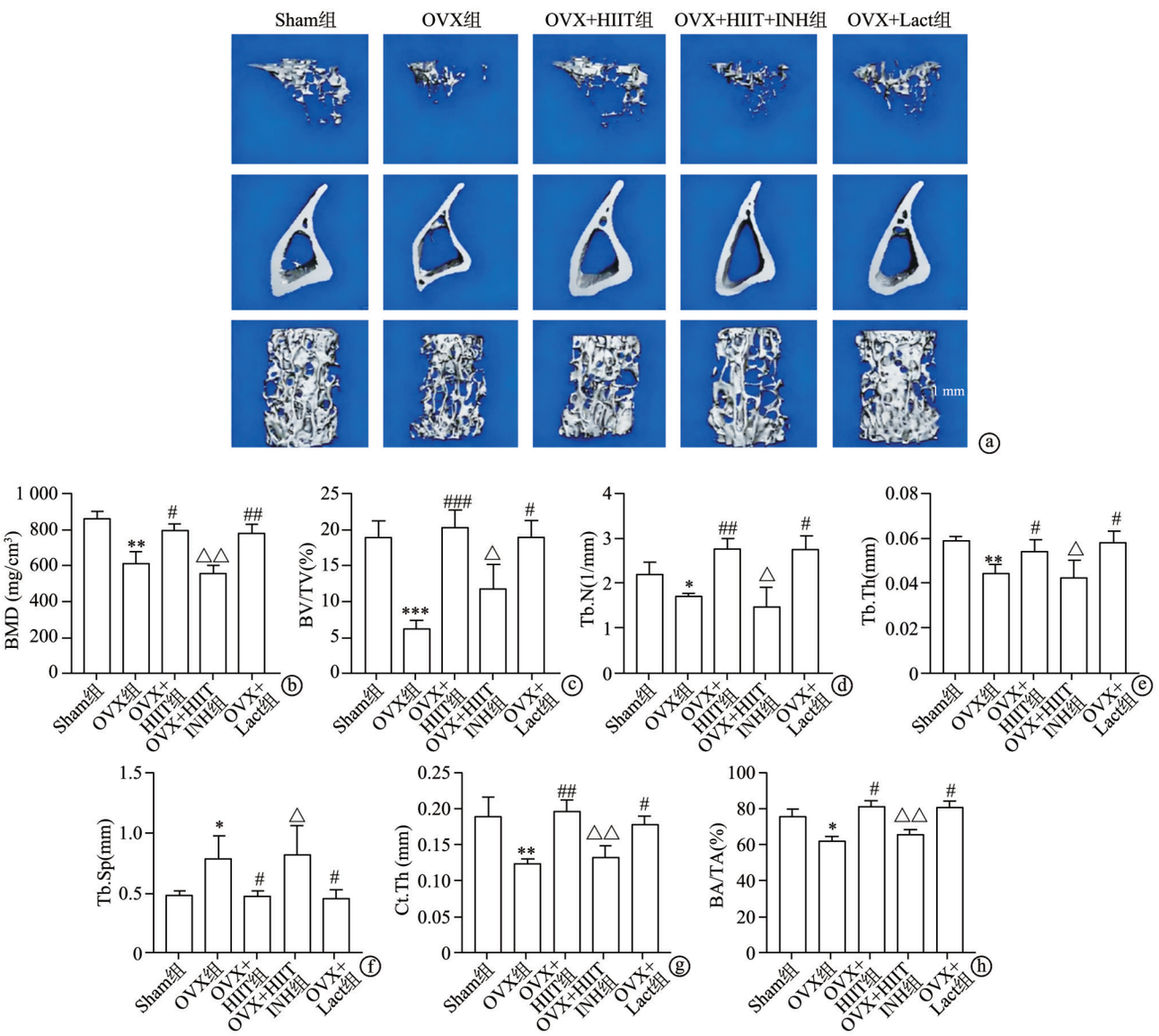


*:与0 min比较,P<0.05;***:与0 min比较,P<0.001;#:与Con组比较,P<0.05;##:与Con组比较,P<0.01;###:与Con组比较,P<0.001

图1 小鼠在不同时间点的血浆Lact水平

2.2 Lact恢复OVX诱导的各项骨参数

OVX组和OVX+HIIT+INH组骨组织中骨量明显少于Sham组、OVX+HIIT组和OVX+Lact组,见图2a。与Sham组相比,OVX组骨组织中BMD、BV/TV、BA/TA、Tb. Th、Ct. Th、Tb. N减少,Tb. Sp上升,差异均有统计学意义(P<0.05),提示骨质疏松模型建立成功。与OVX+HIIT组相比,OVX+HIIT+INH组骨组织中BMD、BV/TV、BA/TA、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th显著减少,Tb. Sp上升,差异均有统计学意义(P<0.05),提示抑制Lact转运可加剧骨质疏松。与OVX组相比,OVX+HIIT组和OVX+Lact组骨组织中BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Ct. Th、BA/TA增加,Tb. Sp降低,差异均有统计学意义(P<0.05),见图2b~h。



a:各组小鼠胫骨、腰椎Micro-CT重建图像;b~h:胫骨Micro-CT分析相关参数变化 *:与Sham组相比,P<0.05;**:与Sham组相比,P<0.01;***:与Sham组相比,P<0.001;#:与OVX组相比,P<0.05;##:与OVX组相比,P<0.01;###:与OVX组相比,P<0.001;△:与OVX+HIIT组相比,P<0.05;△△:与OVX+HIIT组相比,P<0.01

图2 Lact对骨质疏松症小鼠胫骨和腰椎相关参数的影响

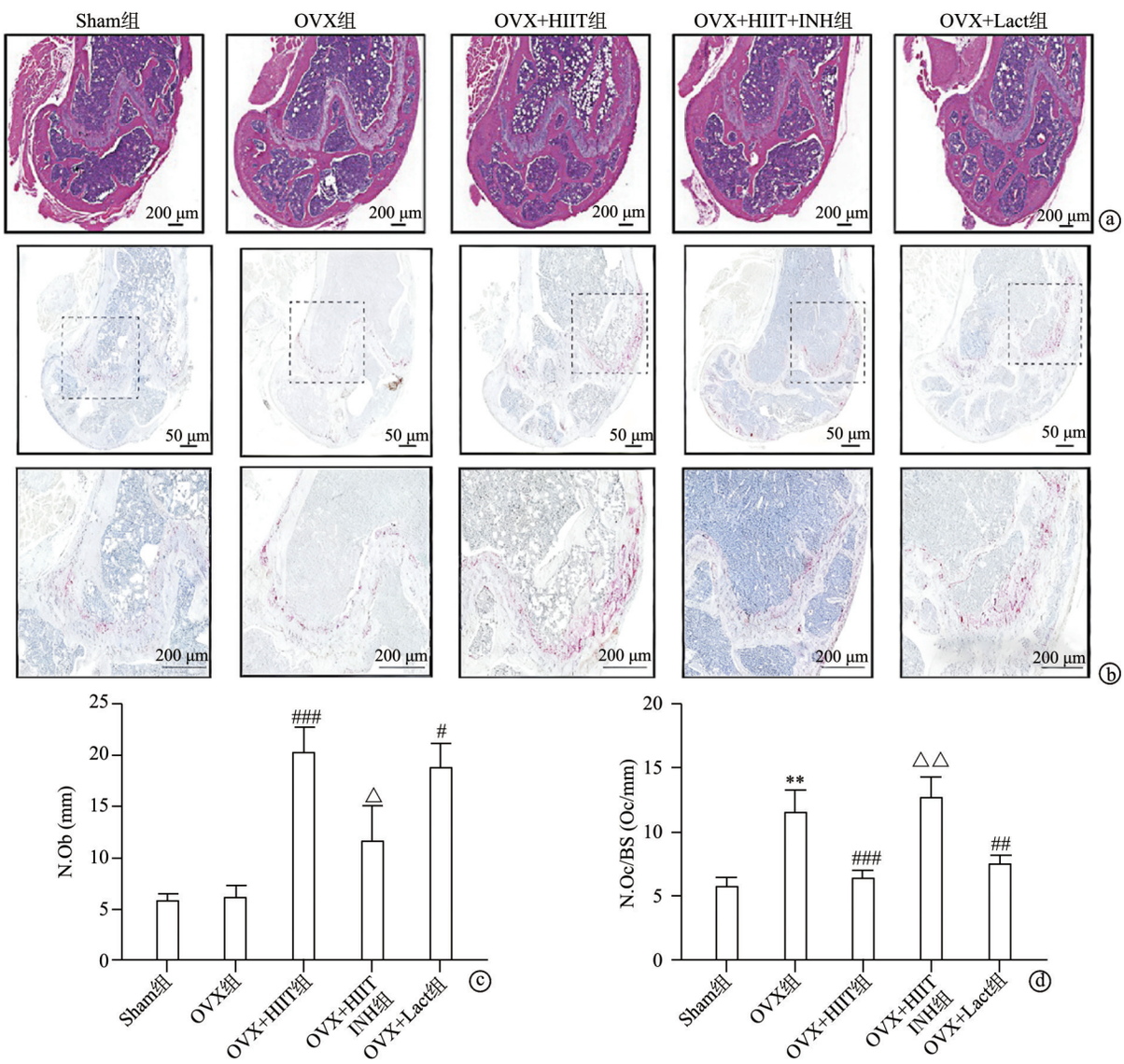
2.3　Lact诱导破骨细胞分化

HE染色显示，与Sham组相比，OVX组骨组织中N. Ob无明显变化（$P>0.05$）；与OVX组相比，OVX+HIIT组和OVX+Lact组骨组织中N. Ob显著增加（$P<0.05$）；与OVX+HIIT组相比，OVX+HIIT+INH组骨组织中N. Ob显著减少（$P<0.05$），见图3a、c。

TRAP染色显示，与Sham组相比，OVX组骨组织中N. Oc/BS显著增加（$P<0.05$）；与OVX组相比，OVX+HIIT组和OVX+Lact组骨组织中N. Oc/BS均显著减少（$P<0.05$）；与OVX+HIIT组相比，OVX+HIIT+INH组骨组织中N. Oc/BS显著增加（$P<0.05$），见图3b、d。

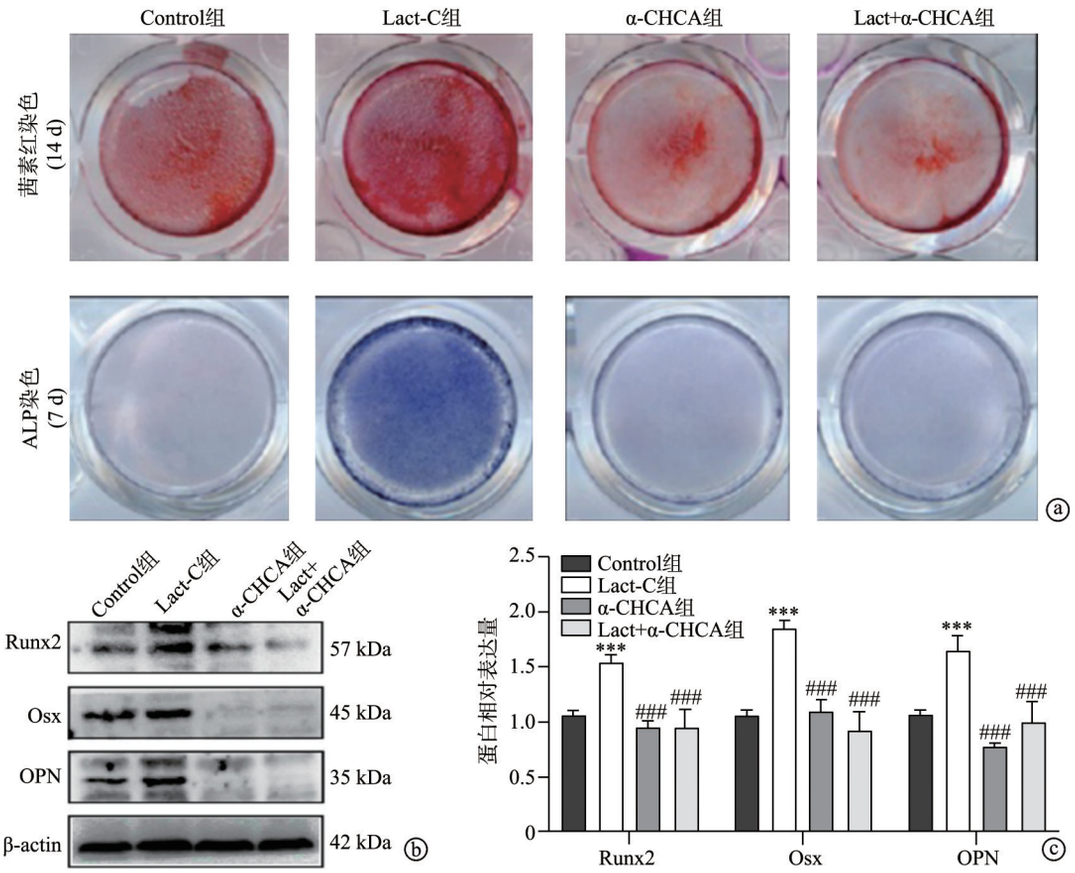
2.4　Lact通过促进成骨细胞标志蛋白表达促进成骨细胞分化

与Control组相比，Lact-C组ALP和茜素红染色颜色加深；与Lact-C组相比，α-CHCA组和Lact+α-CHCA组ALP和茜素红染色颜色变浅（图4a）。Western blot检测显示，与Control组相比，Lact-C组细胞中成骨分化标志物Runx2、Osx、OPN蛋白表达显著增加（$P<0.001$）；与Lact-C组相比，α-CHCA组和Lact+α-CHCA组细胞中成骨分化标志物Runx2、Osx、OPN蛋白表达显著降低（$P<0.001$），见图4b、c。



a：各组小鼠胫骨组织HE染色；b：各组小鼠胫骨组织TRAP染色；c：N.Ob定量分析；d：N.Oc/BS定量分析　**：与Sham组相比，$P<0.01$；#：与OVX组相比，$P<0.05$；##：与OVX组相比，$P<0.01$；###：与OVX组相比，$P<0.001$；△：与OVX+HIIT组相比，$P<0.05$；△△：与OVX+HIIT组相比，$P<0.01$

图3　Lact诱导成骨细胞分化



a:ALP和茜素红染色图;b、c:Western blot检测成骨标志物Runx2、Osx、OPN蛋白表达 ***:与Control组相比,$P<0.001$;###:与Lact-C组相比,$P<0.001$

图4 Lact通过促进成骨细胞标志蛋白表达促进成骨细胞分化

2.5 Lact通过促进自噬诱导成骨细胞分化

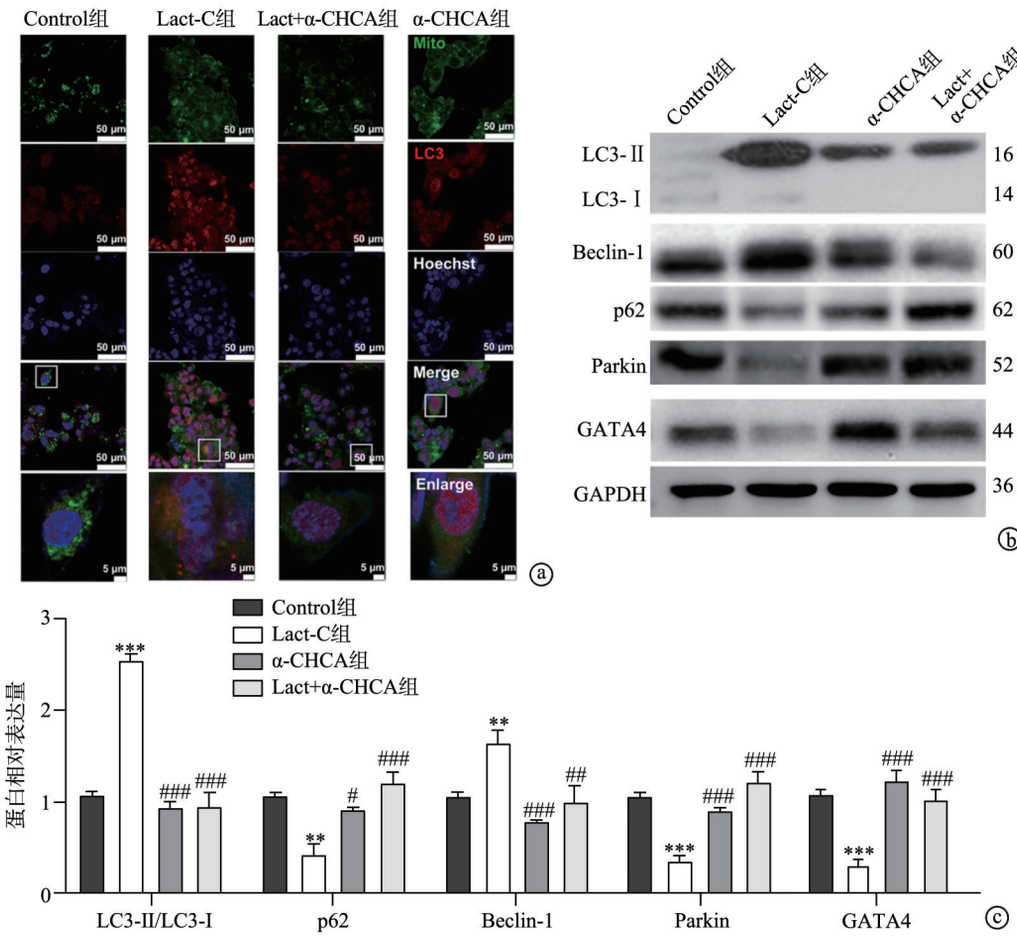
免疫荧光染色显示,经Lact处理后,LC3在细胞内表达增加(图5a)。与Control组相比,Lact-C组细胞中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin-1蛋白表达显著上升,p62、Parkin、GATA4蛋白表达显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);与Lact-C组相比,α-CHCA组和Lact+α-CHCA组细胞中LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin-1蛋白表达显著下降,p62、Parkin、GATA4蛋白表达显著上升,差异均有统计学意义($P<0.05$),见图5b、c。

3 讨论

骨质疏松症是一种以骨量丢失、骨微结构破坏为特征的全身性骨骼疾病,其发生与增龄所致的成骨细胞功能减退密切相关[11]。近年来研究发现,HIIT过程中产生的Lact不仅具有骨保护作用,还能促进骨形成[12]。基于此,本研究拟通过体内外实验,探讨Lact作为HIIT的关键效应分子在骨质疏松症中的作用及其潜在机制,以期为临床治疗提供新的思路与参考。

本研究证实了HIIT过程中产生的Lact与骨形成具有明确的时效与剂量效应关系。小鼠经HIIT后血浆Lact水平迅速升高,30 min达到峰值;而外源性给予Lact小鼠Lact则呈较为平缓的药代动力学特征,与一项关于健康成人高强度锻炼后Lact的变化相似[13]。HIIT运动和外源性注射Lact两种干预方式均可显著改善OVX诱导的骨微结构退化,表现为BMD、BV/TV、Tb.N、Tb.Th显著增加,以及Tb.Sp降低。Guan等[14]的研究发现,血Lact浓度与骨形成标志物表达呈正相关。Wu等[15]的研究也证实,内源性Lact分泌水平增加可以减少骨髓间充质干细胞组蛋白乳酸化,进而改善骨质疏松症。且本研究证明使用乳酸转运体抑制剂α-CHCA阻断Lact摄取后,HIIT的骨保护效应被显著削弱,这验证了Lact的重要作用。

在机制层面,本研究首次揭示了“自噬-GATA4”轴在Lact促成骨作用中的核心地位。体外实验表明,Lact处理显著增强自噬流,表现为LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ水平和Beclin-1表达增加,自噬接头蛋白p62蛋白表达下降,同时伴GATA4蛋白显著降解。Chen等[5]在骨关节炎中证实,METTL3介导的m6A修饰通过降低自噬相



a:LC3免疫荧光染色;b、c:Western blot检测自噬相关蛋白和GATA4蛋白表达　**:与Control组相比,$P<0.01$;***:与Control组相比,$P<0.001$;#:与Lact-C组相比,$P<0.05$;##:与Lact-C组相比,$P<0.01$;###:与Lact-C组相比,$P<0.001$

图5　Lact通过促进自噬促进成骨细胞分化

关基因的表达,抑制自噬流,导致GATA4累积,从而促进关节软骨退化。在椎间盘退变中,自噬受损同样通过GATA4-SASP轴加剧髓核细胞的衰老和细胞外基质降解[6]。在鼻咽癌衰老模型中,GATA4的降解可激活自噬[16]。其在乳腺癌[17]、皮肤老化等中的作用均有类似研究[18-19]。而本研究体内实验证实了自噬在骨质疏松症中的作用,并分析了骨质疏松症与Lact、HIIT、自噬的联系;此外,本研究将GATA4与自噬进行连接,并在骨代谢中进行验证,这是本研究的新颖之处。在疾病状态下,自噬受损导致GATA4积累,进而促进细胞衰老和组织破坏;而本研究则在生理性骨形成过程中,揭示了Lact通过激活自噬促进GATA4降解,从而推动成骨分化,这凸显了细胞特异性背景在信号调控中的重要性。此外,本研究发现,Lact不仅可激活自噬,同时还上调了线粒体自噬关键蛋白Parkin的表达。这与Jang等[20]在Parkin介导自噬的结果相呼应,该研究证实了预防破骨细胞线粒体自噬损伤可抑制牙周炎引起的骨质流失。

本研究的局限性:①仅基于自噬相关蛋白表达上调的相关性证据,未使用自噬特异性激动剂或抑制剂进行功能性增益与丧失实验,从而在功能层面直接证实自噬激活是Lact发挥作用的必要和充分条件;②本研究虽提出GATA4蛋白降解是促进成骨分化的关键节点,但未能明确GATA4是否作为转录因子直接抑制Runx2、Osx等核心成骨基因的转录活性;③Lact在体内的来源除骨骼肌外是否包含其他组织及Lact调控自噬的上游信号通路尚未完全阐明,且缺乏对自噬通路的功能性验证。这些将是未来研究的重要方向。

综上所述,本研究发现,Lact通过激活自噬促进GATA4蛋白表达下降,从而驱动成骨细胞分化,缓解骨质疏松症。

[参考文献]

[1] Walker MD, Shane E. Postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2023, 389(21): 1979-1991. doi: 10.1056/NEJMcp2307353.

[2] Wang X, Kang Y, Yao J, et al. Effects of exercises of different intensities

on bone microstructure and cardiovascular risk factors in ovariectomized mice[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(3): 1005. doi: 10.3390/ijms26031005.

[3] Zhu Z, Chen Y, Zou J, et al. Lactate mediates the bone anabolic effect of high-intensity interval training by inducing osteoblast differentiation [J]. J Bone Joint Surg Am, 2023, 105(5): 369-379. doi: 10.2106/JBJS.22.01028.

[4] Kang D, Lee J, Yook G, et al. Regulation of senescence-associated secretory phenotypes in osteoarthritis by cytosolic UDP-GlcNAc retention and O-GlcNAcylation[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 1094. doi: 10.1038/s41467-024-55085-1.

[5] Chen X, Gong W, Shao X, et al. METTL3-mediated m(6)A modification of ATG7 regulates autophagy-GATA4 axis to promote cellular senescence and osteoarthritis progression[J]. Ann Rheum Dis, 2022, 81(1): 87-99. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221091.

[6] 杨超富,谭国庆,徐展望. 骨质疏松中衰老相关分泌表型调控机制的研究进展[J]. 中国全科医学, 2024, 27(29): 3685-3695. doi: 10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0721.

[7] 蒋中业,曹国欢,张一民,等. 16周HIIT干预对增龄大鼠骨骼肌线粒体自噬、ATP浓度及有氧运动能力的影响[J]. 中国体育科技, 2022, 58(10): 90-96. doi: 10.16470/j.csst.2021068.

[8] 崔新雯. 连续高强度间歇训练对大鼠骨骼肌蛋白质代谢影响的研究[D]. 北京:北京体育大学, 2018.

[9] Chai S, Yang Y, Wei L, et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling [J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155516. doi: 10.1016/j.phymed.2024.155516.

[10] Dun Y, Zhang W, Du Y, et al. High-intensity interval training mitigates sarcopenia and suppresses the myoblast senescence regulator EEF1E1 [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2024, 15(6): 2574-2585. doi: 10.1002/jcsm.13600.

[11] Brown JP. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis[J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2021, 36(3): 544-552. doi: 10.3803/EnM.2021.301.

[12] Kitagawa T, Hiraya K, Denda T, et al. A comparison of different exercise intensities for improving bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Bone Rep, 2022, 17: 101631. doi: 10.1016/j.bonr.2022.101631.

[13] Jacob N, So I, Sharma B, et al. Effects of high-intensity interval training protocols on blood lactate levels and cognition in healthy adults: systematic review and meta-regression[J]. Sports Med, 2023, 53(5): 977-991. doi: 10.1007/s40279-023-01815-2.

[14] Guan H, Wang W, Jiang Z, et al. Magnetic aggregation-induced bone-targeting nanocarrier with effects of piezo1 activation and osteogenic-angiogenic coupling for osteoporotic bone repair [J]. Adv Mater, 2024, 36(13): e2312081. doi: 10.1002/adma.202312081.

[15] Wu J, Hu M, Jiang H, et al. Endothelial cell-derived lactate triggers bone mesenchymal stem cell histone lactylation to attenuate osteoporosis [J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(31): e2301300. doi: 10.1002/advs.202301300.

[16] Wu O, Jin Y, Zhang Z, et al. KMT2A regulates the autophagy-GATA4 axis through METTL3-mediated m(6)A modification of ATG4a to promote NPCs senescence and IVDD progression [J]. Bone Res, 2024, 12(1): 67. doi: 10.1038/s41413-024-00373-1.

[17] Qu H, Jin Q, Zhang M, et al. CLDN6 induces chemoresistance through protective autophagy in breast cancer[J]. Int J Biol Sci, 2025, 21(12): 5444-5459. doi: 10.7150/ijbs.116340.

[18] Hao R, Li M, Li F, et al. Protective effects of the phenolic compounds from mung bean hull against H_2O_2-induced skin aging through alleviating oxidative injury and autophagy in HaCaT cells and HSF cells [J]. Sci Total Environ, 2022, 841: 156669. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156669.

[19] Ma Y, Li S, Ye S, et al. Hexavalent chromium triggers hepatocytes premature senescence via the GATA4/NF-κB signaling pathway mediated by the DNA damage response[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 239: 113645. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113645.

[20] Jang JS, Hong SJ, Mo S, et al. PINK1 restrains periodontitis-induced bone loss by preventing osteoclast mitophagy impairment[J]. Redox Biol, 2024, 69: 103023. doi: 10.1016/j.redox.2023.103023.

(编辑:龙小芬)