

网络出版时间: 2020-9-24 13:13 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200923.1150.016.html>

## 利拉鲁肽通过自噬及改善氧化应激缓解大鼠糖皮质激素性骨质疏松

杨婧 杨丽娜 丁庭庭 钟兴 潘天荣

**摘要** 目的 探讨利拉鲁肽对大鼠糖皮质激素性骨质疏松的作用及其可能机制。方法 将30只健康8周龄雄性SD大鼠随机分为正常对照组、地塞米松组以及地塞米松+利拉鲁肽干预组,干预12周后通过Micro-CT检测骨密度及骨微结构,试剂盒检测骨组织内活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)含量,Western blot检测自噬特异性蛋白Beclin-1、Atg5、p62/SQSTM1及Map1-LC3-II的表达水平。结果 地塞米松组股骨远端干骺端的骨密度(BMD)、骨小梁体积比率(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.Sp)及骨小梁连接密度(Conn.D)均较正常对照组降低,骨组织内氧化应激产物ROS及MDA含量升高,抗氧化酶SOD活性降低,自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5及Map1-LC3-II表达水平均升高,p62/SQSTM1蛋白表达水平下降(均 $P < 0.05$ )。利拉鲁肽干预组大鼠的骨密度、骨微结构得到改善,骨组织内ROS及MDA含量降低,抗氧化酶SOD活性升高,自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5及Map1-

LC3-II的表达水平下降,p62/SQSTM1蛋白表达水平上升(均 $P < 0.05$ )。结论 利拉鲁肽能改善糖皮质激素造成的骨质疏松,其机制可能与调整自噬及改善氧化应激有关。

**关键词** 糖皮质激素性骨质疏松;利拉鲁肽;自噬;氧化应激

中图分类号 R 589.5; R 97  
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)11-1724-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.11.016

糖皮质激素性骨质疏松(glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP)作为最常见的继发性骨质疏松类型,在长期接受糖皮质激素(glucocorticoid, GC)治疗的患者中发病率高达30%~50%,已成为一个十分严峻的全球健康问题<sup>[1]</sup>。胰高血糖素样肽-1(GLP-1)是肠促胰岛素的一种,近年来一些研究显示,它不但能够作用于胰腺,与骨代谢也密切相关<sup>[2]</sup>。其类似物利拉鲁肽对骨骼有正性作用,但是具体机制尚不明确<sup>[3]</sup>。该研究建立GIOP大鼠模型,使用利拉鲁肽进行干预,通过分析骨密度(bone mineral density, BMD)、骨微结构、自噬(auto-phagy)及氧化应激(oxidative stress, OS)水平的变化,探讨利拉鲁肽对GIOP的影响,并初步讨论其机制。

2020-08-03 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(编号: KJ2017A174、KJ2018A0202)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院内分泌科, 合肥 230601

作者简介: 杨婧,女,硕士研究生;

潘天荣,男,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者,  
E-mail: ptr1968@163.com

culture containing 10% FBS. Tissue explants adherent method was applied to obtain VSMCs. VSMCs was cultivated in DMEM/F12 culture containing 20% FBS. The uptake of endothelial exosomes by VSMCs was tracked by high-content cell imaging system. SiRNA was used to knock down the expression of ATG5. **Results** HUVECs with high purity and good viability were isolated successfully by 0.1% type II collagenase digestion. The cell displayed typical cobblestone-like morphology under the inverted phase-contrast microscope. Immunofluorescence technique validated that the isolated cells with CD31/Pan-Cadherin/ Factor VIII-positive phenotype account for 96%. VSMCs were observed on the 3rd day of the culture. The cells showed long shuttle and polygonal morphology. Immunofluorescence technique identified that the expression frequency of SM22- $\alpha$  and  $\alpha$ -actin was about 95%. Endothelial exosomes obtained by ultracentrifugation displayed Hsp70/TSG101/CD9/CD63 positive phenotype. VSMCs started to uptake endothelial exosomes after 30 minutes co-culture showed by high-content cell imaging system. After 4 hours, the numbers of endothelial exosomes uptake by VSMCs increased significantly. Cell growth and proliferation curve showed that, at the concentration of 200  $\mu\text{g/ml}$ , the exosomes secreted by HUVEC in which ATG5 decreased could inhibit the proliferation of VSMC. **Conclusion** ATG5 regulates VSMC proliferation by mediating endothelial exosomes.

**Key words** HUVEC; VSMC; exosome; ATG5

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 8周龄雄性SD大鼠30只,体重(220±10)g,由安徽省实验动物中心提供。饲养环境:标准鼠笼分笼饲养,每笼5只,温度(23.0±2.0)℃,湿度(55±5)%,光照时间7:00~19:00,通风环境良好,每周更换2次垫料,每12h添加饲料及水1次,不限制大鼠摄食及饮水。

**1.1.2 主要药物、器材与试剂** 地塞米松(石药银湖制药有限公司);利拉鲁肽(丹麦诺和诺德公司);活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒、丙二醛(malonaldehyde, MDA)测定试剂盒及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(万类生物公司);Beclin-1抗体、Atg5抗体、LC3B抗体、p62/SQSTM1W抗体及 $\beta$ -actin(碧云天生物公司);Micro-CT(美国通用公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验动物分组及模型的建立** 所有雄性SD大鼠适应性喂养1周后,采用数字表法随机平均分为地塞米松组(DXM组)、地塞米松加利拉鲁肽干预组(DXM+Lira组)及正常对照组(CON组),每组各10只,全程药物干预12周,具体方式如下:①CON组:给予0.1ml生理盐水每日肌肉注射;②DXM组:按照1mg/kg剂量配置成0.1ml地塞米松溶液每周2次肌肉注射;③DXM+Lira组:在相同剂量及频率地塞米松溶液注射的同时,给予利拉鲁肽200 $\mu$ g/kg剂量每日皮下注射。每周定时对所有大鼠进行体质量测定,并根据其数值变化相应地调整药物的使用剂量。

**1.2.2 样本收集** 于实验12周末,使用10%水合氯醛(3.5ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,心房放血处死大鼠后收集双侧股骨,剔除全部附着肌肉、软组织及骨髓,包裹生理盐水纱布置于-20℃冰箱备用。

**1.2.3 Micro-CT检测BMD、骨微结构** 将左侧股骨室温下解冻后固定于样品固定器内,以15 $\mu$ m的分辨率行Micro-CT扫描并行组织结构重建。得到重建图像后,使用自带软件定量分析得到BMD、骨小梁体积比率(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁间距(trabecular separation, Tb. Sp)和骨小梁连接密度(connecti-

ty density, Conn. D)参数。

**1.2.4 试剂盒检测骨组织氧化应激指标** 取大鼠右侧股骨远端骨组织,放入液氮中反复研磨直至粉末状,加入PBS后使用1000g离心10min收集上清液,按照说明书使用试剂盒测定ROS、SOD及MDA含量。

**1.2.5 蛋白免疫印迹(Western blot)分析自噬相关蛋白表达** 取大鼠股骨远端骨组织粉末,使用Western及IP细胞裂解液提取干骺端总蛋白,转移至PVDF膜上后与特异性抗体孵育,曝光显影后通过灰度分析Beclin-1、Atg5、p62/SQSTM1W及Map1-LC3-II的表达水平。

**1.3 统计学处理** 使用统计软件SPSS 21.0进行分析。进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 $t$ 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 骨组织Micro-CT分析** Micro-CT下股骨骨形态计量学结果显示,与CON组比较,DXM组大鼠BMD降低,BV/TV下降,Tb. N减少,Tb. Th变薄,Tb. Sp增宽,连接变差,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而在利拉鲁肽干预下,DXM+Lira组较DXM组BMD增加,骨小梁变多变粗变密,连接改善,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

**2.2 骨组织氧化应激水平变化** 与CON组比较,DXM组大鼠骨组织氧化应激产物ROS和MDA水平增加,抗氧化酶SOD水平下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与DXM组比较,DXM+Lira组大鼠骨组织ROS和MDA水平下降,SOD水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表2。

**2.3 骨组织自噬水平变化** 与CON组比较,DXM组大鼠股骨远端骨组织自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5及Map1-LC3-II表达水平上升,p62/SQSTM1W蛋白表达水平略有下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与DXM组比较,DXM+Lira组Beclin-1、Atg5及Map1-LC3-II的蛋白表达水平下降,p62/SQSTM1W蛋白表达水平略有上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图1。

表1 鼠左侧股骨 Micro-CT 结果 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 项目                              | CON 组              | DXM 组               | DXM + Lira 组        | F 值   | P 值  |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------|------|
| BMD ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) | 282.29 $\pm$ 49.02 | 187.57 $\pm$ 44.69* | 280.16 $\pm$ 66.08# | 4.24  | 0.04 |
| BV/TV                           | 0.32 $\pm$ 0.08    | 0.20 $\pm$ 0.08*    | 0.24 $\pm$ 0.07     | 4.83  | 0.03 |
| Tb. N ( $\text{mm}^{-1}$ )      | 4.94 $\pm$ 0.15    | 3.32 $\pm$ 0.15*    | 4.19 $\pm$ 1.13     | 6.87  | 0.01 |
| Tb. Th (mm)                     | 0.20 $\pm$ 0.06    | 0.07 $\pm$ 0.01*    | 0.19 $\pm$ 0.04#    | 10.74 | 0.03 |
| Tb. Sp (mm)                     | 0.20 $\pm$ 0.01    | 0.30 $\pm$ 0.01*    | 0.24 $\pm$ 0.09     | 4.17  | 0.05 |
| Conn. D ( $\text{mm}^{-3}$ )    | 132.38 $\pm$ 15.08 | 68.75 $\pm$ 11.28*  | 119.28 $\pm$ 25.27# | 15.02 | 0.00 |

与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 DXM 组比较: #  $P < 0.05$ 表2 股骨组织中氧化应激指标变化 ( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 项目                             | CON 组                    | DXM 组                     | DXM + Lira 组              | F 值   | P 值  |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|------|
| ROS(荧光强度)                      | 22 486.33 $\pm$ 3 430.40 | 41 378.67 $\pm$ 5 252.80* | 39 781.67 $\pm$ 4 312.99# | 27.08 | 0.00 |
| MDA( $\text{nmol}/\text{mg}$ ) | 3.42 $\pm$ 0.91          | 6.60 $\pm$ 0.84*          | 4.85 $\pm$ 1.16#          | 10.24 | 0.01 |
| SOD( $\text{U}/\text{mg}$ )    | 14.25 $\pm$ 2.29         | 4.56 $\pm$ 0.88*          | 8.26 $\pm$ 1.57#          | 46.75 | 0.00 |

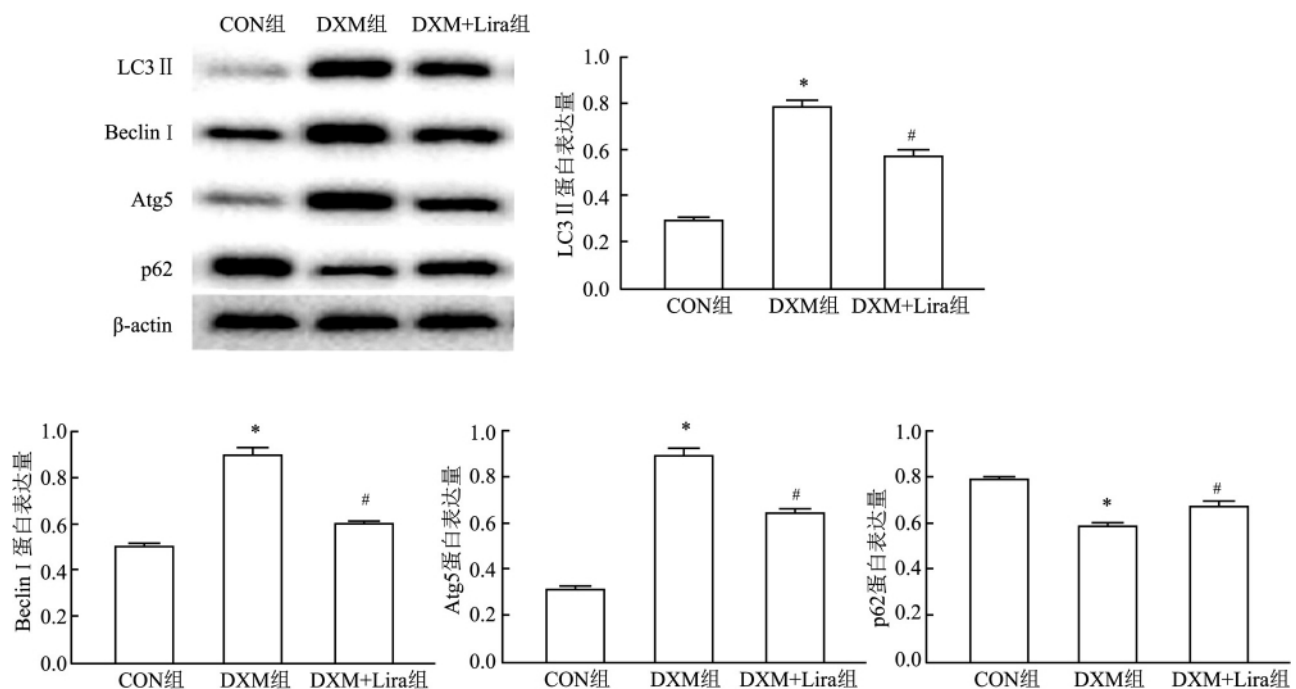
与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 DXM 组比较: #  $P < 0.05$ 

图1 大鼠骨组织 Beclin-1、Atg5、p62 及 LC3 II 的蛋白表达变化

与 CON 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 DXM 组比较: #  $P < 0.05$ 

### 3 讨论

利拉鲁肽是一种利用酵母生产的人工合成长效 GLP-1 类似物,与天然 GLP-1 具有 97% 的序列同源性,可通过多种方式作用于骨骼并具有保护作用<sup>[4]</sup>。Mansur et al<sup>[5]</sup>发现,在 GIOP 小鼠模型中,利拉鲁肽可以预防骨丢失,延缓骨质疏松进程。另有研究<sup>[6]</sup>表明,利拉鲁肽对于绝经后骨质疏松小鼠模型也有增加 BMD,改善骨结构等作用。本研究及前期研究<sup>[7]</sup>结果与其一致,经 Micro-CT 扫描,DXM 组

的大鼠较 CON 组 BMD 下降, BV/TV、Tb. N、Tb. Th、Conn. D 下降,提示骨小梁变少变疏变细,骨质疏松模型造模成功。在利拉鲁肽干预下,与 DXM 组比较,大鼠 BMD 增加, Tb. Th、Conn. D 增加,提示骨小梁微结构得到改善,说明利拉鲁肽可以增加 BMD、防止骨微结构的破坏,对 GIOP 具有一定的改善作用。

氧化应激反应可以抑制成骨细胞分化并促进其凋亡,诱导破骨前体细胞的增殖分化并提高其活性,对维持骨代谢平衡十分重要<sup>[8]</sup>。在高剂量糖皮质

激素诱导下,机体内产生的自由基水平高于细胞的抗氧化防御能力,过量的活性氧 ROS 存在于组织或细胞内将诱发氧化应激反应,并直接或间接导致氧化损伤。动物实验表明<sup>[9]</sup>,相较于对照组,GIOP 家兔模型的 BMD 下降,血清自由基水平升高,抗氧化酶活性降低,当注射抗氧化剂干预后,可有效地逆转上述改变。本研究结果与之相符,与 CON 组比较,DXM 组大鼠骨组织氧化应激产物 ROS、MDA 水平均上升,抗氧化酶 SOD 水平下降,说明大鼠氧化应激水平升高,且出现了骨质疏松,其可能原因是地塞米松引起了氧化应激损伤从而导致了骨代谢失衡。在利拉鲁肽干预下,相较于 DXM 组,大鼠氧化应激产物 ROS、MDA 水平均下降,抗氧化酶 SOD 水平上升,且 BMD 及骨微结构指标好转,提示利拉鲁肽可能通过改善氧化应激缓解大鼠 GIOP 的程度。

自噬对骨代谢及其相关重要细胞也有重要影响,适度的自噬可以使骨细胞保持功能,但是过度的自噬则会激活凋亡或转换为自噬性死亡导致骨代谢紊乱<sup>[10]</sup>。有研究<sup>[11]</sup>表明低剂量的 GC 可以诱导骨细胞自噬,具有保护作用;高剂量的 GC 会引起成骨细胞的凋亡,从而导致骨强度下降。本研究结果与之符合,DXM 组大鼠较 CON 组自噬相关基因 Beclin-1、Atg5 及 Map1-LC3-II 蛋白表达水平均升高,p62/SQSTM1 蛋白表达水平略有下降,并伴 BMD 下降,骨微结构破坏。相较于 DXM 组,利拉鲁肽干预组自噬相关蛋白 Beclin-1、Atg5 及 Map1-LC3-II 的表达水平下降,p62/SQSTM1 蛋白表达水平略有上升,且大鼠 BMD 增加,骨微结构改善,提示利拉鲁肽可能通过调整自噬水平,改善大鼠 BMD 与骨微结构。

氧化应激反应与自噬对于骨代谢都十分重要,并且这两者关系密切,互相作用。一方面,氧化应激的主要产物 ROS 可以通过多种机制促进自噬<sup>[12]</sup>。在自噬的诱导阶段中,过量的 ROS 可以抑制 PI3K-Akt-mTOR 从而激活自噬。在自噬体形成过程中,ROS 可以通过抑制 Atg4 的活性引起 LC3-II 堆积,使得自噬体增多从而促进自噬。在饥饿条件下,细胞内产生的大量 ROS 可以氧化 Atg4 抑制 LC3-II 去脂化从而保证自噬体延伸。ROS 还能促进待降解物质的泛素化修饰,使待降解物与 p62 及 LC3-II 泛素化结合从而易于被自噬。另一方面,自噬可以抑制氧化应激及其造成的损伤<sup>[13]</sup>。作为氧化应激的

直接引物,约 90% 的 ROS 产生于线粒体内膜呼吸链,持久严重的氧化应激将造成线粒体损伤从而产生更多的 ROS。通过清除损伤的线粒体,自噬可以直接调控 ROS 水平。实验<sup>[14]</sup>表明,用脂多糖刺激心肌细胞会产生大量 ROS 继而损伤线粒体,通过线粒体自噬则能及时清除受损线粒体并降低 ROS 水平。此外,自噬还可以通过修复损伤的 DNA 以避免氧化应激造成的细胞死亡。有研究<sup>[15]</sup>表明,敲除自噬相关基因 Beclin-1、Atg5 及 Atg7 将导致 DNA 损伤累积,加速细胞死亡。

氧化应激对于自噬的调节功能呈现两面性,自噬对于骨代谢也存在双重影响。少量的 ROS 可以激活自噬,通过抑制氧化应激损伤自噬可以减少成骨细胞凋亡,大量的 ROS 则会导致过度自噬,从而激活凋亡或者转换为自噬性死亡。因而在本研究中,DXM 组自噬水平增高,但是并未通过提高自噬水平阻止 BMD 下降及骨微结构破坏,其可能原因是大剂量的地塞米松引起了氧化应激损伤并直接导致了骨代谢的失衡,氧化应激反应中产生的过量活性氧 ROS 又引起了过度自噬诱发成骨细胞凋亡从而进一步加剧了骨质疏松。在利拉鲁肽干预下,大鼠骨组织内活性氧 ROS 以及脂质过氧化代谢产物 MDA 的表达减少,抗氧化酶 SOD 的活性增加,部分自噬相关蛋白表达降低,BMD 及骨微结构改善,提示利拉鲁肽可能是通过改善氧化应激水平并调整细胞自噬,从而起到缓解骨质疏松作用。

综上所述,利拉鲁肽改善由 GC 诱导的大鼠骨质疏松,推测其可能与改善氧化应激和调节自噬有关,但确切的作用机制还需进一步研究深入探讨。

## 参考文献

- [1] Weinstein R S. Glucocorticoid-induced bone disease [J]. N Engl J Med, 2011, 365(1): 62-70.
- [2] Mieczkowska A, Mansur S, Bouvard B, et al. Double incretin receptor knock-out (DIRKO) mice present with alterations of trabecular and cortical micromorphology and bone strength [J]. Osteoporos Int, 2015, 26(1): 209-18.
- [3] Su B, Sheng H, Zhang M, et al. Risk of bone fractures associated with glucagon-like peptide-1 receptor agonists' treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Endocrine, 2015, (48): 107-15.
- [4] Cho Y M, Wideman R D, Kieffer T J. Clinical application of glucagon-like Peptide 1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus [J]. Endocrinol Metab, 2013, 28(4): 262-74.

- [5] Mansur S , Mieczkowska A , Bouvard B , et al. Stable incretin mimetics counter rapid deterioration of bone quality in type 1 diabetes mellitus [J]. *J Cell Physiol* 2015 230(12) : 3009 – 18.
- [6] Pereira M , Jeyabalan J , Jorgensen C , et al. Chronic administration of Glucagon – like peptide-1 receptor agonists improves trabecular bone mass and architecture in ovariectomised mice [J]. *Bone* , 2015 81: 459 – 67.
- [7] Yang L , Yang J , Pan T , et al. Liraglutide increases bone formation and inhibits bone resorption in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *J Endocrinol Invest* 2019 42(9) : 1125 – 31.
- [8] 程 韶 舒 冰 赵永见 等. 氧化应激对骨重建的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志* 2019 25(10) : 1478 – 82.
- [9] 祝海宝 郭定宗 杨世锦 等. 糖皮质激素对家兔血清氧自由基的影响 [J]. *中国兽医学报* 2009 29(3) : 315 – 7.
- [10] Yoo B H , Wu X , Derouet M , et al. Hypoxia-induced downregulation of autophagy mediator Beclin 1 reduces the susceptibility of malignant intestinal epithelial cells to hypoxia-dependent apoptosis [J]. *Autophagy* , 2009 5(8) : 1166 – 79.
- [11] Yao W , Dai W , Jiaug J X , et al. Glucocorticoids and osteocyte autophagy [J]. *Bone* 2013 54(2) : 279 – 84.
- [12] 吴艳萍 王 阳 李雅丽 等. 氧化应激与自噬 [J]. *动物营养学报* 2016 28(9) : 2673 – 80.
- [13] She C , Zhu L , Zhen Y , et al. Activation of AMPK protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and NADPH maintenance: new implications for osteonecrosis treatment [J]. *Cell Signal* 2014 26(1) : 1 – 8.
- [14] Hua Y , Perry N , Huang C , et al. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* , 2009 , 296(2) : H470 – 9.
- [15] Nagy P , Kovcs L , Sandorg O , et al. Stem cell-specific endocytic degradation defects lead to intestinal dysplasia in *Drosophila* [J]. *Dis Model Mech* 2016 9(5) : 501 – 12.

## Liraglutide relieves glucocorticoid osteoporosis in rats through autophagy and improvement of oxidative stress

Yang Jing , Yang Lina , Ding Tingting , et al

( Dept of Endocrinology , The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601 )

**Abstract Objective** To investigate the effects of liraglutide on glucocorticoid-induced osteoporosis rats and the possible mechanism. **Methods** Thirty healthy 8-week-old male SD rats were randomly divided into normal control group , dexamethasone group , and dexamethasone + liraglutide intervention group. After 12 weeks of intervention , BMD and bone microstructure were measured by Micro-CT. The kits were used to detect the content of reactive oxygen species ( ROS ) , superoxide dismutase ( SOD ) and malondialdehyde ( MDA ) in bone tissue , Western blot was used to detect autophagy specific protein Beclin-1 , Atg5 , p62 / SQSTM1W and Map1-LC3-II expression level. **Results** In the dexamethasone group , the bone density ( BMD ) , trabecular bone volume ratio ( BV/TV ) , trabecular bone volume ( Tb. N ) , trabecular bone thickness ( Tb. Th ) , and bone size of the distal femur Beam spacing ( Tb. Sp ) and trabecular bone connection density ( Conn. D ) were lower than those in the control group. The content of oxidative stress products ROS and MDA in bone tissue increased , the antioxidant enzyme SOD activity was reduced , and the expression levels of autophagy related proteins Beclin-1 , Atg5 and Map1-LC3-II increased , and the expression level of p62/SQSTM1W protein decreased ( all  $P < 0.05$  ) . Bone density and bone microstructure of rats in the liraglutide intervention group were improved , ROS and MDA content in bone tissue reduced , antioxidant enzyme SOD activity was increased , and the expression levels of autophagy-related proteins Beclin-1 , Atg5 , and Map1-LC3-II decreased , and the expression level of p62/SQSTM1W protein increased ( all  $P < 0.05$  ) . **Conclusion** Liraglutide can improve osteoporosis caused by glucocorticoids , and its mechanism may be related to adjusting autophagy and improving oxidative stress.

**Key words** glucocorticoid-induced osteoporosis; liraglutide; autophagy; oxidative stress