

· 论著 ·

甜菜碱通过 IGF-1R/ β -catenin 信号通路介导对 2 型糖尿病大鼠骨流失的保护作用贾歆^{1*} 刘强² 杨建彬¹ 王彦玲³ 刘砚星⁴ 刘经尧⁵

1. 邢台市人民医院药剂科, 河北 邢台 054001

2. 河北省眼科医院医学影像科, 河北 邢台 054001

3. 河北医科大学细胞生物室, 河北 石家庄 050017

4. 河北医科大学药理学教研室, 河北 石家庄 050017

5. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021)01-0086-05

摘要: **目的** 探讨甜菜碱(betaine, TCJ)对 2 型糖尿病大鼠骨量流失的影响,并探讨可能的机制。**方法** 30 只大鼠被随机分为对照组(CON)、模型组(MOD)及甜菜碱组(TCJ),每组 10 只,其中对 MOD 组和 TCJ 组建立 2 型糖尿病模型。随后 TCJ 组大鼠每天接受 50 mg/kg 甜菜碱治疗 12 周,待治疗结束后通过 Micro-CT 检测、HE 染色切片以及蛋白质印迹检测。**结果** 治疗 12 周后,与 MOD 组相比,三点弯曲试验、Micro-CT 和 HE 染色切片结果显示 TCJ 组的大鼠骨小梁数量、骨强度和骨密度得到明显改善($P<0.05$)。TCJ 组大鼠最大载荷和弹性模量、骨密度(bone mineral density, BMD)、TV/BV、Tb.N、Tb.Th 和 Tb.Sp 较 MOD 组明显改善($P<0.05$)。和 MOD 组比较,TCJ 组 β -catenin 表达水平明显上调,而 p-IGF-1R、p-GSK-3 β 、p- β -catenin、IGF-1R 和 GSK-3 β 表达水平显著下调,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 甜菜碱通过 IGF-1R/ β -catenin 信号通路介导对 2 型糖尿病大鼠骨流失起到保护作用。

关键词: 甜菜碱;骨量流失;IGF-1R/ β -catenin 信号通路;骨密度;骨强度

Protective effect of betaine on bone loss in the type 2 diabetic rats is mediated by IGF-1R/ β -catenin signal pathwayJIA Xin^{1*}, LIU Qiang², YANG Jianbin¹, WANG Yanling³, LIU Yanxing⁴, LIU Jingyao⁵

1. Department of Pharmacy, Xingtai People's Hospital, Xingtai 054001

2. Department of Medical Imaging, Hebei Eye Hospital, Xingtai 054001

3. Cell Biology Room, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017

4. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017

5. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

* Corresponding author: JIA Xin, Email: 13931908085@139.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of betaine (TCJ) on bone loss in type 2 diabetic rats and explore the possible mechanisms. **Methods** Thirty rats were randomly divided into a control group (CON), a model group (MOD), and a betaine group (TCJ), 10 in each group. Among them, type 2 diabetes models were established for MOD and TCJ group. Then TCJ group rats received 50 mg per day / kg betaine treatment for 12 weeks; after the treatment, they were detected by Micro-CT, HE stained sections and Western blot. **Results** After 12 weeks of treatment, compared with the MOD group, the result of the three-point bending test, Micro-CT and HE staining showed that the number of trabeculae, bone strength and bone density of the TCJ group were significantly improved ($P<0.05$). The maximum load and elastic modulus, BMD, TV/BV, Tb.N, Tb.Th and Tb.Sp of the TCJ group were significantly improved compared with the MOD group ($P<0.05$). Compared with the MOD group, the expression level of β -catenin in the TCJ group was significantly increased, while the expression levels of p-IGF-1R, p-GSK-3 β , p- β -catenin,

* 通信作者: 贾歆, Email: 13931908085@139.com

IGF-1R and GSK-3 β were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** Betaine mediates the protective effect on bone loss in type 2 diabetic rats through IGF-1R / β -catenin signaling pathway.

Key words: betaine; bone loss; IGF-1R/ β -catenin signaling pathway; bone mineral density; bone strength

糖尿病(diabetes, DM)是一种慢性代谢性疾病, 由于血糖水平升高, 导致骨量丢失以及脆性骨折风险增加^[1]。据世界卫生组织(WHO)关于糖尿病的全球报告, 2014 年全球约有 4.22 亿成年人患有 DM, 且患病率呈上升趋势。更严重的是, 90% 的 DM 患者是 2 型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM), 其中 20%~60% 合并骨质疏松症^[2]。骨质疏松症或糖尿病引起的脆性骨折风险增加 2~6 倍^[3]。由于大量且不断增长的糖尿病患者引起的糖尿病性脆性骨折患病率增加, 给世界范围内带来严重的影响。因此更好地预防和治疗糖尿病患者出现的骨量丢失显得非常重要。甜菜碱(betaine, TCJ)是一种重要的人体营养素^[4], 最初是在从甜菜中提取蔗糖的过程中发现的。后来发现 TCJ 在许多海洋无脊椎动物、植物和动物中广泛分布。TCJ 在生理上既可以作为一种有机渗透调节剂来保护处于压力下的细胞, 也可以通过反甲基化作为甲基供体^[5]。体外和体内研究^[6-7]表明, 饮食中补充 TCJ 可以显著减少体内脂肪沉积、改善肝脏脂肪变性和增加瘦肉重量。但是, 目前 TCJ 对 T2DM 骨丢失的研究有限, 因此本研究的目的是为了观察 TCJ 对 T2DM 大鼠骨量流失的影响, 并初步探讨可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组和研究设计

30 只 14 周龄体重为 (260 ± 30) g 的 Sprague-Dawley 雌性大鼠购自广州实验动物中心(SCXK [粤] 2013-0034), 并饲养在受控制动物房内, 室温控制在 $(23 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, 湿度为 $50\% \pm 10\%$ 以及 12 h 的明/暗循环。经过一周的适应期后, 将大鼠随机分为三组: 模型组(MOD 组, $n=10$), 接受腹腔内注射剂量为 35 mg/kg 的链脲佐菌素(STZ; Sigma, 美国), 经过 4 周的高脂/糖饮食(HFD; 常规饮食加 20% 的糖、10% 的猪油、1.0% 的巧克力和 2.0% 的胆固醇)诱发 T2DM; 对照组(CON 组, $n=10$) 接受为期四周的常规实验室饲料和水; 甜菜碱治疗组(TCJ 组, $n=10$), 在诱导 T2DM 基础上每天再给予剂量为 50 mg/kg 的甜菜碱治疗。HFD 加剂量为 35 mg/kg STZ 的方法参照文献[8]。注射 STZ 后第 3 天和第 4 天, 使用 Roche 血糖仪测试大鼠的空腹血糖(FBG)。

T2DM 标准为连续两次进行了 FBG、达到或超过 11.1 mmol/L 的大鼠。治疗 12 周后, 将大鼠用 3% (0.03 g/mL) 的戊巴比妥钠溶液麻醉并处死。收集血液样本和双侧股骨进一步检测。

1.2 方法

1.2.1 三点弯曲实验: 用材料测试仪(ElectroPuls E1000 Test System, Instron Corp., Norwood, MA, 美国)对三组左侧股骨进行三点弯曲测试。将股骨放在材料检测机支架上, 两个支架之间的距离为 1.5 mm, 测试区域定义为股骨的最中央部分。然后在机器中以 2 mm/min 的恒定压缩速度纵向测试每个股骨。通过连接的计算机监控骨折时的最大载荷(N)和弹性模量(mm^2)的数据。

1.2.2 Micro-CT 扫描和分析: 将三组的左侧股骨远端分开进行显微计算机断层扫描(Micro-CT)扫描(Skyscan 1172; 比利时布鲁克), 并使用提供的软件(CTAn-Shortcut v.1.17.7.1; 比利时布鲁克)进行分析。将股骨放置在紧密配合的刚性塑料管内, 以防止移动, 并将其放在能够沿轴向自动旋转的转盘上。在所有方向上的空间分辨率均设置为 9 μm 。扫描后, 选择股骨远端的松质骨作为感兴趣的体积(VOI), 该体积仅限于股骨远端的内部区域, 通过使用微型 CT 分析仪软件进行绘制可以提取小梁。计算了以下 3D 形态参数来描述骨骼质量和微观结构: 骨密度(bone mineral density, BMD, g/cm^3)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)和骨小梁分离度(Tb.Sp)。

1.2.3 苏木精-伊红染色: 使用 10% (v/v) 乙二胺四乙酸(EDTA)磷酸盐缓冲液将股骨样品脱钙 4~6 周, 然后用标准分级的乙醇溶液脱水, 包埋在石蜡中。将样品纵向切成 5 μm 切片, 用苏木精-曙红(HE)染色, 并使用 Olympus-BX53 光学显微镜观察小梁的组织形态。

1.2.4 蛋白质印迹检测: 将股骨样品在液氮中压碎, 并通过放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液裂解。离心后, 使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测量上清液中的蛋白质水平。将每种蛋白质样品(60 μg)装入 10% (0.1 g/mL) 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中, 并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。然后, 将膜用 5% (0.05 g/mL) 牛血

清白蛋白(BSA)溶液封闭 1 h,并与抗 IGF-1R β (#9750;1:1 000; CST, USA)、p-IGF-1R β (#3021;1:1 000; CST, USA)、 β -catenin (#8480;1:1 000; CST, USA)、p- β -catenin (#9561;1:1 000; CST, USA)、GSK-3 β (#9315;1:1 000; CST, USA)、p-GSK-3 β (#5558;1:1 000; CST, USA) 和 β -actin (#ab6276;1:20 000; KB, UK) 在 4 °C 下过夜,然后在室温下放置相应的二抗 1 h,并用 TBST[Tris-HCl 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, Tween-20 0.05% (v/v); pH = 7.5] 洗涤 3 次。用增强的化学发光(ECL)发光液体可视化蛋白质表达信号,并使用 Tanon 系统捕获图像。使用 ImageJ 软件定量印迹的灰度值。

1.3 统计学分析

统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),然后进行 Student's *t* 检验。结果使用均数 $\pm$ 标准差(SD)表示。 $P < 0.05$ 表示比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Micro-CT 结果分析

股骨干骺端骨小梁三维重建图像如图 1 A 所示。股骨干骺端的微观参数如图 1B~图 1F 所示。MOD 组左侧股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 较 CON 组明显降低,而 Tb.Sp 则明显升高($P < 0.05$)。TCJ 组左侧股骨 BMD、BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 均明显高于 MOD 组($P < 0.05$),而 Tb.Sp 则明显低于 MOD 组($P < 0.05$)。

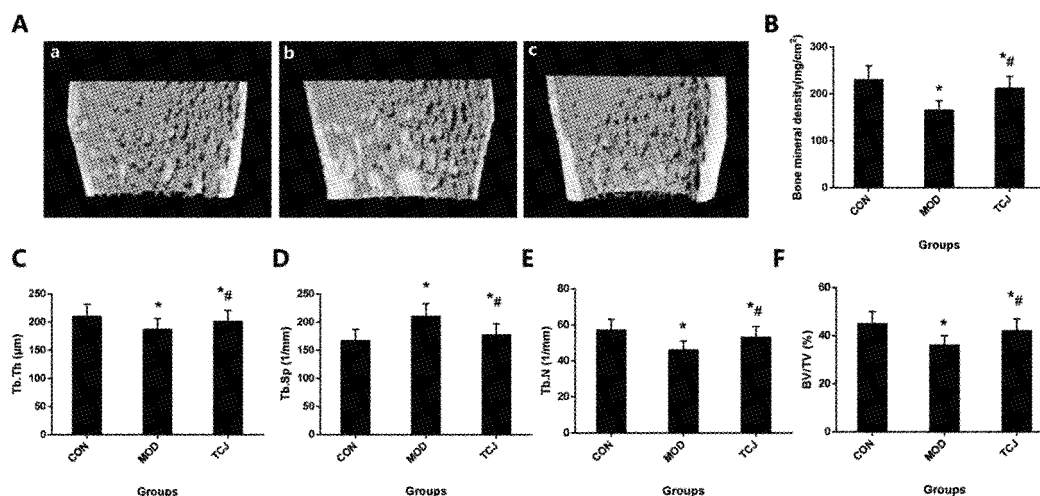


图 1 三组大鼠股骨干骺端 Micro-CT 检测结果

Fig.1 Results of Micro-CT in the femoral metaphysis of three groups of rats

注:A:股骨干骺端骨小梁三维重建图像;B~F:股骨干骺端微观参数。a: CON 组; b: MOD 组; c: TCJ 组。与 CON 组相比, * $P < 0.05$; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。

2.2 股骨组织病理学

各组大鼠股骨干骺端 HE 染色如图 2 所示, CON 组股骨干骺端骨小梁致密,骨小梁网状结构正

常。MOD 组股骨干骺端骨小梁疏松且变薄,骨小梁间隙变宽。TCJ 组骨小梁数量和连接增加明显,表现出明显的结构恢复。



图 2 三组股骨的组织病理学

Fig.2 Histopathology of the three groups of femur

注:A: CON 组; B: MOD 组; C: TCJ 组。

2.3 股骨的生物力学变化

各组股骨三点弯曲试验如图 3 所示, CON 组的最大载荷和弹性模量均高于 MOD 组, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TCJ 组的最大载荷和弹性模量均高于 MOD 组 ($P < 0.05$)。

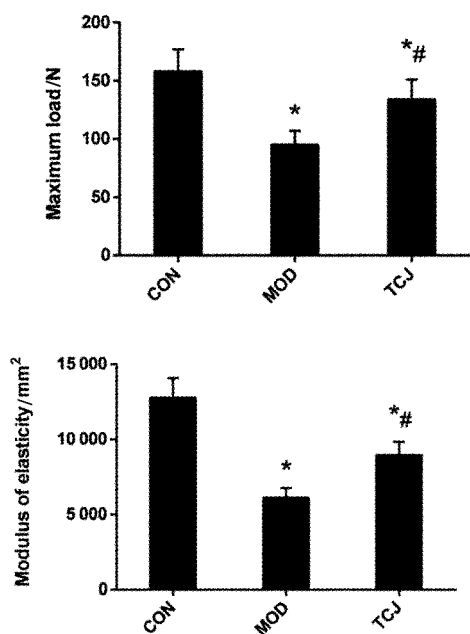


图 3 股骨的三点弯曲试验结果

Fig.3 Three-point bending test results of the femur of rats

注: 与 CON 组相比, * $P < 0.05$; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。

2.4 WB 分析

和 CON 组比较, MOD 组 p-IGF-1R、p-GSK-3 β 、p- β -catenin、IGF-1R 和 GSK-3 β 表达水平明显上调, 而 β -catenin 表达水平明显下调, 比较差异有统计学

意义 ($P < 0.05$)。和 MOD 组比较, TCJ 组 β -catenin 表达水平明显上调, 而 p-IGF-1R、p-GSK-3 β 、p- β -catenin、IGF-1R 和 GSK-3 β 表达水平显著下调, 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

本研究经过 4 周的高脂肪饮食诱导及 STZ 腹腔注射成功建立了 2 型糖尿病模型。经 HE 和 Micro-CT 证实糖尿病大鼠出现骨丢失、骨强度减弱、组织形态改变和微结构受损。这些结果与以前的研究相吻合^[9]。在此模型的基础上, 笔者进一步研究了分子机制, 发现 TCJ 组大鼠的 IGF-1R、GSK-3 β 和 p- β -catenin 的表达以及相关蛋白的磷酸化相对于 MOD 组大鼠明显降低, 而 β -catenin 表达显著增加。IGF-1R/ β -catenin 信号通路的改变表明, 该信号轴可能在糖尿病大鼠经甜菜碱治疗的骨质丢失的发病机制中起着关键作用。本研究结果表明, 甜菜碱可能成为防治糖尿病患者骨丢失的新型治疗药物。

STZ 是最常用于诱发糖尿病的化学物质, 可通过破坏 β 细胞来同时诱导糖尿病^[10]。低剂量的 STZ 会引起胰岛素分泌的轻度破坏, 类似于 T2DM 的后期阶段^[11]。此外, HFD 有助于肥胖症、胰岛素抵抗和高胰岛素血症的发展, 但不会直接导致高血糖症或糖尿病^[11]。所以, 将 HFD 和 STZ 结合起来不仅可以模拟人类 T2DM 的表型, 还可以模拟其发病机理, 因此成为在大鼠中诱导 T2DM 的广泛使用的方法^[12]。尽管根据先前的研究^[12]将 FBG 的临界值设置为 11.1 mmol/L, 但本研究中所有 2 型糖尿病大鼠的 FBG 都明显高于 11.1 mmol/L。

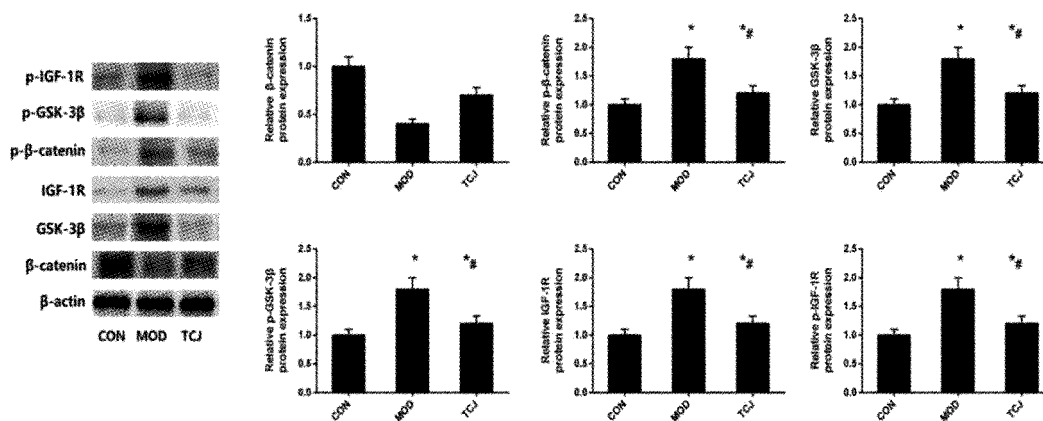


图 4 使用 WB 检测 p-IGF-1R、p-GSK-3 β 、p- β -catenin、IGF-1R、 β -catenin 和 GSK-3 β 的相对表达

Fig.4 Relative expression of p-IGF-1R, p-GSK-3 β , p- β -catenin, IGF-1R, β -catenin and GSK-3 β using Western blotting

注: 与 CON 组相比, * $P < 0.05$; 与 MOD 组相比, # $P < 0.05$ 。

众所周知, IGF-1 在骨骼中发挥合成代谢作用^[13]。IGF-1 水平的下降会导致骨骼脆弱和骨折风险增加, 并且在骨量丢失的发生中起重要作用^[14]。IGF-1R 是由 α 和 β 链组成的两个蛋白质亚基的同型二聚体, 这些亚基和链之间具有二硫键。它与骨骼和葡萄糖代谢有关, 是葡萄糖和骨骼代谢紊乱的关键介质。通过与配体 IGF-1 结合来改变 IGF-1R 的构象, 然后通过独立于配体的自磷酸化完全激活^[15]。这会诱导多种底物的磷酸化, 例如胰岛素受体底物 (IRS) 和 Shc 蛋白, 并引发特定的信号级联反应, 例如 PI3K/Akt 和 Ras/MAPK 途径^[16]。在本研究中, IGF-1R 的磷酸化在糖尿病大鼠中显著增强。因此, IGF-1R 的过度磷酸化可通过抑制 IRS1 的磷酸化来诱导 β -catenin 磷酸化。导致 β -catenin 失活, 最终导致骨形成减小。

Wnt/ β -catenin 信号通路对于骨形成是必不可少的。Wnt 蛋白通过激活卷曲蛋白/脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP5) 或 LRP6 受体复合物来阻止 β -catenin 降解, 从而触发其信号级联反应。GSK-3 β 是该经典 Wnt 信号通路的组成部分, 可使 β -catenin 磷酸化, 从而促进其降解。一方面, GSK-3 β 受 IGF-1R 调控, 是 IGF-1R/PI3K/Akt 途径的下游元素^[13]。另一方面, 活化的 GSK-3 β 导致 IRS1 降解, 导致 β -catenin 上游组分 Dvl2 的稳定性降低, 并减弱 Wnt/ β -catenin 信号传导。此外, 先前的研究^[17]表明, IGF-1 通过催化 Axin2 的转录和稳定 Axin1 蛋白来拮抗 Wnt/ β -catenin 信号通路。本研究中使用甜菜碱治疗后发现 IGF-1R、GSK-3 β 和 β -catenin 磷酸化水平显著降低, 导致 β -catenin 表达上调, 出现骨量以及骨强度增加, 骨量丢失改善。

当然, 本研究也存在一定的局限性。在进行 STZ 注射前未测量胰岛素抵抗指数和胰岛素敏感性指数, 这些是糖尿病模型建立疗效的关键指标, 会影响模型建立的准确性。另一个限制是在本研究中未使用 IGF-1R/ β -catenin 信号传导抑制剂。未来的研究应使用抑制剂来确定是预防还是逆转了骨丢失或微结构的损伤。

综上, 本研究结果表明, 甜菜碱可以通过 IGF-1R/ β -catenin 信号轴介导对 2 型糖尿病大鼠骨量流失的保护作用。

【参 考 文 献】

[1] 谭伟源, 陈军平, 宋若愚, 等. 2 型糖尿病性骨质疏松大鼠 ADSCs 成骨能力的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25

(9): 1201-1205, 1211.

- [2] Schwartz AV, Hillier TA, Sellmeyer DE, et al. Older women with diabetes have a higher risk of falls: a prospective study [J]. Diabetes care, 2002, 25(10): 1749-1754.
- [3] Looker AC, Eberhardt MS, Saydah SH. Diabetes and fracture risk in older U.S. adults [J]. Bone, 2016, 82: 9-15.
- [4] Craig SA. Betaine in human nutrition [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2004, 80(3): 539-549.
- [5] M LSS. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism [J]. Clinical Biochemistry, 2010, 43(9): 732-744.
- [6] Day CR, Kempson SA. Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(6): 1098-1106.
- [7] JM C, L GF, NE Z. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms [J]. Amino acids, 2014, 46(8): 1785-1793.
- [8] 刘玉琳, 李国泰. 不同强度跑步运动与二甲双胍联用对 2 型糖尿病并发骨质疏松大鼠的骨密度、骨吸收、胰岛素敏感性的影响效果研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(2): 240-246.
- [9] R M, I. W, B Z, et al. Diabetes perturbs bone microarchitecture and bone strength through regulation of Sema3A/IGF-1/ β -catenin in rats [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 41(1): 55-66.
- [10] 何佳, 祁珊珊, 郑红星, 等. 链脲佐菌素诱导 SD 大鼠 1 型糖尿病性骨质疏松模型的建立 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12): 1716-1720.
- [11] T S. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model [J]. Experimental Biology and Medicine (Maywood, N. J.), 2012, 237(5): 481-490.
- [12] Bozic J, Markotic A, Cikes-Culic V, et al. Ganglioside GM3 content in skeletal muscles is increased in type 2 but decreased in type 1 diabetes rat models: Implications of glycosphingolipid metabolism in pathophysiology of diabetes [J]. Journal of Diabetes, 2018, 10(2): 130-139.
- [13] Fowlkes JL, Nyman JS, Bunn RC, et al. Osteo-promoting effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) in a mouse model of type 1 diabetes [J]. Bone, 2013, 57(1): 36-40.
- [14] Sroga GE, Wu PC, Vashishth D. Insulin-like growth factor 1, glycation and bone fragility: implications for fracture resistance of bone [J]. PLoS one, 2015, 10(1): e0117046.
- [15] Baxter RC. How IGF-1 activates its receptor [J]. J Cell Commun Signal, 2015, 9(1): 87.
- [16] Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2014, 6(1): 231.
- [17] Schlupf J, Steinbeisser H. IGF antagonizes the Wnt/ β -Catenin pathway and promotes differentiation of extra-embryonic endoderm [J]. Differentiation, 2014, 87(5): 209-219.

(收稿日期: 2020-03-02; 修回日期: 2020-05-24)