

γ -氨基丁酸改善高脂膳食小鼠的骨性能

田英杰¹, 孙进^{1,2}, 谢振兴¹, 马玉华¹, 乐国伟^{1,2}, 施用晖^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 探讨了高脂膳食小鼠补充 γ -氨基丁酸(GABA)对骨性能的影响。40 只 6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠, 随机分成 4 组: 正常日粮组(control), 高脂日粮组(HFD), 高脂日粮小鼠饮水补充 0.06、0.12 g/dL GABA 组。试验结束前一周收集各组小鼠尿液, 测定钙及羟脯氨酸含量; 第 20 周结束试验, 测定小鼠股骨、胫骨参数, 以及股骨氧化还原指标, 荧光定量 PCR 检测相关基因表达。结果显示, 与对照组相比, HFD 组股骨出现氧化应激, 股骨 GAD65 显著下调、GABABR 显著上调($P < 0.05$), GSK3 β 显著上调而 Nrf2 显著下调($P < 0.05$); 股骨和胫骨钙含量、骨强度等相关性能指标显著降低, 尿钙及羟脯氨酸含量显著增高, 且成骨细胞分化标志基因 *BGLAP2*、*col1a1* 显著下调, 破骨细胞分化标志基因 *RANKL/OPG*、*CTSK*、*TRAP* 显著上调 ($P < 0.05$)。补充 0.06、0.12 g/dL GABA 可恢复 GABABR、GSK3 β 、Nrf2 表达($P < 0.05$), 减轻股骨氧化损伤, 同时平衡骨细胞分化及代谢, 提高股骨和胫骨性能。结果表明, GABA 可调节股骨氧化还原状态, 平衡骨代谢, 改善股骨及胫骨性能; 0.12 g/dL GABA 改善股骨氧化应激和股骨性能的作用优于 0.06 g/dL 的。

关键词: γ -氨基丁酸; 骨性能; 高脂日粮; 氧化应激; 小鼠

中图分类号: R 151.2 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)03—0267—07

Effect of γ -Aminobutyric Acid on Bone Performance in High-Fat-Diet-Fed Mice

TIAN Yingjie¹, SUN Jin^{1,2}, XIE Zhenxing¹, MA Yuhua¹, LE Guowei^{1,2}, SHI Yonghui^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. The State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This manuscript was aimed to investigate the effect of γ -aminobutyric acid on bone performance in high-fat-diet-fed mice. For this, 6-week-old C57BL/6 male mice (40) were randomly divided into four groups: normal diet group (C), high-fat diet group (HFD), mice in HFD supplemented with 0.06%, 0.12% GABA by drinking water. A week prior to sacrifice, mice were placed in metabolism cages to collect urine for measuring urinary calcium and hydroxyproline content. Mice were sacrificed by 20th, femur, tibia were collected for measuring parameters, femoral oxidative stress and relative genes expression by RT-PCR. The results demonstrated compared with

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD33B05); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 施用晖(1955—), 女, 上海人, 农学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事营养代谢调控研究。E-mail: yshih2009@126.com

the control group, HFD showed femoral oxidative stress, down-regulated GAD65 and increased GABAbR1 expression as well as dramatically significantly up-regulated GSK3 β and down-regulated Nrf2; In addition, mice in HFD showed significantly reduced femoral and tibial performance, while dramatically increased urinary calcium and hydroxyproline content. At the same time, osteoblast-specific genes Col1a1, BGLAP2 significantly down-regulated while osteoclast-specific genes expression RANKL/OPG, TRAP, CTSK increased significantly in HFD. 0.06%, 0.12% GABA supplement can significantly recovered GSK3 β , Nrf2, GABAbR1 expression, alleviated femoral oxidative stress, and thus improved femur and tibia performance accompanied by balanced bone metabolism. Conclusion: GABA can balance bone metabolism and partially recover bone performance by alleviating oxidative stress. 0.12% GABA showed a better effect than 0.06% in adjusting femoral redox state and improving bone performance.

Keywords: γ -aminobutyric acid, bone performance, high-fat diet, oxidative stress, mice

长期高脂膳食饲喂小鼠, 伴随着肥胖发生, 小鼠股骨出现氧化应激并诱发骨代谢失衡, 股骨矿物质含量及骨强度显著下降^[1-2]。 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸, 给高脂膳食小鼠补充 GABA 可抑制肥胖的发生和发展, 调节异常血糖^[3], 减轻体内氧化应激^[4]; 且用一定剂量 GABA 饲喂去卵巢大鼠可显著提高成骨细胞分化相关基因表达^[5]。但 GABA 是否对高脂膳食下氧化应激介导的异常骨代谢及骨性能具有调节作用尚不清楚。GSK3 β 是抗氧化核转录因子 Nrf2 的负调节蛋白质^[6-7], 而 GABA-B 型受体 (GABAbR) 参与抑制 GSK3 β 活性^[8], 可能间接利于 Nrf2 入核发挥抗氧化作用。体外试验证实, 成骨细胞可表达 GABAbR^[9], 然而 GABA 是否在骨组织中通过该受体激活 Nrf2 抗氧化系统尚未见研究报道。本课题旨在研究 GABA 能否通过减轻氧化应激改善骨代谢、提高骨性能, 并探讨 GABA 发挥抗氧化作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

GABA, 纯度 99%, sigma 公司产品; Trizol 裂解液, 美国 Biomiga 公司产品; M-MLV 逆转录酶, 5 $\times$ 逆转录缓冲液, RNase Inhibitor, dNTPs, TaqDNA 聚合酶, 大连宝生物工程有限公司产品; DEPC, Genaray Biotech 公司产品; 荧光染料 SBY, Bioneer 公司产品; 基因引物, 上海捷瑞生物工程有限公司合成; 还原性谷胱甘肽 (GSH) 和氧化性谷胱甘肽 (GSSG) 标

准品, 购于中国医药集团化学试剂有限公司; 丙二醛 (MDA), 总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 购自南京建成生物公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 试验动物及样本制备

40 只 6 周龄清洁级 C57BL/6 雄性小鼠, 合格证号 SCXK (沪) 2007-0005, 上海斯莱克动物有限责任公司提供, 初始体质量 18~20 g。正常日粮预饲 1 周后随机分为 4 组: 正常日粮组 (control); 高脂日粮组 (HFD), 给予纯水饮用; 高脂日粮小鼠饮水补充 0.06、0.12 g/dL GABA 组, 同文献[4]。正常饲料和高脂饲料配方见表 1。小鼠同室分笼饲养, 自由采食饮水, 室内温度 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、湿度 60%, 给予 12 h/12 h 白天-夜晚循环光照。

试验第 19 周, 连续 3 天收集小鼠尿液, 用于测定钙和羟脯氨酸含量; 于试验第 20 周, 将各组小鼠禁食 12 h, 乙醚麻醉后处死小鼠, 迅速取小鼠股骨、胫骨去除附着组织, 取左腿股骨头置于 Trizol 中用于总 RNA 提取, 剩余部分匀浆后拟测定氧化还原指标; 同时取右腿股骨、胫骨保存于 -80 $^{\circ}$ C, 用于股骨、胫骨性能指标测定。所有试验操作均按照江南大学实验动物管理和使用委员会的指导规则进行。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 股骨、胫骨性能参数测定 骨长度 (femoral length, cm): 用游标卡尺测定股骨、胫骨长度; 骨强度 (femoral strength, N): 将股骨、胫骨分别置于质构仪上 (Stable Micro System, 英国), 固定两端股骨头, 加载速度 2 mm/s, 股骨断裂以后, 计算机界面上显

表 1 饲料配方
Table 1 Composition of diets

成分	质量分数/%		成分	质量分数/%	
	正常日粮	高脂日粮		正常日粮	高脂日粮
玉米淀粉	61.20	45.67	氯化钠	0.20	0.20
酪蛋白	20.54	20.54	纤维素	5.12	5.12
麦芽糊精	5.10	5.10	维生素预混剂 ¹⁾	0.02	0.02
磷酸氢钙	1.02	1.02	矿物质预混剂 ²⁾	0.06	0.06
赖氨酸	0.28	0.28	氯化胆碱	0.10	0.10
蛋氨酸	0.30	0.30	蔗糖	0.10	0.10
磷酸钙	1.34	1.34	猪油	4.62	20.15

注:1)维生素预混剂(mg/kg):硫胺素 6;VB₂ 6;VB₆ 7;烟酸 30;泛酸 16;叶酸 2;VB₁₂ 0.01;VK 2;生物素 0.2;VD₃ 0.025;VA 1.2;VE 50。2)矿物质添加剂(mg/kg):Mn 53.7;Fe 53.7;Se 0.11;Cu 6.45;Zn 32.09;I 0.32。

示载荷变形曲线,获得最大载荷值;股骨、胫骨干质量(g):105 ℃烘干至恒质量;灰分(BMC,mg):将样品置于马弗炉(SX-4-10 型箱式电阻炉控制箱,天津市泰斯特仪器有限公司制)500 ℃灰化至恒质量,测定灰分质量;钙质量分数(femoral Ca content,mg/g):灰分加入浓盐酸,煮沸 10 min,定容至 10 mL,采用 EDTA 滴定法测定钙质量分数,结果以 mg/g 计量;计算骨骼指数:骨骼指数(mg/mm)=骨干质量/骨长度,能够反映骨密度。

1.3.2 尿液钙及羟脯氨酸含量测定 尿液中钙、羟脯氨酸(hydroxyproline,HOP)含量和肌酐(creatinine,Cr)含量检测,严格按照南京建成试剂盒说明书操作。

1.3.3 股骨氧化还原状态测定 MDA(nmol/mg)采

用硫代巴比妥酸法测定,SOD 活力(U/mg)采用黄嘌呤氧化酶法测定,T-AOC(U/mg)采用菲啉类络合物比色法测定,以上测定均严格按照南京建成试剂盒说明书操作;组织蛋白质采用考马斯亮蓝法测定,GSH 和 GSSG 含量采用荧光比色法(SpectraMax M5/M5e 酶标仪,Molecular Devices 公司制)测定。

1.3.4 实时荧光相对定量 PCR 分析 提取股骨头的总 RNA,测定 260 nm/280 nm 吸光度比值 1.8~2.0(one-drop spectrophotometer,上海采邑生物科技有限公司提供),逆转录合成 cDNA;以 β -actin 为内参,对目的基因进行 PCR 扩增(7900HT Fast Real-time PCR 仪,美国应用系统公司制),检测模板 Ct 值进行相对定量,引物序列见表 2。股骨头总 RNA 提取方法参照文献[10]并根据试验条件改进。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 2 Sequences of primers in quantitative real-time PCR

基因代号	sense (5'-3')	antisense (5'-3')
β -actin	GGGTCAGAAGGACTCCTATG	GTAACAATGCCATGTTCAAT
Col1a1	GCTCCTCTTAGGGGCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
BGLAP2	CAGGAGGGCAATAAGCTAGTGAA	AATAGTGATACCGTAGATGCGTTTGT
ctsk	TGTGACCGTGATAATGTGAACCAT	CCGCAGGCGTTGTCTTATT
TRAP	CACTCCCACCCTGAGATTTGT	CATCGTCTGCACGGTTCTG
RANKL	CAGCATCGCTCTGTTCTCTGTA	CTGCGTTTTTCATGGAGTCTCA
OPG	ACCCAGAAACTGGTCATCAGC	CTGCAATACACACACTCATCACT
GAD65	CTTCTGGTTTGTACCTCC	ATACTCCATCATTTCTGGC
GAD67	CAAACCTACGGGCATAGA	GAGGTAGCCTGCACACAT
GABA _b R1	GTCTGGTTTCTCATCGGGTGGA	CAGCCGCTTGTTAGTTTCTCC
GSK3 β	TTGGACAAAGGCTTCCGGCCC	TGCAGGTGTCTCTCGCCCAT
Nrf2	AGCACATCCAGACAGACACCACT	TTCAGCGTGGCTGGGGATAT

1.4 数据处理

数据整理后采用 SPSS 统计软件中 one-way ANOVA 进行差异显著性检验分析。试验数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,显著性水平为 $P<0.05$ 。采用 Pearson 相关系数分析两变量之间的相关性,得到相关系数及显著性。

2 结果

2.1 GABA 对高脂膳食小鼠股骨、胫骨性能的影响

由表 3 可知,饮食干预 20 周,HFD 组体质量显著高于对照组,而 0.06、0.12 g/dL GABA 组体质量显著降低($P<0.05$);与对照组相比,HFD 组股骨长度、干质量、灰分、钙含量、骨骼指数以及骨强度均显著下降($P<0.05$);胫骨长度、灰分、钙含量、骨强度

均显著低于正常膳食小鼠,提示 HFD 组伴随着肥胖发生,股骨及胫骨性能下降。相对 HFD 组,0.06 g/dL GABA 组股骨长度显著增长($P<0.05$),干质量、灰分、钙含量、骨骼指数、骨强度分别增加 4.60%、12.84%、4.29%、5.92%、9.71%($P>0.05$),同时胫骨长度、钙含量、骨强度显著提高($P<0.05$),灰分增加 10.20%($P>0.05$);而 0.12 g/dL GABA 组股骨干质量、灰分、骨骼指数分别提高 4.82%、12.17%、8.71%($P>0.05$),股骨长度、钙含量、骨强度显著提高($P<0.05$),同时胫骨钙含量显著增加、骨强度显著增强($P<0.05$),胫骨灰分增加 10.29%($P>0.05$),表明饮水补充 GABA 在抑制高脂膳食小鼠肥胖发生的过程中,可提高股骨及胫骨性能。其中,0.12 g/dL GABA 组对体质量和股骨性能干预作用优于 0.06 g/dL 组的。

表 3 各组小鼠股骨、胫骨参数($\bar{X}\pm s$)

Table 3 Femur and tibia parameters of mice in different groups($\bar{X}\pm s$)

测定项目	对照组	HFD 组	HFD+GABA 组	
			0.06 g/dL	0.12 g/dL
体质量/g	27.03 $\pm$ 0.92 ^a	33.23 $\pm$ 3.63 ^c	30.52 $\pm$ 1.81 ^b	28.97 $\pm$ 1.74 ^b
股骨				
股骨长度/mm	16.44 $\pm$ 0.17 ^b	15.85 $\pm$ 0.30 ^a	16.19 $\pm$ 0.25 ^b	16.32 $\pm$ 0.34 ^b
干质量/mg	52.88 $\pm$ 1.14 ^b	46.72 $\pm$ 3.95 ^a	48.87 $\pm$ 5.19 ^{ab}	48.97 $\pm$ 4.73 ^{ab}
股骨钙/(mg/g)	140.42 $\pm$ 9.09 ^b	127.79 $\pm$ 4.83 ^a	133.27 $\pm$ 8.39 ^{ab}	139.19 $\pm$ 8.21 ^b
BMC/mg	34.68 $\pm$ 0.91 ^b	29.91 $\pm$ 2.93 ^a	33.75 $\pm$ 4.05 ^{ab}	33.55 $\pm$ 3.64 ^{ab}
股骨指数/(mg/mm)	3.20 $\pm$ 0.06 ^b	2.87 $\pm$ 0.22 ^a	3.04 $\pm$ 0.26 ^{ab}	3.12 $\pm$ 0.26 ^{ab}
股骨强度/N	21.02 $\pm$ 1.15 ^b	17.72 $\pm$ 1.15 ^a	19.44 $\pm$ 1.54 ^{ab}	20.55 $\pm$ 1.42 ^b
胫骨				
股骨长度/mm	18.25 $\pm$ 0.30 ^c	17.93 $\pm$ 0.11 ^a	18.09 $\pm$ 0.14 ^{bc}	18.00 $\pm$ 0.09 ^{ab}
干质量/mg	39.82 $\pm$ 2.22	36.38 $\pm$ 2.51	38.12 $\pm$ 3.83	39.07 $\pm$ 3.54
股骨钙/(mg/g)	151.65 $\pm$ 23.11 ^b	125.88 $\pm$ 17.56 ^a	153.54 $\pm$ 13.01 ^b	146.22 $\pm$ 19.29 ^b
BMC/mg	26.12 $\pm$ 0.90 ^b	23.14 $\pm$ 1.85 ^a	25.50 $\pm$ 2.76 ^{ab}	25.52 $\pm$ 2.75 ^{ab}
股骨指数/(mg/mm)	2.20 $\pm$ 0.09	2.07 $\pm$ 0.15	2.11 $\pm$ 0.20	2.17 $\pm$ 0.19
股骨强度/N	14.44 $\pm$ 0.77 ^b	12.90 $\pm$ 0.94 ^a	14.62 $\pm$ 1.08 ^b	14.46 $\pm$ 1.12 ^b

注:表内数值上标相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$),下表同。

2.2 GABA 对高脂膳食小鼠尿液钙、羟脯氨酸含量的影响

骨转换时产生的生物代谢标志物能够用来预测骨量丢失的速率并评估骨折风险^[11],其中羟脯氨酸是胶原蛋白特有降解产物,尿液中钙含量也与绝经后妇女的骨密度呈显著负相关^[12]。图 1 表明,

HFD 小鼠尿液中羟脯氨酸和钙含量显著高于正常膳食小鼠,反映肥胖小鼠体内较强的骨分解活动。相较于 HFD 组,0.06 g/dL、0.12 g/dL GABA 组的尿钙、羟脯氨酸含量降低至与对照组无显著差异($P>0.05$),反映出一定剂量 GABA 可抑制高脂膳食下异常活跃的骨基质分解活动。

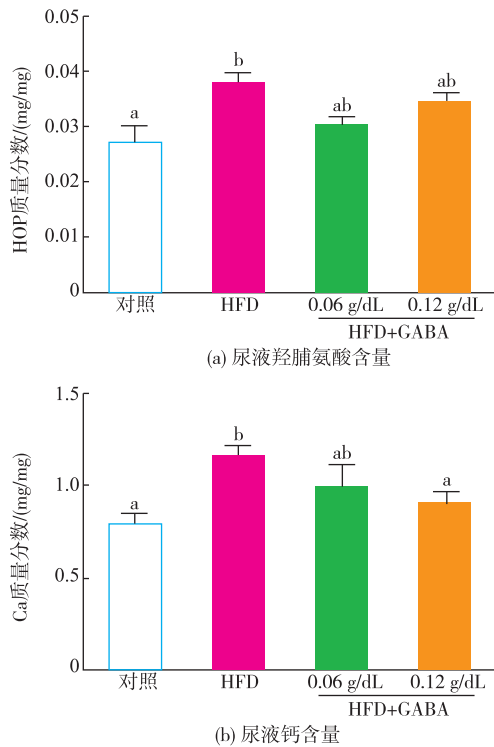
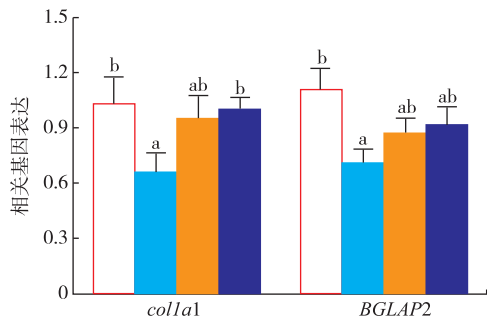


图1 各组小鼠尿液中羟脯氨酸和钙含量

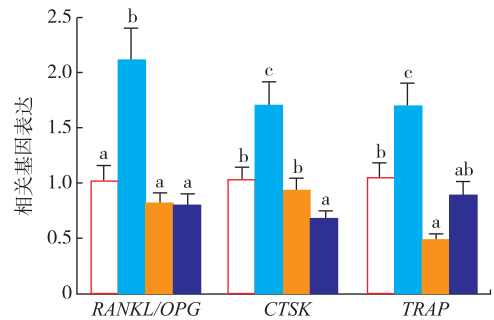
Fig. 1 Urinary HOP and calcium content in different groups

2.3 GABA对高脂膳食小鼠骨细胞分化的影响

图2表明,HFD组股骨 *RANKL/OPG*、*CTSK*、*TRAP* 比对照组显著上调 ($P<0.05$), *Col1a1*、*BGLAP2* 表达显著下降 ($P<0.05$), 反映出 HFD 小鼠体内成骨细胞分化受抑制、破骨细胞分化作用增强。饮水补充 0.06 g/dL、0.12 g/dL GABA 组 *RANKL/OPG*、*CTSK*、*TRAP* 显著下调 ($P<0.05$), *Col1a1*、*BGLAP2* 表达上升且与对照组无显著差异。由此推断,GABA 可通过在分子水平调控成骨细胞和破骨细胞相关基因表达,维持骨代谢平衡。



(a) 成骨细胞标志基因表达



(b) 破骨细胞标志基因表达

图2 成骨细胞和破骨细胞分化标志基因表达

Fig. 2 Osteoblast- and osteoclast-specific genes expression

2.4 GABA对高脂膳食小鼠股骨氧化还原状态的影响

如表4所示,HFD组相较于对照组 GSH/GSSG 比值显著下降,T-AOC、SOD 显著降低,MDA 含量上升 ($P<0.05$)。相对 HFD 组,0.06 g/dL GABA 组股骨 MDA 含量显著降低 ($P<0.05$),GSH/GSSG 比值上升 ($P>0.05$);0.12 g/dL GABA 组 GSH/GSSG 比值显著上升,T-AOC 显著提高,同时氧化损伤 MDA 含量显著降低 ($P<0.05$)。表明外源性 GABA 进入体内,能够改善股骨氧化还原状态,且 0.12 g/dL 作用优于 0.06 g/dL 的。

表4 各组小鼠股骨氧化还原状态 ($\bar{X} \pm s$)

Table 4 Femoral oxidative redox status of mice in different groups ($\bar{X} \pm s$)

项目	对照组	HFD 组	HFD+GABA 组	
			0.06 g/dL	0.12 g/dL
GSH/GSSG	0.40±0.03 ^b	0.36±0.04 ^a	0.38±0.02 ^{ab}	0.41±0.02 ^b
T-AOC	2.12±0.12 ^b	1.48±0.95 ^a	1.56±0.20 ^a	2.09±0.24 ^b
SOD	10.58±0.90 ^b	8.54±0.71 ^a	8.41±1.72 ^a	8.87±1.42 ^{ab}
MDA	2.01±0.17 ^a	2.53±0.45 ^b	1.81±0.30 ^a	1.78±0.29 ^a

2.5 GABA对高脂膳食小鼠 GABA 信号分子和 GSK3 β /Nrf2 表达的影响

如图3所示,与对照组相比,HFD组 *GAD67* 下调 ($P>0.05$),*GAD65* 显著下调 ($P<0.05$),*GABA_bR1* 异常上调 ($P<0.05$),推测高脂膳食小鼠对 GABA 存在需求;同时,HFD组小鼠股骨 GSK3 β 表达比正常小鼠显著上调,*Nrf2* 表达显著下调 ($P<0.05$),表明 HFD 组 *Nrf2* 抗氧化系统抵抗氧化应激能力下降。而相对 HFD 组,补充 0.06 g/dL、0.12 g/dL GABA 组 *GABA_bR* 表达显著恢复至正常水平 ($P<0.05$),

GAD65 不同程度提高,同时股骨 *GSK3 β* 和 *Nrf2* 表达恢复正常水平。

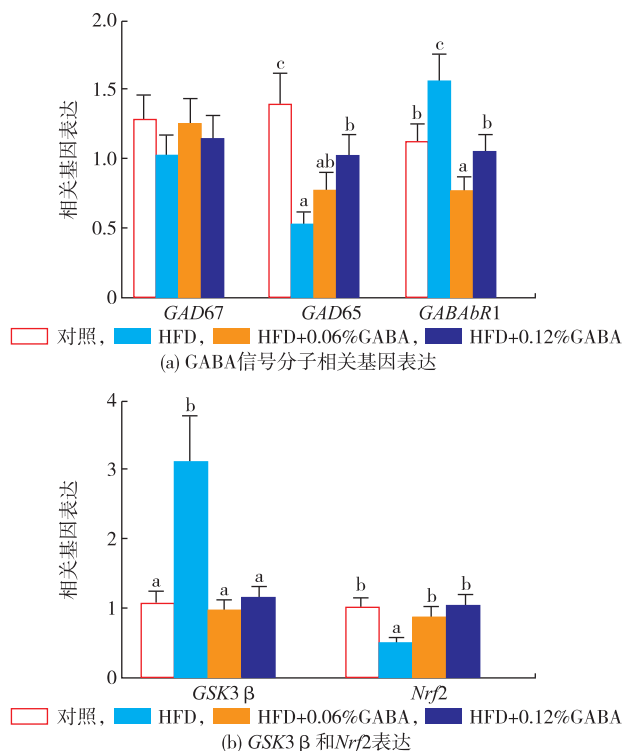


图3 *GAD*、*GABAbR1* 和 *GSK3 β* 、*Nrf2* 表达

Fig. 3 Expression of *GAD*, *GABAbR1* and *GSK3 β* , *Nrf2*

2.6 相关性分析

相关性分析可知, 股骨 MDA 与股骨钙含量 ($r=-0.422$)、骨骼指数 ($r=-0.526$)、骨强度 ($r=-0.406$) 显著负相关 ($P<0.05$), 与股骨长度 ($r=-0.503$) 极显著负相关 ($P<0.01$); T-AOC 与股骨长度 ($r=0.494$)、骨骼指数 ($r=0.460$)、灰分 ($r=0.553$)、骨强度 ($r=0.471$) 显著正相关 ($P<0.05$); GSH/GSSG 与股骨长度 ($r=0.807$)、钙含量 ($r=0.562$) 极显著正相关 ($P<0.01$), 表明氧化应激是股骨性能下降的重要原因。同时, *GAD65* 与 *Nrf2* 极显著正相关 ($r=0.624$, $P<0.01$), *GABAbR1* 与 *GSK3 β* ($r=0.585$) 极显著正相关, 与 *Nrf2* ($r=-0.568$) 极显著负相关 ($P<0.01$), 表明 GABA 信号异常可能是 *Nrf2* 表达下调的重要原因。

3 讨论

已有研究证实, 高脂膳食下氧化应激会导致动物体内骨代谢失衡、股骨性能下降^[1-2]。本研究结果表明, 饮食干预第 20 周, HFD 组股骨出现严重氧化应激, 尿钙及羟脯氨酸含量显著高于对照组且股骨

及胫骨性能下降, 这与前人研究结果基本一致。体外试验证实, GABA 能够捕获脂肪氧化过程中的中间产物, 并直接与 MDA 反应生成荧光或非荧光产物, 从而减少 MDA 生成量^[13]; 体内试验进一步证实, 外源 GABA 可提高机体抗氧化酶活, 减轻氧化损伤^[4]。本试验结果显示, 补充 0.06、0.12 g/dL GABA 能够不同程度改善股骨氧化还原状态, 同时显著降低尿钙和羟脯氨酸含量, 使股骨及胫骨相关性能参数恢复至正常水平; 其中, 补充 0.12 g/dL GABA 作用优于补充 0.06 g/dL 的。相关性分析表明, 抗氧化物质 GSH/GSSG、T-AOC 与股骨相关性能指标存在显著或极显著正相关, MDA 与股骨相关性能指标显著负相关。由此推断, GABA 可能通过减轻高脂膳食小鼠股骨氧化应激, 平衡骨代谢, 提高股骨和胫骨性能。本研究进一步从分子水平证实, HFD 组骨细胞分化失衡, 而补充 GABA 可平衡骨细胞分化, 即提高成骨细胞分化标志基因 *col1a1*、*BGLAP2* 表达, 降低 *RANKL/OPG* 比值及破骨细胞分化标志基因 *TRAP*、*CTSK* 表达, 这在一定程度上解释了 GABA 平衡骨代谢、提高骨性能的分子机制。

GABA 具有减轻股骨氧化应激的作用, 可能与成骨细胞表达的 *GABAbR* 有关。*Nrf2* 是骨组织中抵抗氧化应激的重要核转录因子^[14], 通过进入细胞核与抗氧化反应元件 ARE 结合, 启动 II 相抗氧化酶表达^[15]。长期氧化应激会激活 *GSK3 β* , 进而磷酸化相关激酶导致 *Nrf2* 出核降解^[7]。而相关研究证实, *GABAbR* 介导的生理功能可促进 *GSK3 β* 磷酸化失活^[8], 这可能间接有利于 *Nrf2* 入核。本试验中, HFD 组股骨 *GAD65* 比对照组显著下调, *GABAbR* 表达显著上调 ($P<0.05$), 推测 GABA 可能合成不足, 骨组织微环境中 GABA 浓度过低; 给高脂膳食小鼠补充一定剂量 GABA 后, 相对 HFD 组, *GABAbR* 表达恢复至正常水平, 可能外源性 GABA 进入机体补充其生理浓度, 满足了股骨需求。有研究指出, 高糖环境下胰岛 β 细胞游离 ATP 水平增加, 抑制 *GAD65* 表达, 释放的 GABA 水平降低^[16]。高脂膳食小鼠股骨 *GAD65* 表达水平下降可能与机体异常糖脂代谢相关, 作用机制有待进一步探讨。伴随着高脂膳食小鼠股骨 *GABAbR* 显著上调, *GSK3 β* 表达未被抑制, 可能该受体高表达是机体代偿性表现, 并非 GABA 信号活跃; 而补充 GABA 后伴随着股骨 *GABAbR* 表达恢复正常, *GSK3 β* 下调, *Nrf2* 表达上调, 可能此时

GABABR 介导外源 GABA 对 *GSK3 β* 的正常抑制作用,间接提高 *Nrf2* 表达。相关性分析表明,GABA 信号分子 *GAD65*、*GABABR* 和 *GSK3 β* 、*Nrf2* 存在相关,表明干预异常 GABA 信号分子表达可能有利于 *Nrf2* 表达恢复。

4 结 语

研究表明,GABA 可改善股骨氧化还原状态,从

分子水平干预骨细胞分化,平衡骨代谢,提高股骨及胫骨性能;0.12 g/dL GABA 改善股骨氧化应激和股骨性能的作用优于 0.06 g/dL;GABA 可恢复 *GABABR* 表达,抑制 *GSK3 β* 和提高 *Nrf2* mRNA 表达水平,而其对 *Nrf2* 的促进作用是否通过 *GABABR* 抑制 *GSK3 β* 实现,有待进一步证实。总之,GABA 在干预骨质疏松方面具有潜在的生理功能和应用前景。

参考文献:

- [1] Xiao Y, Cui J, Li Y X, et al. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity[J]. **Nutrition**, 2011, 27(2): 214-220.
- [2] Pirih F, Lu J, Ye F, et al. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength[J]. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2012, 27(2): 309-318.
- [3] Tian J, Dang H N, Yong J, et al. Oral treatment with γ -aminobutyric acid improves glucose tolerance and insulin sensitivity by inhibiting inflammation in high fat diet-fed mice[J]. **PloS One**, 2011, 6(9): e25338.
- [4] Xie Z, Xia S, Le G W. Gamma-aminobutyric acid improves oxidative stress and function of the thyroid in high-fat diet fed mice [J]. **Journal of Functional Foods**, 2014(8): 76-86.
- [5] Muhammad S I, Maznah I, Mahmud R, et al. Upregulation of genes related to bone formation by γ -amino butyric acid and γ -oryzanol in germinated brown rice is via the activation of GABAB-receptors and reduction of serum IL-6 in rats [J]. **Clinical Interventions in Aging**, 2013(8): 1259.
- [6] Rojo A I, Sagarra M R, Cuadrado A. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage; relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress[J]. **Journal of Neurochemistry**, 2008, 105(1): 192-202.
- [7] Jain A K, Jaiswal A K. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2007, 282(22): 16502-16510.
- [8] Lu F F, Su P, Liu F, et al. Activation of GABAB receptors inhibits protein kinase B/Glycogen Synthase Kinase 3 signaling[J]. **Molecular Brain**, 2012, 5(1): 41.
- [9] Takahata Y, Takarada T, Hinoi E, et al. Osteoblastic γ -aminobutyric acid, type B receptors negatively regulate osteoblastogenesis toward disturbance of osteoclastogenesis mediated by receptor activator of nuclear factor κ B ligand in mouse bone[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2011, 286(38): 32906-32917.
- [10] 朱琳玲. 骨胶原肽对高脂膳食小鼠抗氧化能力及皮肤和骨骼胶原代谢的影响[D]. 无锡: 江南大学食品学院, 2012.
- [11] Eastell R, Hannon R A. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk [J]. **Proceedings of the Nutrition Society**, 2008, 67: 157-162.
- [12] Murad R, Qadir M, Khalil R, et al. Association of Urinary calcium and phosphate with bone mineral density among postmenopausal women[J]. **Biomedica**, 2012, 28: 78-81.
- [13] Deng Y, Xu L, Zeng X, et al. New perspective of GABA as an inhibitor of formation of advanced lipoxidation end-products; its interaction with malondialdehyde[J]. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 2010(6): 318-324.
- [14] Rana T, Schultz M A, Freeman M L, et al. Loss of Nrf2 accelerates ionizing radiation-induced bone loss by upregulating RANKL [J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 2012, 53(12): 2298-2307.
- [15] Surh Y J, Kundu J K, Na H K. *Nrf2* as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals[J]. **Planta Medica**, 2008, 74: 1526.
- [16] Winnock F, Ling Z, De Proft R, et al. Correlation between GABA release from rat islet β -cells and their metabolic state[J]. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 2002, 282: 937-942.