

格列美脲对高脂饮食 ApoE^{-/-} 小鼠骨微结构的影响柳辰玥¹ 赵保胜² 刘海霞³ 朱如愿³ 王丽丽³ 马如凤³ 李琳³ 陈贝贝³ 顾小盼¹ 潘勃¹ 吴臻¹
张东伟^{4*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102
2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029
3. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029
4. 北京中医药大学糖尿病研究中心, 北京 100029

中图分类号: R956 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2017) 08-0986-05

摘要: 目的 观察格列美脲对高脂饮食喂养的 ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠骨微结构的影响。方法 以 8 只野生型 C57BL/6 小鼠为野生正常组, 24 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为 3 组, 分别为 ApoE^{-/-} 正常组、ApoE^{-/-} 高脂组、格列美脲组。野生正常组和 ApoE^{-/-} 正常组给予普通饲料饲养, ApoE^{-/-} 高脂饮食组和格列美脲组给予高脂饲料, 其中格列美脲组小鼠灌服 25 mg/kg 格列美脲, 其他各组小鼠均灌服等量去离子水。6w 后, 处死小鼠, 取双侧股骨, 分别进行 H&E 染色和 Safranin O/Fast Green 染色评价骨微结构, 利用骨生物力学评价骨强度, 利用 Cathepsin K 表达评价骨吸收程度。结果 格列美脲可明显改善高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠骨微结构, 提升股骨糖胺聚糖含量, 提高股骨第一循环硬度、峰值压力和硬度形变量, 降低 Cathepsin K 表达。结论 格列美脲可改善高脂饮食饲养的 ApoE^{-/-} 小鼠的骨微结构, 其作用机理可能与抑制 Cathepsin K 的表达相关。

关键词: 格列美脲; 高脂饮食; ApoE 基因敲除; 骨微结构; Cathepsin K

The effect of Glimepiride on bone microarchitecture in ApoE^{-/-} mice on high fat dietLIU Chenyue¹, ZHAO Baosheng², LIU Haixia³, ZHU Ruyuan³, WANG Lili³, MA Rufeng³, LI Lin³, CHEN Beibei³,
GU Xiaopan¹, PAN Bo¹, WU Zhen¹, ZHANG Dongwei^{4*}

1. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102
2. Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029
3. Preclinical Medicine School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029
4. Diabetes Research Center, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: ZHANG Dongwei, zhdw1006@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of glimepiride on bone microarchitecture in ApoE knocked out (ApoE^{-/-}) mice on high fat diet. **Methods** 8 wild type C57BL/6 mice were recruited as the wild type normal group (WTN), 24 ApoE^{-/-} mice were randomly divided into three groups: Normal control group (NC), High fat diet group (HFD), and Glimepiride group (GP). The mice in WTN and NC were given normal feed, and the mice in HFD and GP were fed with high fat diet. The mice in GP were given glimepiride (25 mg/kg, i. g.), other mice received the same volume of deionized water. After 6 weeks of administration, all mice were anesthetized and killed. Then the bilateral femurs were harvested. Bone strength of the femurs and microarchitecture were evaluated by bone biomechanics examination, and the staining of H&E and safranin O/fast green. Immunohistochemistry staining was used to analyze the expression of Cathepsin K in mice femurs by immunohistochemistry staining. **Results** Glimepiride treatment significantly improved bone microarchitecture, increased femoral glycosaminoglycan content, and improved the hardness of the first cycle, peak pressure and hardness deformation of mice femurs, as well as decreased the expression of Cathepsin K in ApoE^{-/-} mice on HFD. **Conclusion** Changes of bone microarchitecture in ApoE^{-/-} mice induced by high fat diet were improved by glimepiride. The mechanism may be related to the inhibition of Cathepsin K expression.

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(7172126); 国家自然科学基金面上项目(81273995, 81274041)

* 通讯作者: 张东伟, Email: zhdw1006@163.com

Key words: Glimepiride; High fat diet; ApoE gene knockout mice; Bone microarchitecture; Cathepsin K

骨质疏松是一种以骨量降低、骨微结构破坏为特征,并致骨脆性增加,易于发生骨折的慢性代谢性骨骼疾病^[1],受遗传和环境因素共同影响^[2]。研究发现,ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饲料饲养一段时间后,骨形成减少和骨吸收增加,骨吸收和骨形成动态平衡被打破^[3],骨量明显减少^[4-7],造成骨质疏松。

临床研究也发现,服用磺脲类降糖药的患者骨折发生率降低^[8],但关于磺脲类降糖药对高脂饮食患者骨重建的影响及其作用机理,目前尚无详细报道。因此,本实验以高脂饮食造成 ApoE^{-/-}小鼠骨质疏松为对象,探索格列美脲对其骨微结构和骨生物力学的影响及可能的作用机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器:Olympus BX53 倒置荧光显微镜,日本 Olympus 公司。RM2255 Leica 轮转式切片机,德国 Leica 公司。博勒飞质构仪 CT3,美国 Brookfield 公司。

1.1.2 药品与试剂:格列美脲片,赛诺菲(北京)制药有限公司,批号:4JB061。乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na),北京市化学试剂公司。Fast Green,美国 Sigma 公司。Safrain O,美国 Sigma 公司。骨组织抗原修复液,上海舜百生物科技有限公司。免疫组化试剂盒,北京中杉金桥生物公司,批号:K152411A。DAB 显色试剂盒,北京中杉金桥生物公司,批号:K166913B。Cathepsin K(ab19027),Abcam 公司。

1.1.3 实验动物:SPF 级 C57BL/6 和 ApoE^{-/-}小鼠,体重 18~20 g,购自于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001,并饲养于北京中医药大学科研实验中心清洁级动物实验室,合格证号:SCXK(京)2011-0024,室温 22℃,相对湿度 55%,光暗周期 12 h/12 h,自由饮水、饮食,适应性饲养 7 d 后开始实验。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药:实验时分别采用 C57BL/6 和 ApoE^{-/-}小鼠。其中,8 只野生型 C57BL/6 小鼠为野生正常组,ApoE^{-/-}小鼠 24 只,按体质量随机分为 ApoE^{-/-}正常组、ApoE^{-/-}高脂组和格列美脲组,每组 8 只。ApoE^{-/-}高脂组和格列美脲组小鼠给予高脂饮食(含 75% 基础饲料,2% 胆固醇,23% 猪

油),野生正常组和 ApoE^{-/-}正常组给予普通饲料。格列美脲组灌服格列美脲(25 mg/kg)水溶液,其余各组分别给予等量去离子水。

1.2.2 取材及样品制备:给药 6 周后,用 1% 戊巴比妥钠(4 mL/kg)腹腔麻醉处死小鼠,分离两侧股骨,剔除肌肉组织,其中一侧股骨用蘸生理盐水的纱布包裹,放于 -80℃ 备用。将另一侧的股骨置于 10% 中性福尔马林,固定 72 h 后,15% EDTA(pH 7.4)脱钙,脱钙液每 2 周换 1 次,连续脱钙 3 个月。股骨组织脱钙后,自来水冲水过夜,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,采用 Leica 切片机进行组织切片,厚度为 5 μm,40℃ 温水展片,60℃ 烘干,4℃ 保存待用。

1.2.3 指标检测

(1) H&E 染色:按照郭鱼波等^[1]的染色方法:将股骨切片常规脱蜡至水,苏木素染色 7 min,自来水冲洗,分色液分色 1 min,去离子水浸洗,伊红染色 3 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片后置于 Olympus BX53 倒置显微镜下观察病理形态并拍照。

(2) Safrain O/Fast Green 染色:参考马如凤等^[9]的方法,简述如下:将股骨石蜡切片 60℃ 烤片 2 h,常规脱蜡至水,苏木素染色 5 min,自来水冲洗 3 min,1% HCl-Alc 分化 2 s,去离子水洗 3 次,0.05% Fast Green 染 5 min 后用 1% 醋酸洗 30 s,0.1% Safrain O 染 5 min 后用 95% 乙醇洗 3 次,100% 乙醇洗 2 次,二甲苯 I、II 透明各 30 min,中性树胶封片后拍照并用 Image pro plus 6.0 分析,计算灰度值(OD)。

(3) 骨生物力学的测定:采用博勒飞质构仪 CT3 测定骨生物力学。实验时使股骨生理弯曲向上放置于跨距为 7 mm 的两个支撑点上,进行 3 点弯曲测试,探头下降速度为 10 mm/min,至股骨断裂后继续运行 2 mm 停止,根据探头下降的距离、载荷以及骨断端直径,计算股骨的第一循环硬度、峰值压力和硬度形变量。

(4) 免疫组化测股骨 Cathepsin K 表达量:参考王丽丽等^[10]的方法,简述如下:将股骨石蜡切片 60℃ 烤片 2 h 后常规脱蜡至水,然后滴加骨组织抗原修复液,37℃ 孵育 30 min 后,依次滴加 3% H₂O₂,0.04% Triton × 100,10% 山羊血清封闭后,加一抗 Cathepsin K(比例 1:50),4℃ 孵育过夜。加免疫组

化二抗 37 ℃ 孵育 30 min 后, PBS 洗 3 次, DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木素复染后自来水冲洗, 脱水、透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察拍照并用 Image pro plus 6.0 分析, 计算 IOD 值。

1.3 统计学处理

用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 数据满足正态分布时, 当方差齐时, 采用单因素方差 (ANNOVA) 分析; 当方差不齐时, 使用 Dunnett's T3 检验。数据不满足正态分布时, 采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 格列美脲对高脂饮食小鼠骨微结构的影响

由图 1 可知, H&E 染色镜下观察, 野生正常组小鼠骨骺端骨小梁排列整齐。与 ApoE^{-/-} 正常组相比, ApoE^{-/-} 高脂组小鼠骨骺端稀疏, 骨小梁排列紊乱、变细、断裂。与 ApoE^{-/-} 高脂组小鼠相比, 格列美脲组小鼠骨微结构得到改善, 骨小梁排列整齐、增粗, 但仍然未恢复到正常状态。

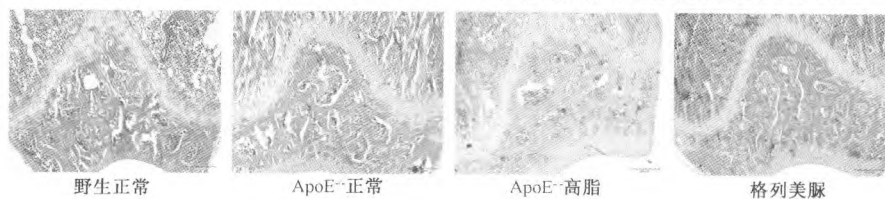


图 1 小鼠股骨 H&E 染色 ($\times 100$)

Fig. 1 H&E staining of femurs in mice ($\times 100$)

如图 2 所示, 在 Fast Green 染的绿色背景上, Safran O 把糖胺聚糖染成红色。野生正常组小鼠骨骺端糖胺聚糖含量多且分布均匀。与野生正常组小鼠相比, ApoE^{-/-} 正常组小鼠股骨糖胺聚糖含量无

明显差异, ApoE^{-/-} 高脂组小鼠股骨糖胺聚糖含量显著减少 ($P < 0.01$)。与 ApoE^{-/-} 高脂组相比, 格列美脲连续治疗 6 周后, 股骨糖胺聚糖含量明显增加 ($P < 0.01$)。

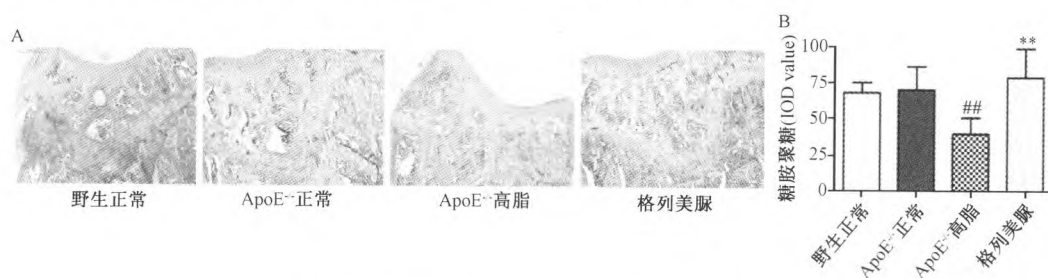


图 2 Safran O/Fast Green 染色 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

与野生正常组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 ApoE^{-/-} 高脂组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 2 Safran O/Fast Green Staining ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$),

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WTN; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ApoE^{-/-} HFD

2.2 格列美脲对高脂饮食小鼠骨生物力学影响

如图 3 所示, 与野生正常组小鼠相比, ApoE^{-/-} 正常组小鼠股骨第一循环硬度、峰值压力和硬度形变量均无明显改变, ApoE^{-/-} 高脂组小鼠股骨第一循环硬度、峰值压力和硬度形变量均显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01); 与 ApoE^{-/-} 高脂组相比, 经格列美脲连续治疗 6 周后, 第一循环硬度、峰值压力和硬度形变量均明显升高 ($P < 0.05$ 或 0.01)。

2.3 格列美脲对高脂饮食小鼠的股骨 Cathepsin K 表达量的影响

研究证明, Cathepsin K 与破骨细胞活性密切相关, 且多在破骨细胞中表达^[11]。本实验结果如图 4 所示, 与野生正常组小鼠相比, ApoE^{-/-} 正常组和 ApoE^{-/-} 高脂组小鼠骨骺端 Cathepsin K 表达量均升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与 ApoE^{-/-} 高脂组相比, 格列美脲组小鼠骨骺端 Cathepsin K 的表达量降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

遗传因素是骨质疏松发生的重要因素, 多项遗

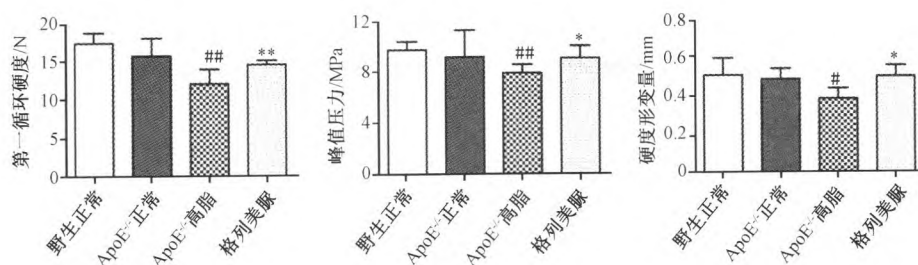


图3 格列美脲对骨生物力学影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

与野生正常组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 ApoE^{-/-} 高脂组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 3 Effect of Glimepiride on bone microarchitecture ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WTN; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ApoE^{-/-} HFD

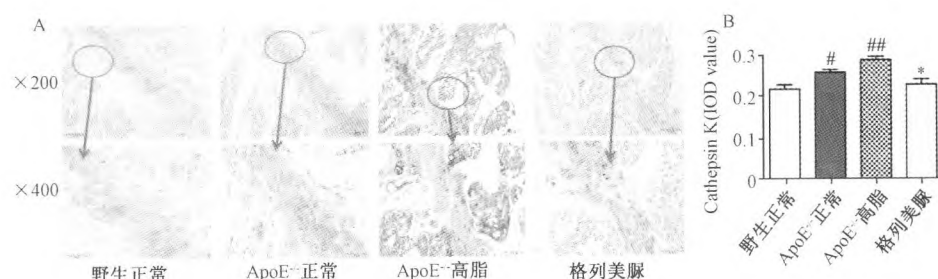


图4 免疫组化染色测定小鼠股骨 Cathepsin K 的表达

蓝色圈出部分为阳性表达,箭头所指部分为400倍放大的对应位置

与野生正常组比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 ApoE^{-/-} 高脂组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 4 Immunohistochemical staining showed Cathepsin K expression in mice femurs, the part of blue circle was positive expression, the arrow pointing part is the corresponding position of x400 magnified

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WTN; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs ApoE^{-/-} HFD

传基因被视为骨质疏松的候选基因,载脂蛋白 E (ApoE) 基因是其中之一^[2]。本实验中发现,高脂饮食诱发 ApoE^{-/-} 小鼠骨量减少,说明高脂可诱导 ApoE^{-/-} 小鼠骨质疏松。本实验结果显示高脂饮食导致 ApoE^{-/-} 小鼠的骨微结构破坏,骨生物力学性能下降,骨强度下降,骨吸收增强。

格列美脲是第三代磺酰脲类降糖药,有研究表明,格列美脲可以促进成骨细胞分化^[12]。本实验研究表明,格列美脲连续治疗6周,可以促进高脂喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠骨量增加,骨微结构改善,宏观上表现为骨第一循环硬度、峰值压力、硬度形变量,改善骨生物力学性能。Safranin O/Fast Green 染色可以看出:高脂组小鼠骨组织中,糖胺聚糖含量减少,而格列美脲逆转了这种改变,促进了糖胺聚糖生成,从而促进骨形成。

Cathepsin K 是一种溶酶体半胱氨酸蛋白酶,可以降解骨基质蛋白,其主要在破骨细胞中表达^[13]。研究证明, Cathepsin K 与破骨细胞活性密切相关,

Cathepsin K 表达越多,破骨细胞活性越强,从而促进骨吸收,因此,抑制 Cathepsin K 活性可改善骨质疏松^[11]。本实验结果可以看出,格列美脲连续治疗6周后 Cathepsin K 表达量增多。本实验研究证明,高脂饲料喂养的 ApoE^{-/-} 小鼠经格列美脲连续治疗6周后,骨骺端 Cathepsin K 表达降低,推测格列美脲可以抑制骨吸收,从而使骨吸收和骨形成达到平衡,向成骨方向转变,其机制可能与抑制 Cathepsin K 的表达有关。

总之,本研究结果表明,高脂饮食诱导 ApoE^{-/-} 小鼠产生骨质疏松,经格列美脲连续治疗6周后,骨微结构得到改善,骨小梁排列整齐,骨强度增加,骨吸收降低,骨质疏松得到明显改善,其作用机制可能与抑制 Cathepsin K 的表达有关。

【参 考 文 献】

- [1] 郭鱼波,王丽丽,马如风,等. 女贞子水提液对去卵巢大鼠骨结构和骨代谢的影响研究. 中草药, 2016, 47(7): 1155-1161.

- Guo YB, Wang LL, Ma RF, et al. Effects of water extract from *Ligustri Lucidi Fructus* on bone structure and metabolism in ovariectomized rats. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 2016,47(7):1155-1161.
- [2] 薛延, 赵新华, 谭辉. 遗传基因与骨质疏松症. *中国骨质疏松杂志*, 1999,3(5):55-59.
- XueY, Zhao XH, Tan H. Genes related to osteoporosis. *Chin J Osteoporos* 1999,3(5):55-59.
- [3] Liu Y, Almeida M, Weinstein RS, et al. Skeletal inflammation and attenuation of Wnt signaling, Wnt ligand expression, and bone formation in atherosclerotic ApoE-null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016,(310):E762 - E773.
- [4] Hirasawa H, Tanaka S, Sakai A, et al. ApoE gene deficiency enhances the reduction of bone formation induced by a high-fat diet through the stimulation of p53-mediated apoptosis in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*, 2007,(22):1020-1030.
- [5] Pirih F, Lu J, Ye F, et al. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. *J Bone Miner Res*, 2012,(27):309-318.
- [6] Sage AP, Lu J, Atti E, et al. Hyperlipidemia induces resistance to PTH bone anabolism in mice via oxidized lipids. *J Bone Miner Res*, 2011,(26):1197-1206.
- [7] Soares EA, Nakagaki WR, Garcia JAD, et al. Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. *J Bone Miner Metab*, 2012,(30):419-425.
- [8] Hayakawa N, Suzuki A. Diabetes mellitus and osteoporosis. Effect of anti-diabetic medicine on osteoporotic fracture. *Clinical calcium*, 2012,22(9):1383-1390.
- [9] Ma R, Wang L, Zhao B, et al. Diabetes perturbs bone microarchitecture and bone strength through regulation of Sema3A/IGF-1/ β -Catenin in rats. *Physiology and Biochemistry*, 2017,(41):55-66.
- [10] 王丽丽, 马如风, 于娜, 等. 丹酚酸 B 通过抗氧化作用改善高脂饮食小鼠牙槽骨骨质疏松的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2017,23(3):281-285.
- Wang LL, Ma RF, Yu N et al. Salvianolic acid B prevents mandibular osteoporosis through anti-oxidation in high fat diet exposed mice. *Chin J Osteoporos*. 2017, 23(3):281-285.
- [11] Guo Y, Wang L, Ma R, et al. JiangTang XiaoKe granule attenuates cathepsin K expression and improves IGF - 1 expression in the bone of high fat diet induced KK-Ay diabetic mice. *Life Science*, 2016,(148):24-30.
- [12] Ma P, Gu B, Xiong W, et al. Glimepiride promotes osteogenic differentiation in rat osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS pathway in a high glucose microenvironment. *PLoS One*, 2014,9(11):e112243.
- [13] 韩峻峰, 罗敏. Cathepsin K 的研究进展. *国际内分泌代谢杂志*, 2006,26(2):125-127.
- Han JF, Luo M. Recent progress on the researches of cathepsin K. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2006, 26(2):125-127.

(收稿日期: 2017-05-01;修回日期:2017-05-11)

CNKI 研制成功《医院科研成果统计分析与评价数据库》,日前通过专家鉴定

2017 年 7 月 20 日,同方知网(CNKI)中国科学文献计量评价研究中心研发的《医院科研成果统计分析与评价数据库》召开了专家鉴定会。来自卫生和医疗主管部门、医院科研处、学协会等 18 个单位的 20 位专家参会,并对该项成果给予高度评价,认为其达到国内领先水平。

该数据库统计了全国 11863 家医院(包括 1647 家三级医院、6357 家二级医院)及其 200 万名学者近 10 年的科研产出成果数,并对其学术影响力进行了评价。统计的科研成果类型包括国内期刊发文、SCI 论文、国内会议和 ISTP 国际会议论文,以及专利、基金和奖励等。除了统计成果数量以外,该数据库还统计了期刊论文的被引频次、下载频次等影响力指标,并发布了医院和学者的 h 指数、综合指数等综合评价指标。为了满足医院各科室及细分学科领域的评价需求,数据库按临床科室情况设计了 28 个一级学科进行分类评价。

该数据库为医院科研绩效评价与管理提供了丰富、全面的统计数据。基于“科研结果管理”的理念,该数据库发布了大量客观事实数据。主要用途可以概括为:首先,支持医院的学科发展水平评价。既能纵向比较各年各学科发展趋势,又能横向与全国同学科医院发展水平进行对比分析,从而知彼知己,找准医院学科建设的重点方向。其次,支持专家学者评价。该数据库对医院科研人员近 10 年的科研产出和学术影响力进行了全面统计分析,方便医院了解和管理本院各科室学者,也方便评估和寻找学科带头人和专家。第三,支持学者成果的快捷汇总和统计,把科研人员从整理自己成果的繁琐工作中解放出来。只需轻轻一点,即可轻松完成了科研成果及影响力数据的统计和导出!

《医院科研成果统计分析与评价数据库》网址: <http://www.pj.cnki.net/>, 欢迎咨询、订购。咨询电话: 010-82710850 82895056 转 8599, E-mail: aspt@cnki.net。