蛋氨酸限制对高脂饮食小鼠骨骼的改善作用

郭海涛[1]，王雅楠[1]，张佳红[1]，施用晖[1]，乐国伟[*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：研究蛋氨酸限制对高脂饮食小鼠的股骨强度、氧化还原状态和微结构等骨骼生长状况的影响。将 54 只 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组：正常对照组（4%脂肪+0.86%蛋氨酸，CON）、高脂组（20%脂肪+0.86%蛋氨酸，HF）与高脂蛋氨酸限制组（20%脂肪+0.17%蛋氨酸，MR）。分别饲喂 11、22 周后，测定小鼠股骨干重、骨长度、骨密度、骨矿物质含量、骨强度与氧化还原状态，观测 22 周小鼠的股骨微结构。结果显示：22 周的 MR 小鼠体重与对照组接近；与 HF 组相比，MR 组小鼠的股骨干重、骨长度与骨矿物质含量在 11 周后显著降低（$P<0.05$），但 22 周后上述指标均提高，与 HF 组、对照组接近（$P>0.05$），且骨矿物质含量显著高于 HF 组（$P<0.05$），骨小梁厚度与松质骨体积显著增加；尽管 MR 骨强度显著低于 HF 组，但单位体重骨强度在 11 周、22 周后均显著高于 HF 组（$P<0.05$）。MR 饮食改善了骨骼氧化还原状态（$P<0.05$），增加骨矿物质含量，使单位骨强度增加，骨性能提升。由此得出结论：长期 MR 饮食可控制体重，改善骨微结构与骨性能。

关键词：小鼠；蛋氨酸限制；股骨微结构；骨量；氧化还原状态

中图分类号：S 816.11　**文章编号：**1673-1689(2019)08-0091-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.08.013

Effects of Methionine Restriction on Bone of Mice Fed with High Fat Diet

GUO Haitao[1]，*WANG Yanan*[1]，*ZHANG Jiahong*[1]，*SHI Yonghui*[1]，*LE Guowei*[1,2]

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

Abstract： To investigate the effects of methionine restricted diet on the bone strength，redox state and femur microstructure of mice. 54 mice （C57BL/6） were randomly divided into normal control group （4% fat，0.86% methionine，CON），high-fat group （20% fat，0.86% methionine，HF），and high-fat with methionine restriction（MR） group（20% fat，0.17% methionine，MR）. After 11 and 22 weeks，the femur dry weight，femur length，bone mineral density，bone mineral content，bone strength of femur and redox state were determined，and the femoral micro-structures of 22 weeks mice were observed. Results showed that the weight of MR mice at 22 weeks was similar to that of CON group. Compared with HF group，the femur dry weight，femur length and bone mineral content in MR group decreased significantly at 11 weeks （$P < 0.05$），but increased to be similar to HF group and control group（$P > 0.05$） at 22 weeks，and the bone mineral content was significantly higher than

收稿日期：2017-03-27

基金项目：国家“十二五”科技支撑计划项目（2012BAD33B05）。

*** 通信作者：**乐国伟（1956—），男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事营养代谢调控研究。E-mail：lgw@jiangnan.edu.cn

引用本文：郭海涛，王雅楠，张佳红，等. 蛋氨酸限制对高脂饮食小鼠骨骼的改善作用[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(08)：91-96.

HF group ($P < 0.05$), the trabecular thickness and cancellous bone volume increased significantly; although the bone strength of MR group was significantly lower than HF group, the bone strength/body weight at 11 and 22 weeks was higher than that of HF group ($P < 0.05$). MR diet improved the redox state of the bones ($P < 0.05$), increased the content of bone mineral, increased the bone strength/body weight and enhanced the bone quality. Conclusion: Long-term MR diet could control body weight, could improve the femoral micro-structure and the bone quality.

Keywords: mice, methionine restriction, femoral micro-structure, bone mass, redox state

随着人们膳食中糖、脂能量所占的比例不断增高,肥胖与其并发症的发病率在逐年升高[1-3]。研究表明,超重和肥胖是引起骨质疏松甚至骨折的重要因素之一[4],高脂饮食诱导的肥胖大鼠体重的增加与骨质含量和骨密度之间呈现出负相关[5]。如何防治肥胖与骨质疏松已成为重要的健康问题。

近些年来研究证实,蛋氨酸限制(Methionine restriction,MR)饮食是一种有效降低高脂饮食体重的方法[6]。但 MR 对大鼠和小鼠骨骼的作用,存在体重自身变化与骨代谢的双重作用[7]。Ables 等[7-8]经 14 周研究发现 MR 提高高脂饮食小鼠 FGF21 的表达,促进 Pparγ 的作用,增加胶原蛋白降解,使骨矿物质质量分数(Bone mineral content,BMC)和骨密度(Bone mineral density,BMD)显著降低。而 Huang 等[9]的研究指出短期 MR 饮食能显著降低大鼠骨量、股骨外在骨强度,但股骨的内在骨强度却显著提高。MR 饮食小鼠的 BMC 和 BMD 绝对量显著降低,但经过体质量校正的小鼠骨骼参数是正常的[7]。MR 饮食对小鼠骨骼生长发育状况的影响还存在争论。肥胖时增加骨骼的负荷,一定程度刺激骨骼增长,甚至出现局部的骨质增生。因此,MR 饮食对骨骼的作用不仅限于 BMC 和 BMD 等指标,需要进一步观察 MR 饮食对骨骼组织的微结构以及生物力学参数的影响,此外,MR 作为肥胖干预的膳食,有必要观察 MR 饮食的时间长短对骨骼的影响及其变化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity,T-AOC)测定试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;氧化型谷胱甘肽(GSSG)和还原型谷胱甘肽(GSH)标准品:中国医药集团化学试剂有限公司产品;其余试剂均为分析纯:中国医药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 仪器与设备

SX-4-10 型箱式电阻炉控制箱:天津市泰斯特仪器有限公司产品;超净工作台:安泰公司产品;SpectraMax M5/M5e 酶标仪:美国 Molecular Devices 公司产品;5804R 冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;XB70 制冰机:美国 GRANT 公司产品;μCT80 MicroCT:SCANCO 产品。

1.3 方法

1.3.1 实验动物与分组 4 周龄清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 54 只,初始体质量 18~20 g,购自于南京大学-南京生物医药研究院。适应性饲喂 1 周后,随机分成 3 组:对照组(4%脂肪+0.86%蛋氨酸,CON);高脂组(20%脂肪+0.86%蛋氨酸,HF);高脂蛋氨酸限制组(20%脂肪+0.17%蛋氨酸,MR)。

所有小鼠在同室分笼饲养,温度(23±2)℃,湿度 60%,给予 12 h/12 h 昼夜循环光照。小鼠自由采食饮水,每周称取一次体重。饲喂 11 周、22 周后分别对各组小鼠禁食 12 h,氟烷麻醉后处死,取股骨样品。

1.3.2 组织样品制备 在冰浴上操作,迅速取出股骨,去除股骨上多余附着肌腱组织;左腿股骨分成两段,近心端一段用预冷生理盐水制备成 10%组织匀浆液,并置于-20 ℃备用,用试剂盒测定股骨的 T-AOC、MDA 和 GSH/GSSG。22 周小鼠股骨远心端一段用于显微 CT(Micro-CT)扫描检测,测定骨体积分数(Bone volume fraction,BV/TV)、骨矿物质密度(BMD)、结构模型指数(Structure model index,SMI)、骨小梁数量(Trabecular number,Tb.N)、骨小梁厚度(Trabecular thickness,Tb.Th)和骨小梁分离度(Trabecular separation,Tb.Sp)。将 9 只小鼠右腿

的股骨取出用游标卡尺测量股骨长度,然后用于三点弯曲试验得到股骨最大荷载值即骨强度,三点弯曲试验后收集断裂的右腿股骨,将股骨放入烘箱烘干至恒重,测量骨干重;然后将股骨放入坩埚中,碳化至无烟,放入 550 ℃马弗炉中灰化 12 h,恒重,测定灰分重量(BMC)。将另外 9 只小鼠的右腿股骨放入中性福尔马林中进行固定,脱钙后,进行 HE 染色切片,观察切片中脂肪细胞和骨小梁的生长情况。

1.3.3 数据统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件分析,用 ANOVA 进行多重比较和方差分析,结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,显著水平为 $P<0.05$。

2 结果与讨论

2.1 小鼠体重和股骨的基础指标变化

实验 22 周后,与 CON 组相比,HF 组小鼠的体重显著性升高 ($P<0.05$);MR 组小鼠的体重显著低于 HF 组($P<0.05$),与对照组一致,表明 MR 饮食控制了小鼠体重的增长。11 周后,MR 组小鼠的股骨长度、骨干重、骨矿物质含量显著低于 HF 组 ($P<0.05$);22 周后,与 CON 组相比,HF 组股骨干重、长度与 BMC 没有显著差异($P>0.05$);与 HF 组相比,MR 组股骨干重和长度没有显著差异 ($P>0.05$),而 BMC 显著增加($P<0.05$)(表 1)。综上,11 周 MR 饮食,小鼠股骨长度、骨干重、骨矿物质显著降低,与 Ables 等[8]研究结果一致。但 22 周后,MR 饮食控制了小鼠肥胖,而且提高了小鼠股骨干重和矿物质沉积,股骨长度与对照组接近。

2.2 股骨生物力学指标

股骨进行的三点弯曲试验结果显示, 与 CON 组和 MR 组相比,HF 组小鼠 11 周、22 周后股骨强度显著升高($P<0.05$),经过体重校正以后,股骨强度/体重显著降低($P>0.05$);MR 组 11 周、22 周后骨强度及小鼠体重校正以后的股骨强度/体重均与对照组接近, 而股骨强度/体重显著高于 ($P<0.05$)HF 组(见表 2)。HF 组小鼠骨强度的增加是适应其体重增加的代偿性提高,经过体重校正以后,单位骨强度反而降低。与低脂肪饮食相比,大部分“西方化”饮食中糖和脂肪的含量很高,长期食用这种饮食会使体重增加,机体氧化应激水平也急剧增高[10]。在肥胖儿童体内,虽然肌肉总量较高,但是相比于同龄不肥胖的儿童来说,肥胖儿童表现出更高的骨折率[11],表明肥胖对于骨骼的发育是不利的。无论短期还是长期 MR 饮食干预都会降低股骨强度,但这些降低是相对的,单位骨强度并不会降低。骨强度并不能完全代表骨骼的生长情况,骨折的发生也不是完全由骨强度决定的,想弄清楚骨骼的生长,需要与其他骨骼指标共同说明。MR 组股骨中矿物质含量、骨组织体积和骨小梁厚度的增加, 可能是 MR 组单位骨强度提高的主要原因。

表 1 不同时期 MR 对高脂小鼠体质量,股骨长度,股骨干重和 BMC 的影响

Table 1 Effect of MR on body mass, femur length, femur dry weight and BMC of HFD fed mice in different periods

组别	体质量/g	股骨长度/mm	股骨干质量/mg	BMC/mg
对照组 11 周	23.23±0.34^{a}	14.87±0.11^{a}	37.58±0.71^{a}	23.08±0.58^{a}
HF	27.65±1.59^{b}	15.32±0.08^{b}	43.79±1.02^{b}	25.06±0.29^{a}
MR	22.6±0.24^{a}	14.82±0.14^{a}	34.16±0.97^{a}	20.12±1.06^{b}
对照组 22 周	23.27±0.54^{a}	16.00±0.099^{a}	44.03±1.43^{a}	25.51±0.61^{a}
HF	31.45±1.59^{b}	15.95±0.096^{a}	43.67±1.05^{a}	25.65±0.81^{a}
MR	23.09±0.63^{a}	15.95±0.069^{a}	44.54±0.80^{a}	28.60±0.81^{b}

注:同列表格后面的相同英文字母代表差异不显著($P>0.05$);不同字母代表有显著差异($P<0.05$)

表 2 不同时期 MR 对高脂小鼠股骨生物力学的影响

Table 2 Effects of MR on femur biomechanical peoperties of HFD fed mice in different periods

组别	骨强度/N	单位骨强度/(N/g)
对照组 11 周	13.27±0.98^{a}	65.14±2.75^{a}
HF 组	17.64±0.82^{b}	60.05±1.14^{a}
MR 组	12.59±0.69^{a}	64.14±1.57^{a}
对照组 22 周	15.16±1.09^{a}	67.00±2.83^{b}
HF 组	19.32±0.72^{b}	61.43±2.07^{a}
MR 组	16.13±0.71^{a}	69.86±1.99^{b}

注:差异显著性同表 1

2.3 股骨远心端松质骨 Micro-CT 定量参数的变化

对 22 周实验小鼠远心端股骨进行 3D 显微 CT 的结果显示,与 CON 组相比,HF 组 Tb.Th 和 BV/TV 显著降低 ($P<0.05$),Tb.Sp,SMI,Tb.N 和 BMD 均没

有显著差异(P>0.05);与 HF 组相比,MR 组的 Tb.Th 和 BV/TV 均显著增加 (P<0.05),Tb.Sp,SMI,Tb.N,BMD 没有显著差异(P>0.05)(表 3)。结果表明,长期的 MR 饮食增加了骨小梁的形成速度和厚度,股骨中骨盐沉积增多,有利于骨骼生长。而本研究结果证明在小鼠体成熟以后继续饲喂 MR 饮食一段时间,骨盐积累会增加,BMC 升高,体现了长期 MR 饮食可能转变了短期 MR 饮食对小鼠骨骼的部分不利影响。

表 3 MR 对高脂小鼠股骨远心端松质骨 Micro-CT 定量参数的影响

Table 3 Microcomputed tomography(μCT) derived cancellous bone parameters at the distal femur in MR mice

组别	骨体积分数/%	骨密度/(mg/cm^2)	结构模型指数	骨小梁数量/(1/mm)	骨小梁厚度/mm	骨小梁分离度/mm
对照组	14.67±0.97^a	824.6±7.9^a	2.12±0.13^a	4.28±0.09^a	0.052±0.03^a	0.227±0.007^a
HF 组	10.28±0.88^b	822.1±8.6^a	2.24±0.15^a	4.25±0.18^a	0.042±0.001^b	0.234±0.011^a
MR 组	15.19±1.07^a	826.7±9.6^a	2.03±0.14^a	4.29±0.03a	0.053±0.005^a	0.226±0.003^a

注:差异显著性同表 1

2.4 股骨氧化应激水平

与 CON 组相比,HF 组小鼠股骨 MDA 显著增加(P<0.05),T-AOC 显著降低(P<0.05),GSH/GSSG 无显著差异(P>0.05);与 HF 组相比,MR 组小鼠股骨 MDA 显著降低 (P<0.05),T-AOC 显著升高 (P<0.05),GSH/GSSG 无显著差异(P>0.05)。以上结果表明,高脂饮食会造成骨组织的氧化应激,HF 组表现出抗氧化能力降低,脂质过氧化,而 MR 饮食使股骨 MDA 含量显著降低,T-AOC 含量显著上升,对高脂饮食引起的机体氧化应激有很大的改善作用。氧化应激是骨质疏松的重要病因[12-13],MR 饮食对骨骼氧化应激的改善作用可能是 MR 饮食改善骨性能的重要原因之一[14-15](表 4)。

表 4 不同时期 MR 对 HFD 小鼠股骨氧化还原指标的影响

Table 4 Effect of MR on femur oxidant stress biomarkers of HFD fed mice in different periods

组别	MDA/(nmol/mL)	T-AOC/(U/mol)	GSH/GSSG
对照组 11 周	2.88±0.24^b	2.74±0.17^a	1.83±0.09^a
HF 组	4.68±0.36^a	2.18±0.08^b	1.47±0.11^b
MR 组	2.28±0.45^b	2.93±0.16^a	1.95±0.11^a
对照组 22 周	2.40±0.26^b	2.33±0.14^a	1.48±0.11^a
HF 组	4.46±0.45^a	1.89±0.18^b	1.22±0.09^b
MR 组	2.34±0.29^b	2.59±0.15^a	1.60±0.17^a

注:差异显著性同表 1

2.5 股骨 HE 染色切片

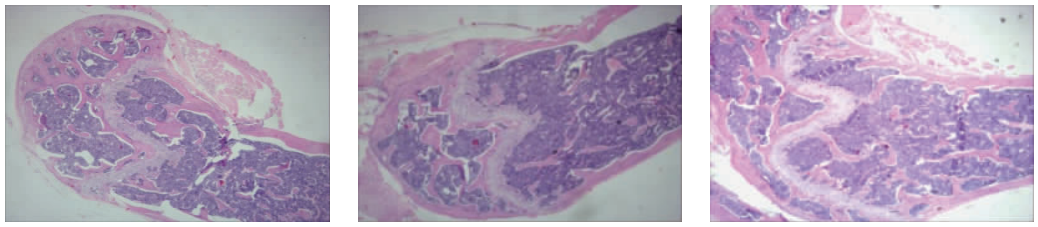
图 1 是小鼠股骨远心端 HE 染色切片,在放大 40 倍情况下,与 CON 组相比,HF 组骨小梁差异不明显,但脂肪空泡较多;MR 组与 HF 组相比,骨小梁厚度较大,骨小梁数量差别不明显,空泡显著减少,与对照组相近。表明 MR 饮食可显著减少骨骼中脂肪细胞积累。从小鼠股骨远心端 Micro-CT 扫描结果也可看出,与 CON 组相比,HF 组小鼠骨小梁网状结构松散,骨小梁变薄;而 MR 组较 HF 组,骨小梁更加紧密,网状结构排列密集,骨小梁有增厚迹象。

骨骼中脂肪细胞增多是骨量丢失的原因之一[16]。本研究通过对远心端股骨进行 HE 染色观察发现,高脂饮食刺激了骨脂肪细胞的生成,同时降低松质骨体积。可能的原因是高脂饮食可以增加骨髓间充质干细胞(MSC)向脂肪细胞分化的能力,而降低其向成骨细胞分化的能力[17],而 MR 饮食显著减少了骨组织中的脂肪空泡,松质骨体积上升,表明长期 MR 饮食可能与 MSC 向成骨细胞分化的能力上升或使其向脂肪细胞分化的能力降低。

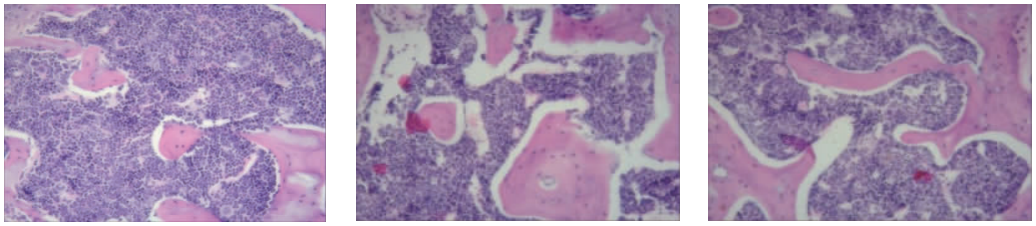
长期和短期 MR 饮食对骨骼造成不同影响的原因还可能是,小鼠处于体重快速增长期时需要的营养元素较多,蛋氨酸需求量也较多,此时若限制饮食中蛋氨酸含量可降低小鼠体重和骨骼的生长速度。小鼠处在体重增长平稳期时需要的蛋氨酸含量降低,此时继续进行 MR 饮食干预可降低机体氧化应激水平,增加骨矿含量、骨组织体积和骨小梁厚度,提高骨性能。

3 结 语

长期 MR 饮食干预限制了小鼠体重的增长与肥胖,股骨中矿物质含量增加、骨小梁增厚、骨组织增大、松质骨网状结构更加紧密,显著提高了单位



(a)对照组 40× (b)HF组 40× (c)MR组 40×



(D)对照组 200× (b)HF组 200× (c)MR组 200×

图 1 MR 对高脂小鼠股骨远心端松质骨显微结构的影响

Fig. 1 HE staining of mice distal femur in different groups

骨强度,骨骼性能得到改善。造成这些的原因可能是长期 MR 饮食降低小鼠骨骼氧化应激,股骨中脂肪细胞的含量降低。长期与短期 MR 饮食对骨骼造成的不同影响,可能是由于小鼠处于不同的体重增长期,11 周尚处于生长期,MR 可能影响骨骼生长与代谢,其具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] KAHN B B,FLIER J S. Obesity and insulin resistance[J]. **Journal of Clinical Investigation**,2000,106(4):473-481.

[2] WINZELL M S,AHREN B. The high-fat diet-fed mouse:a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes[J]. **Diabetes**,2004,53(Suppl. 3):S215-S219.

[3] LIN S,THOMAS T C,STORLIEN L H,et al. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice [J]. **International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders Journal of the International Association for the Study of Obesity**,2000,24(5):639-646.

[4] GOULDING A,JONES I E,TAYLOR R W,et al. Bone mineral density and body composition in boys with distal forearm fractures:a dual-energy x-ray absorptiometry study[J]. **The Journal of Pediatrics**,2001,139(4):509-515.

[5] PATSCH J M,KIEFER F W,VARGA P,et al. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity[J]. **Metabolism**,2011,60(2):243-249.

[6] WU G,WANG Y,YANG Y,et al. Dietary methionine restriction upregulates endogenous H2S via miR-328-3p:a potential mechanism to improve liver protein metabolism efficiency in a mouse model of high-fat-diet-induced obesity[J]. Molecular Nutrition Food Research,2018,doi:10.1002/mnfr.201800735.

[7] OUATTARA A,COOKE D,GOPALAKRISHNAN R,et al. Methionine restriction alters bone morphology and affects osteoblast differentiation[J]. **Bone Reports**,2016,5:33-42.

[8] ABLES G P,PERRONE C E,ORENTREICH D,et al. Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density[J]. **Plos One**,2012,7(12):e51357-e51357.

[9] HUANG T H,LEWIS J L,LIN H S,et al. A methionine-restricted diet and endurance exercise decrease bone mass and extrinsic strength but increase intrinsic strength in growing male rats[J]. **Journal of Nutrition**,2014,144(5):621-630.

[10] CRESCENZO R,BIANCO F,COPPOLA P,et al. Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats[J]. **Experimental Physiology**,2014,99(9):1203-1213.

[11] DIMITRI P,BISHOP N,WALSH J S,et al. Obesity is a risk factor for fracture in children but is protective against fracture in adults:a paradox[J]. **Bone**,2012,50(2):457-466.

[12] ISOMURA H,FUJIE K,SHIBATA K,et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload[J]. **Toxicology**,2004,197(2):93-100.
[13] MUTHUSAMI S,RAMACHANDRAN I,MUTHUSAMY B,et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats[J]. **Clinica Chimica Acta**,2005,360(1/2):81-86.
[14] TIAN Yingjie,SUN Jin,XIE Zhengxin. Effect of γ-aminobutyric acid on bone [J]. **Jouranal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(3):267-273.(in Chinese)
[15] OHKAWA H,OHISHI N,YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. **Analytical Biochemistry**,1979,95(2):351-358.
[16] FUJITA Y,WATANABE K,MAKI K. Serum leptin levels negatively correlate with trabecular bone mineral density in high-fat diet-induced obesity mice[J]. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**,2012,12(2):84-94.
[17] FELICE J I,GANGOITI M V,MOLINUEVO M S,et al. Effects of a metabolic syndrome induced by a fructose-rich diet on bone metabolism in rats[J]. **Metabolism Clinical & Experimental**,2014,63(2):296-305.

会　议　消　息

会议名称:中国生物工程学会第十三届学术年会暨2019全国生物技术大会

会议时间:2019年11月8-10日(11月8日报到)

会议地点:成都龙之梦大酒店

大会主题:生物技术与健康中国

主办单位:中国生物工程学会

联合主办:四川省医学科学院·四川省人民医院

大会官网:http://csbt2019.biotechchina.org/conf/index/info/1286

会议简介:为展示我国生物技术研究开发重要成果与最新进展,推动生物技术学科交叉融合,助力生物产业发展,促进生物技术各领域的交流,中国生物工程学会联合四川省医学科学院?四川省人民医院于2019年11月8-10日在四川省成都市举办第十三届学术年会暨2019全国生物技术大会。大会将邀请在生物技术领域具有重要影响的院士和国内外知名专家作大会报告,安排多个专题分会场进行学术交流,并设有成果及产品与技术展示平台,同时面向国内外相关领域专业人士征集大会论文,并颁发中国生物工程学会青年优秀论文奖。