

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001982

1 型糖尿病小鼠松质骨和皮质骨骨量下降的差异及机制研究

贺思豪¹, 陈思旭², 刘道城², 杨磊², 杨家治², 宗兆文¹

(1. 西南医科大学临床医学院, 泸州 646000; 2. 陆军军医大学第三附属医院(野战外科研究所)创伤外科, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

【摘要】目的:研究 1 型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)小鼠松质骨和皮质骨骨量下降差异并探讨其机制。**方法:**以 30 只 8 周龄 C57BL/6J 小鼠为对象, 随机分为健康对照组(wild type, WT)和 T1DM 组。T1DM 组通过注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)建立 1 型糖尿病模型, WT 组小鼠注射同等剂量生理盐水。行 Micro-CT、X 线扫描、HE 染色与骨形态计量检测分析比较 2 组小鼠骨量、成骨活动的变化。通过免疫组化与实时定量聚合酶链反应(real-time PCR, RT-PCR)检测经典 Wnt/ β -catenin 通路相关因子, 包括低密度脂蛋白受体相关蛋白-6(low-density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP-6)、 β -catenin、淋巴组织增强因子(lymphoid enhancer factor, LEF-1)、T 细胞因子(T cell factor, TCF)以及成骨细胞相关转录因子包括碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、成骨相关转录因子(osterix, Osx)、成骨细胞标志物核心结合因子(runt-related transcription factor 2, Runx2)的 mRNA 与蛋白表达水平。**结果:**观察 2 组小鼠形态学结果发现, T1DM 组小鼠股骨远端骨量下降最为明显, 而股骨中段骨量下降幅度较小。Micro-CT 重建结果显示, T1DM 小鼠松质骨指标骨体积占组织总体积百分比(BV/TV)、松质骨厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)较 WT 小鼠相比下降幅度较大[(0.16 ± 0.01) vs. (1.27 ± 0.08), (0.04 ± 0.01) vs. (0.09 ± 0.01), (1.90 ± 0.27) vs. (4.53 ± 0.45); $P < 0.01$]。而皮质骨对应指标, 单位体积内骨组织面积比(BA/TA)与皮质骨厚度(CT.Th)其降低幅度明显减小[(0.35 ± 0.05) vs. (0.40 ± 0.02), (0.17 ± 0.01) vs. (0.18 ± 0.01); $P < 0.05$]。骨组织形态计量结果显示 T1DM 小鼠较 WT 相比松质骨单位骨面积内成骨细胞表面积比值(Ob.S/BS)、单位骨面积内骨矿化面积比值(MS/BS)、骨矿化沉积率(MAR)、骨形成率(BFR)下降幅度较大[(12.15 ± 0.46) vs. (21.69 ± 0.37), (30.19 ± 1.02) vs. (38.02 ± 0.70), (0.74 ± 0.06) vs. (1.13 ± 0.10), (0.25 ± 0.02) vs. (0.48 ± 0.04), $P = 0.000$]。而皮质骨下降幅度较小分别为[(12.80 ± 0.13) vs. (16.41 ± 0.29), (36.16 ± 1.22) vs. (42.21 ± 0.54), (0.67 ± 0.34) vs. (0.83 ± 0.03), (0.27 ± 0.02) vs. (0.36 ± 0.04); $P = 0.000$]。RT-PCR 结果显示 T1DM 小鼠 Wnt/ β -catenin 通路相关因子 LRP6、 β -catenin、Tcf、LEF-1 与成骨分化指标 ALP、OCN、OSX、Runx2 的表达水平较 WT 组明显降低, 其中松质骨下降幅度较大[(0.18 ± 0.13) vs. (1.00 ± 0.13), (0.23 ± 0.20) vs. (1.00 ± 0.15), (0.29 ± 0.23) vs. (1.00 ± 0.23), (0.22 ± 0.17) vs. (1.00 ± 0.12), (0.52 ± 0.10) vs. (1.00 ± 0.00), (0.52 ± 0.11) vs. (1.00 ± 0.10), (0.42 ± 0.01) vs. (1.00 ± 0.10), (0.34 ± 0.12) vs. (1.00 ± 0.08); $P < 0.01$], 皮质骨下降幅度较小为[(0.74 ± 0.65) vs. (1.00 ± 0.07), (0.63 ± 0.45) vs. (1.00 ± 0.09), (0.75 ± 0.58) vs. (1.00 ± 0.08), (0.70 ± 0.63) vs. (1.00 ± 0.05), (0.67 ± 0.19) vs. (1.00 ± 0.23), (0.73 ± 0.08) vs. (1.00 ± 0.23), (0.63 ± 0.08) vs. (1.00 ± 0.39), (0.62 ± 0.08) vs. (1.00 ± 0.11), $P < 0.05$]。免疫组化结果与 RT-PCR 趋势一致。**结论:**T1DM 小鼠松质骨骨量下降幅度较皮质骨更显著, 其机制可能为 Wnt/ β -catenin 信号通路表达水平在松质骨下降幅度更显著。

【关键词】1 型糖尿病; 松质骨; 皮质骨; 差异; Wnt/ β -catenin**【中图分类号】**R681.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-03-08

Different degrees of reductions in bone mass of cancellous bone and cortical bone in mice with type 1 diabetes and related mechanism

He Sihao¹, Chen Sixu², Liu Daochen², Yang Lei², Yang Jiazhi², Zong Zhaowen¹

(1. School of Clinical Medicine, Southwest Medical University; 2. State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined injury, Department of Trauma Surgery, DaPing Hospital, Army Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the different degrees of reductions in bone mass of cancellous bone and cortical bone in mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM) and related mechanism. **Methods:** A total of 30 C57BL/6J mice aged 8 weeks were randomly

作者介绍: 贺思豪, Email: 372865308@qq.com,

研究方向: 主要从事骨质疏松方面研究。

通信作者: 宗兆文, Email: zongzhaowen@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190222.0909.022.html>

(2019-02-22)

divided into wild-type(WT) group and T1DM group. The mice in the T1DM group were given intraperitoneal injection of streptozotocin to establish a model of T1DM, and those in the WT group were given injection of the same dose of normal saline. Micro-CT, X-ray radiology, HE staining, and bone morphometry

were used to observe the changes in bone mass and osteogenic activity. Immunohistochemistry and real-time PCR were used to measure the mRNA and protein expression of the factors involved in the Wnt/ β -catenin pathway, including low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP-6), β -catenin, lymphoid enhancer factor (LEF-1), T cell factor (TCF), and osteoblast-related transcription factors, including alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), osteonectin (OSN), and runt-related transcription factor 2 (Runx2).

Results: According to the results of morphological examination, the T1DM group had the greatest reduction in bone mass of the distal femur and a slight reduction in bone mass of the middle femur. Micro-CT analysis revealed that compared with the WT group, the T1DM group had significant reductions in the following indices of cancellous bone: bone volume per total volume (0.16 ± 0.01 vs. 1.27 ± 0.08 , $P < 0.01$), trabecular thickness (0.04 ± 0.01 vs. 0.09 ± 0.01 , $P < 0.01$), and trabecular number (1.90 ± 0.27 vs. 4.53 ± 0.45 , $P < 0.01$); as for the corresponding indices of cortical bone, compared with the WT group, the T1DM group had significant reductions in bone area per total area (0.35 ± 0.05 vs. 0.40 ± 0.02 , $P < 0.05$) and cortical thickness (0.17 ± 0.01 vs. 0.18 ± 0.01 , $P < 0.05$). Bone morphometry showed that compared with the WT group, the T1DM group had significant reductions in the following indices of cancellous bone: osteoblast surface per bone surface (12.15 ± 0.46 vs. 21.69 ± 0.37 , $P = 0.000$), mineralizing surface per bone surface (30.19 ± 1.02 vs. 38.02 ± 0.70 , $P = 0.000$), mineral apposition rate (0.74 ± 0.06 vs. 1.13 ± 0.10 , $P = 0.000$), and bone formation rate (0.25 ± 0.02 vs. 0.48 ± 0.04 , $P = 0.000$); as for the corresponding indices of cortical bone, the T1DM group also had significant reductions in these indices compared with the WT group (osteoblast surface per bone surface: 12.80 ± 0.13 vs. 16.41 ± 0.29 , $P = 0.000$; mineralizing surface per bone surface: 36.16 ± 1.22 vs. 42.21 ± 0.54 , $P = 0.000$; mineral apposition rate: 0.67 ± 0.34 vs. 0.83 ± 0.03 , $P = 0.000$; bone formation rate: 0.27 ± 0.02 vs. 0.36 ± 0.04 , $P = 0.000$). RT-PCR showed that compared with the WT group, the T1DM group had significantly lower expression of the Wnt/ β -catenin pathway factors LRP-6, β -catenin, TCF, and LEF-1 and osteogenic differentiation indices ALP, OCN, OSN, and Runx2 in cancellous bone (0.18 ± 0.13 vs. 1.00 ± 0.13 , 0.23 ± 0.20 vs. 1.00 ± 0.15 , 0.29 ± 0.23 vs. 1.00 ± 0.23 , 0.22 ± 0.17 vs. 1.00 ± 0.12 , 0.52 ± 0.10 vs. 1.00 ± 0.00 , 0.52 ± 0.11 vs. 1.00 ± 0.10 , 0.42 ± 0.01 vs. 1.00 ± 0.10 , 0.34 ± 0.12 vs. 1.00 ± 0.08 , all $P < 0.01$) and cortical bone (0.74 ± 0.65 vs. 1.00 ± 0.07 , 0.63 ± 0.45 vs. 1.00 ± 0.09 , 0.75 ± 0.58 vs. 1.00 ± 0.08 , 0.70 ± 0.63 vs. 1.00 ± 0.05 , 0.67 ± 0.19 vs. 1.00 ± 0.23 , 0.73 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.23 , 0.63 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.39 , 0.62 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.11 , all $P < 0.05$). Immunohistochemistry showed a similar trend as RT-PCR. **Conclusion:** In T1DM mice, the reduction in cancellous bone mass is greater than that in cortical bone mass, which might be caused by the greater downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancellous bone than in cortical bone.

[Key words] type 1 diabetes mellitus; cancellous bone; cortical bone; difference; Wnt/ β -catenin

临床及动物研究表明 1 型糖尿病损害骨代谢使骨形成减少从而导致骨量降低,骨折风险增加^[1-3]。脊椎动物的骨骼由松质骨与皮质骨构成,它们在结构、力学、代谢活动方面存在差异^[4-5]。松质骨骨基质较少而骨表面积大,皮质骨则相反,因此松质骨骨基质中的骨重建信号可更好地传递到骨表面从而启动骨代谢活动^[6-8]。但目前对 1 型糖尿病松质骨与皮质骨差异性的研究还很少。

Wnt/ β -catenin 通路在骨发育与重建中扮演着重要的角色,激活 wnt/ β -catenin 信号通路可增加骨量,因此在治疗骨量降低方面有着广阔的前景^[9-11]。但 T1DM 小鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达降低,骨形成作用减弱导致其骨量降低^[12-13]。本课题组前期研究发现正常小鼠松质骨与皮质骨对 Wnt/ β -catenin 信号通路的敏感性存在差异,松质骨对 Wnt/ β -catenin 信号通路水平的变化更加敏感^[12]。本研究旨在明确 1 型糖尿病松质骨和皮质骨骨量变化是

否存在差异,并探究 Wnt/ β -catenin 信号通路对松质骨和皮质骨各自的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 30 只,体质量 (18 ± 2) g,由陆军军医大学(原第三军医大学)大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,动物批准号:SCXK(渝)2012-0010。

1.2 主要试剂

EDTA、Tris 溶液购买于上海百赛勤化学技术有限公司;一抗购于 Santa 公司;免疫组织化学试剂盒购于武汉博士德公司;5%牛血清白蛋白(BSA)、链霉亲和素、生物素一过氧化物酶复合物(SABC)、特异性二抗、显色液购于武汉博士德公司;Trizol RNA 提取试剂、逆转录试剂盒及 SYBER Premix 购于日本 Takara 公司;PCR 引物由北京六合华大基因科技公司合成;链脉霉素(streptozotocin,STZ)购于 Sigma 公司(St. Louis, MO);柠檬酸购于重庆川东化工;柠檬酸三钠购于成都

市科龙化工;小鼠血糖监测仪购于 Abbott Laboratory (North Chicago, IL)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与用药 小鼠随机分为健康对照组(wild type, WT)和 1 型糖尿病组(type1 diabetes mellitus, T1DM), 每组各 15 只。1 型糖尿病组小鼠采用 STZ 诱导为 1 型糖尿病模型, 具体方法为, 配置 50 mg/kg 的 STZ-枸橼酸钠溶液 STZ 给小鼠腹腔注射, 1 次/d, 连续 5 d。WT 组小鼠注射同等剂量生理盐水。从 STZ 末次注射后 1 周测空腹血糖 1 次, 小鼠尾静脉血糖 >15.6 mmol/L 为造模成功, 低于此值小鼠弃去。

1.3.2 标本采集与处理 STZ 诱导成功为 1 型糖尿病后 6 周取材, 取小鼠双下肢长骨于 4%多聚甲醛中固定 24 h。固定完成后, 左下肢股骨保存在 70%乙醇中用于 X 线与 Micro-CT 扫描。左下肢胫骨用 0.01 mol/L PBS 漂洗后用 15% EDTA (pH 7.2~7.4) 室温下摇床震荡脱钙用于免疫组化与 HE 染色。右下肢保存在 -80 °C 冰箱中用于提取组织 RNA。

1.3.3 Micro-CT 与 X 线扫描 保存于 70%乙醇的股骨, 采用 MX-20X 线系统行 X 线扫描(faxitron X-ray corporation)。采用瑞士 Scanco viva40 Micro-CT 扫描系统对标本进行扫描, EVS Beam 软件三维重建, 并计算松质骨体积占组织总体积的百分比(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁间距(Tb.Sp)。计算单位组织体积内皮质骨面积(BA/TA)与皮质骨厚度(CT.Th)。

1.3.4 HE 染色 标本脱钙完成后, 常规梯度酒精脱水后石蜡包埋, 石蜡切片厚度为 4 μm。HE 染色具体方法为: 利用二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水后水化。苏木精染液染色 2 min, 蒸馏水冲洗 10 s 后 1%盐酸酒精分化 15 s, 蒸馏水冲洗 1 min。0.5%伊红染液染色 1 min, 蒸馏水冲洗 10 s。梯度酒精脱水后二甲苯透明, 最后中性树胶封片。

1.3.5 组织 RNA 提取及实时定量 PCR 颈椎脱臼法处死小鼠, 75%乙醇浸泡 6 min, 放入超净工作台。切开小鼠腹部, 分离双下肢, 剥离软组织, 打开骨髓腔, 竖直放入无 RNA 酶的 Ep 管, 12 000 g 4 °C 离心 10 min 去除骨髓。将胫骨骨质分为皮质骨和松质骨, 分别加入液氮研磨。常规方法提取 RNA, 按 Takara 反转录试剂盒说明书进行逆转录后行 Real-time PCR^[14]。使用 MX3000P 定量 PCR 仪检测成骨细胞活动标志物 OSX、Runx2、ALP、OCN 以及 β-catenin、Tcf、Lrp6、Lef-1 的 mRNA 表达水平。各样本目的基因的表达强度用其对应的内参基因进行校正, 每次均设 3 个复孔。引物序列及扩增产物长度见表 1。扩增条件为 95 °C 30 s, [95 °C 5 s(变性), 57 °C 20 s(退火), 72 °C 15 s(延伸)] × 40 个循环, 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 95 °C 30 s。

1.3.6 免疫组织化学染色 将组织切片置于 60 °C 烤箱中烤片 4 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱二甲苯至水, 3%过氧化氢溶液阻断内源过氧化物酶, PBS 洗 3 次, 复合酶消化液进行抗原修复, 37 °C 修复 30 min, PBS 洗 3 次, 5%BSA 血清封闭 1 h, 吸尽封闭液, 滴加稀释一定浓度的一抗, 4 °C 过夜。次日

将切片复温, PBS 洗 3 次, 滴加相应的二抗, 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 滴加 SABC 液, 37 °C 孵育 30 min, 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色, 自来水洗, 甲基绿复染 3 min, 蒸馏水洗 2 次。梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜下观察。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物
ALP	上游 TTGTTGCTTTATGCAAACAGACG 下游 GTTCGTTTAATGGCTTCTTCGC
OC	上游 CCACCCGGGAGCAGTGT 下游 CTAAATAGTGATACCGTAGATGCCGTTTG
OSX	上游 TCTCAAGCACCAATGGACTCCT 下游 GGGTAGTCATTGTCATAGCCAGA
Runx2	上游 TTTAGGGCGCATTCCTCATC 下游 TGTCTTGTGGATTAAGGACTTG
β-catenin	上游 TCCGTTGCGCTTCATTATGGA 下游 GGCAAGGTTTCGAATCAATCC
Tcf	上游 CCTCTCTGGCTTCTACTCCCT 下游 CAGCCTGGGTATAGCTGCATGT
Lrp6	上游 TTGTTGCTTTATGCAAACAGACG 下游 GTTCGTTTAATGGCTTCTTCGC
Lef-1	上游 TGGCATCCCTCATCCAGCTAT 下游 TGAGGCTTCACGTGCATTAGG

1.4 计数分析

收集经 1.3.6 处理过的免疫组织化学切片, 免疫组织化学阳性细胞选择标准: 棕黄色颗粒特异性分布于细胞或基质, 非特异性背景显色对比明显。经 3 位病理科医师独立在光镜下完成阅片, 每人随机选择 10 个高倍视野, 计数阳性细胞占视野内细胞数的比例并记录。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 18.0 进行统计分析, 所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 检验方法使用独立样本 *t* 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 X 线与 Micro-CT 观察 T1DM 小鼠松质骨与皮质骨骨量差异情况

X 线可对小鼠骨量进行粗略评价, 股骨 X 线提示 T1DM 小鼠与 WT 组小鼠相比, 股骨远端与干骺端松质骨骨量下降最为明显。而中段骨干皮质骨骨量与 WT 组小鼠相比下降幅度较小。Micro-CT 扫描分析可准确评价骨量变化, 其重建结果显示 T1DM 小鼠松质骨指标骨体积占组织总体积百分比(BV/TV)、松质骨厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)较 WT 小鼠相比下降幅度较大[(0.16 ± 0.01) vs. (1.27 ± 0.08), (0.04 ± 0.01) vs. (0.09 ± 0.01), (1.90 ± 0.27) vs. (4.53 ± 0.45); $P < 0.01$]。

而皮质骨对应指标,单位体积内骨组织面积比(BA/TA)与皮质骨厚度(CT.Th)其降低幅度明显减小 $[(0.35 \pm 0.05) \text{ vs. } (0.40 \pm 0.02), (0.17 \pm 0.01) \text{ vs. } (0.18 \pm 0.01)]; P < 0.05]$ 。见表2、表3。



图1 X线与 Micro-CT

表2 T1DM 对小鼠皮质骨骨量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	BA/TA (%)	Ct.Th (mm)
WT组	0.40 ± 0.02	0.18 ± 0.01
T1DM组	0.35 ± 0.05	0.17 ± 0.01
<i>t</i> 值	2.607	1.996
<i>P</i> 值	0.013	0.036

表3 T1DM 对小鼠松质骨骨量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (mm)
WT组	1.27 ± 0.08	0.09 ± 0.01	4.53 ± 0.45	0.23 ± 0.02
T1DM组	0.16 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.90 ± 0.27	0.47 ± 0.02
<i>t</i> 值	13.521	9.599	12.304	-18.148
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 HE 染色及骨组织形态计量观察 T1DM 小鼠松质骨与皮质骨成骨活动差异情况

组织学观察显示 WT 组股骨干骺端骨小梁致密,小梁较宽,体积较大,数量多,小梁间距较小,小梁上分散有较多的成骨细胞,股骨干骺端骨膜较厚且排列整齐。1 型糖尿病组股骨干骺端的髓质骨骨小梁稀少或断裂,小梁间距宽度较宽,股骨干骺端骨膜较薄,排列稀疏。骨组织形态计量学结果(图

2)显示,T1DM 小鼠较 WT 组相比,松质骨单位骨面积内成骨细胞表面积比值 (Ob.S/BS)、单位骨面积内骨矿化面积比值 (MS/BS)、骨矿化沉积率 (MAR)、骨形成率 (BFR) 下降幅度较大 $[(12.15 \pm 0.46) \text{ vs. } (21.69 \pm 0.37), (30.19 \pm 1.02) \text{ vs. } (38.02 \pm 0.70), (0.74 \pm 0.06) \text{ vs. } (1.13 \pm 0.10), (0.25 \pm 0.02) \text{ vs. } (0.48 \pm 0.04), P=0.000]$ 。而皮质骨下降幅度较小分别为 $[(12.80 \pm 0.13) \text{ vs. } (16.41 \pm 0.29), (36.16 \pm 1.22) \text{ vs. } (42.21 \pm 0.54), (0.67 \pm 0.34) \text{ vs. } (0.83 \pm 0.03), (0.27 \pm 0.02) \text{ vs. } (0.36 \pm 0.04)]; P=0.000]$ 。T1DM 小鼠较 WT 组相比松质骨单位体积内成骨细胞数量 (N.Ob/T.Ar) 下降明显 $[5.34 \pm 0.23] \text{ vs. } [12.61 \pm 0.40], P=0.000]$,而皮质骨无统计学差异 $[(2.30 \pm 0.24) \text{ vs. } (2.55 \pm 0.27), P > 0.05]$,见表4、表5。

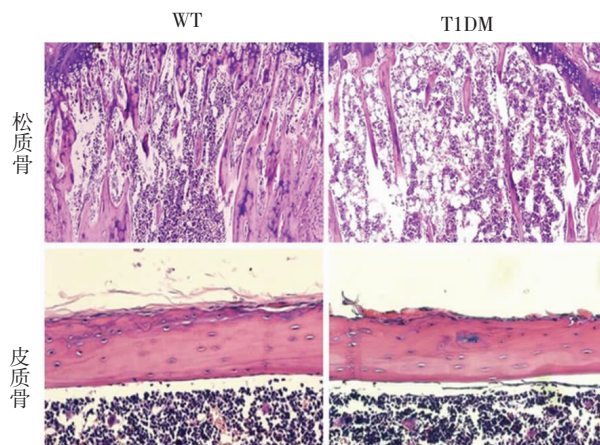


图2 2组小鼠 HE 染色 (200×)

2.3 观察 T1DM 小鼠松质骨与皮质骨成骨细胞相关标志物基因表达水平

RT-PCR 检测结果显示 T1DM 小鼠皮质骨与松质骨成骨细胞相关转录因子 ALP、OSX、Runx2、OCN 均下降,与 X 线 Micro-CT 扫描结果一样存在部位差异。T1DM 小鼠松质骨中 ALP、OCN、OSX、Runx2 下降幅度更大 $[(0.52 \pm 0.10) \text{ vs. } (1.00 \pm$

表4 2组小鼠松质骨的骨形态计量指标 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Ob.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	N.Ob/T.Ar (10/mm ²)	BFR/BS [$\mu\text{m}^3/(\mu\text{m}^2 \cdot \text{d})$]
WT组	21.69 ± 0.37	38.02 ± 0.70	1.13 ± 0.10	12.61 ± 0.40	0.48 ± 0.04
T1DM组	12.15 ± 0.46	30.19 ± 1.02	0.74 ± 0.06	5.34 ± 0.23	0.25 ± 0.02
<i>t</i> 值	39.200	15.026	8.319	39.034	12.637
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表5 2组小鼠皮质骨的骨形态计量指标 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Ob.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR ($\mu\text{m}/\text{d}$)	N.Ob/T.Ar (10/mm ²)	BFR/BS [$\mu\text{m}^3/(\mu\text{m}^2 \cdot \text{d})$]
WT组	16.41 ± 0.29	42.21 ± 0.54	0.83 ± 0.03	2.55 ± 0.27	0.36 ± 0.04
T1DM组	12.80 ± 0.13	36.16 ± 1.22	0.67 ± 0.34	2.30 ± 0.24	0.27 ± 0.02
<i>t</i> 值	27.883	11.601	8.755	1.487	5.117
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.084	0.000

0.00), (0.52 ± 0.11) vs. (1.00 ± 0.10), (0.42 ± 0.01) vs. (1.00 ± 0.10), (0.34 ± 0.12) vs. (1.00 ± 0.08); $P < 0.01$], 而皮质骨相应指标下降幅度较小[(0.67 ± 0.19) vs. (1.00 ± 0.23), (0.73 ± 0.08) vs. (1.00 ± 0.23), (0.63 ± 0.08) vs. (1.00 ± 0.39), (0.62 ± 0.08) vs. (1.00 ± 0.11), $P < 0.05$]. 见表 6、表 7。免疫组化结果趋势与 RT-PCR 结果一致。提示 T1DM 对小鼠成骨分化, 特别是早期成骨分化有抑制作用, 且这种作用对松质骨影响更大。见表 8、表 9, 图 3。

表 6 RT-PCR 结果显示 2 组小鼠松质骨成骨细胞相关转录因子表达水平 (% , $n=5$)

组别	ALP	OCN	OSX	Runx2
WT组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.08
T1DM组	0.52 ± 0.10	0.52 ± 0.11	0.42 ± 0.01	0.34 ± 0.12
t 值	3.475	6.432	9.445	17.045
P 值	0.006	0.000	0.000	0.000

表 7 RT-PCR 结果显示 2 组小鼠皮质骨成骨细胞相关转录因子表达水平 (% , $n=5$)

组别	ALP	OCN	OSX	Runx2
WT组	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.39	1.00 ± 0.11
T1DM组	0.67 ± 0.19	0.73 ± 0.08	0.63 ± 0.08	0.62 ± 0.08
t 值	2.841	2.905	2.723	7.070
P 值	0.018	0.016	0.021	0.000

表 8 免疫组化结果显示 2 组小鼠松质骨成骨细胞相关转录因子表达水平 (% , $n=5$)

组别	OCN	Runx2	OSX
WT组	20.20 ± 1.92	18.66 ± 1.28	18.72 ± 1.24
T1DM组	4.20 ± 0.91	10.36 ± 1.47	9.36 ± 0.78
t 值	16.819	9.516	14.257
P 值	0.000	0.016	0.000

表 9 免疫组化结果显示 2 组小鼠皮质骨成骨细胞相关转录因子表达水平 (% , $n=5$)

组别	OCN	Runx2	OSX
WT组	10.98 ± 1.09	9.62 ± 1.20	10.34 ± 1.22
T1DM组	8.16 ± 1.05	7.51 ± 0.99	6.92 ± 0.86
t 值	4.176	3.052	5.139
P 值	0.003	0.020	0.001

2.4 观察 T1DM 小鼠松质骨与皮质骨 Wnt/ β -catenin 信号通路表达水平

RT-PCR 结果显示, 无论是松质骨还是皮质骨, T1DM 小鼠 Wnt 目的基因 LRP6、 β -catenin、Tcf、LEF-1 表达均下降。其中松质骨 Wnt 目的基因 LRP6、 β -catenin、Tcf、LEF-1 下降幅度比皮质骨更大[(0.18 ± 0.13) vs. (1.00 ± 0.13), (0.23 ± 0.20) vs. (1.00 ± 0.15), (0.29 ± 0.23) vs. (1.00 ± 0.23), (0.22 ± 0.17) vs. (1.00 ± 0.12); $P=0.000$]; 皮质骨相对应下降幅度较小[(0.74 ± 0.65) vs. (1.00 ± 0.07), (0.63 ± 0.45) vs. (1.00 ± 0.09),

(0.75 ± 0.58) vs. (1.00 ± 0.08), (0.70 ± 0.63) vs. (1.00 ± 0.05); $P < 0.01$]. 见表 10、表 11。免疫组化结果趋势与 RT-PCR 一致, 见表 12、表 13, 图 4。

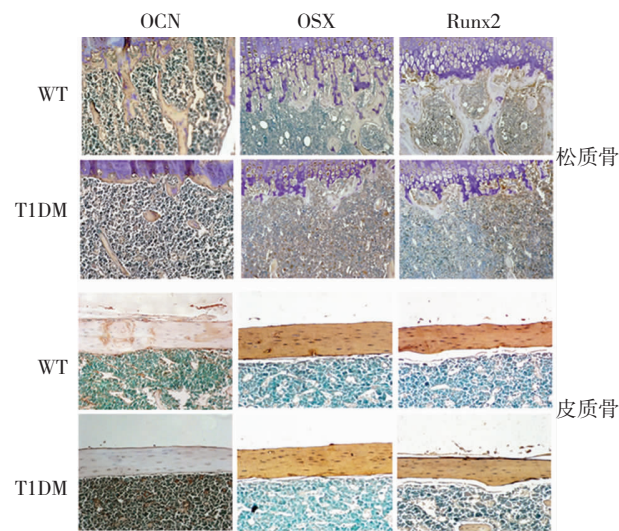


图 3 2 组小鼠免疫组化染色 (400 ×)

表 10 RT-PCR 结果显示 2 组小鼠松质骨 Wnt/ β -catenin 通路表达水平 (% , $n=5$)

组别	LRP6	β -catenin	TCF	LEF-1
WT组	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.23	1.00 ± 0.12
T1DM组	0.18 ± 0.13	0.23 ± 0.20	0.29 ± 0.23	0.22 ± 0.17
t 值	14.309	11.769	7.454	12.427
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

表 11 RT-PCR 结果显示 2 组小鼠皮质骨 Wnt/ β -catenin 通路表达水平 (% , $n=5$)

组别	LRP6	β -catenin	TCF	LEF-1
WT组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05
T1DM组	0.74 ± 0.65	0.63 ± 0.45	0.75 ± 0.58	0.70 ± 0.63
t 值	4.527	8.472	5.737	6.315
P 值	0.001	0.000	0.000	0.000

表 12 免疫组化结果显示 2 组小鼠松质骨 Wnt/ β -catenin 通路表达水平 (% , $n=5$)

组别	LRP6	β -catenin	TCF
WT组	19.13 ± 1.83	20.72 ± 1.32	19.43 ± 1.31
T1DM组	9.17 ± 1.18	8.92 ± 0.92	7.36 ± 0.45
t 值	10.210	3.524	19.460
P 值	0.000	0.008	0.000

表 13 免疫组化结果显示 2 组小鼠细胞相关转录因子表达水平 (% , $n=5$)

组别	LRP6	β -catenin	TCF
WT组	11.45 ± 1.57	6.25 ± 0.556	11.06 ± 0.67
T1DM组	8.46 ± 0.61	4.88 ± 0.67	9.17 ± 0.42
t 值	3.982	3.524	14.257
P 值	0.004	0.008	0.001

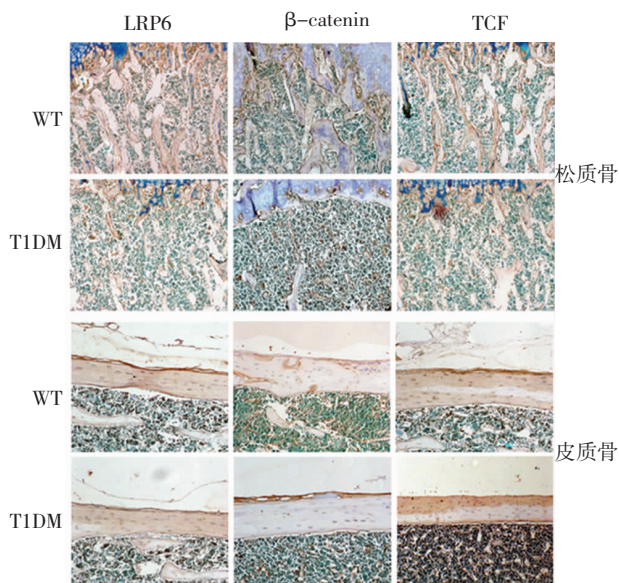


图 4 2 组小鼠免疫组化染色 (400 ×)

3 讨论

T1DM 是遗传与环境因素共同作用所致的自身免疫性疾病。T1DM 患者与普通人群相比,骨量降低且骨折危险性增加^[15]。随着治疗手段的改进,T1DM 患者寿命延长,骨量降低作为 T1DM 的并发症之一越来越受到重视。脊椎动物的骨骼由松质骨与皮质骨构成。目前研究表明这两种类型的骨骼不仅在结构上有差异,而且在力学性能和代谢活动上也有所不同。在结构上,皮质骨骨组织致密而松质骨较为疏松。另外,松质骨表面积更大,血液循环也更好^[5]。这两种骨骼组织的结构差异导致了它们两者机械性能的不同。皮质骨骨矿化水平更高,因此皮质骨骨组织更硬相应脆性也更高^[5,16]。但目前对松质骨与皮质骨在 T1DM 背景下骨量下降的差异及其机制研究较少。本研究发现,与 WT 组小鼠相比,T1DM 小鼠松质骨骨量下降程度大于皮质骨。骨组织形态计量学可反映成骨活动情况,结果提示 T1DM 小鼠松质骨成骨细胞活性与骨形成降低的幅度均大于皮质骨。

Runx2 是成骨细胞分化和骨形成过程中早期最具特异性的转录因子,在成骨细胞的分化与成熟过程中起到重要作用,OSX 是继 Runx2 之后发现的成骨细胞特异性转录因子,在骨形成方面具有重要作用^[17-18]。ALP 由成熟的成骨细胞分泌,是成骨细胞和

骨细胞主要的功能活性酶,能够促进细胞的成熟、钙化,是成骨细胞分化的晚期指标^[19]。OCN 是由成骨细胞合成、分泌的一种丰富的骨细胞外基质蛋白,是骨质钙化和维持骨组织的正常矿化的必要因子,故 OCN 是检测成骨细胞晚期分化的重要的分子标志^[20]。为进一步探讨 T1DM 小鼠松、皮质骨量下降差异的机制,课题组发现在 T1DM 小鼠松质骨中上述 4 个成骨细胞分化相关因子的下降幅度大于皮质骨,其中 OSX 与 Runx2 下降幅度最大,提示 T1DM 对小鼠成骨分化,特别是早期成骨分化有抑制作用,且这种作用对松质骨影响更大。这说明造成 T1DM 小鼠骨量丢失在松质骨和皮质骨中出现差异的主要原因在于松质骨中成骨活动的下降更为明显。

大量研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路在骨量的调控中扮演重要角色,特别是对成骨细胞的早期分化和活动有关键的调控作用^[21-23]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路与成骨细胞分化的枢纽因子,激活 β -catenin 后可促进成骨细胞的增殖和分化从而提升小鼠骨量^[24-25]。LRP6 是经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的共受体,在调控成骨细胞分化与骨微环境中扮演重要作用,激活 LRP6 后可促使 β -catenin 聚集入核并与 TCF/LEF 相结合进而促使目的基因的转录^[25-27]。本课题组先前的研究发现,松质骨与皮质骨 Wnt/ β -catenin 信号通路与骨重建相关因子表达存在差异,并且松质骨对 Wnt/ β -catenin 信号通路水平表达的变化更加敏感^[12]。研究结果显示, Wnt/ β -catenin 信号通路的关键因子 LRP6, β -catenin, LEF-1 与 TCF 的表达,在 T1DM 小鼠松质骨中下降幅度大于皮质骨,这与成骨活动以及骨量下降在松质骨和皮质骨中的差异表现趋势一致。

综上所述,本研究认为 T1DM 小鼠骨量下降原因主要是由于 Wnt/ β -catenin 通路表达水平下降影响骨形成所致,而松质骨与皮质骨中 Wnt/ β -catenin 通路表达水平下降幅度的不同导致了其骨量下降的差异。尽管 T1DM 小鼠 Wnt/ β -catenin 通路和成骨相关表达的趋势均与骨量下降的趋势一致,但是 T1DM 影响 Wnt/ β -catenin 通路的确切路径还需进一步研究。目前治疗骨量下降疾病的药物主要分为两大类:一类是抑制骨吸收,又称抗骨吸收剂,包括降钙素、二膦酸盐以及选择性雌激素受体调节剂等;另一类是促进骨质的生成,又称骨形成促进剂,

主要有甲状旁腺激素、氟化物以及锶盐等^[28-31]。虽然这些药物可提高骨量但是其对松质骨与皮质骨作用的差异还有待研究。本研究认为在治疗骨量下降相关疾病时应将松质骨与皮质骨看作两个独立的实体,观察不同药物在不同疾病中对松质骨与皮质骨的疗效,从而指导用药。

参 考 文 献

- [1] Khan TS, Fraser LA. Type 1 diabetes and osteoporosis: from molecular pathways to bone phenotype[J]. *J Osteoporos*, 2015, 2015: 174186.
- [2] Issa CM, Zantout MS, Azar ST. Vitamin D replacement and type 2 diabetes mellitus[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2015, 11(1): 7-16.
- [3] Kurra S, Siris E. Diabetes and bone health; the relationship between diabetes and osteoporosis-associated fractures[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27(5): 430-435.
- [4] Seeman E. Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013, 68(10): 1218-1225.
- [5] Weatherholt AM, Fuchs RK, Warden SJ. Cortical and trabecular bone adaptation to incremental load magnitudes using the mouse tibial axial compression loading model[J]. *Bone*, 2013, 52(1): 372-379.
- [6] Behrendt AK, Kuhla A, Osterberg A, et al. Dietary restriction-induced alterations in bone phenotype: effects of lifelong versus short-term caloric restriction on femoral and vertebral bone in C57BL/6 mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(4): 852-863.
- [7] Tottrup M, Hardlei TF, Bendtsen M, et al. Pharmacokinetics of ce-furoxime in porcine cortical and cancellous bone determined by microdialysis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(6): 3200-3205.
- [8] Iwamoto J, Sato Y, Matsumoto H. Influence of gastrectomy on cortical and cancellous bones in rats[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 2013: 381616.
- [9] Shah AD, Shoback D, Lewiecki EM. Sclerostin inhibition; a novel therapeutic approach in the treatment of osteoporosis[J]. *Int J Womens Health*, 2015, 7: 565-580.
- [10] Wang D, Ma W, Wang F, et al. Stimulation of Wnt/beta-catenin signaling to improve bone development by naringin via interacting with AMPK and Akt[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1563-1576.
- [11] Chen S, Feng J, Bao Q, et al. Adverse effects of osteocytic constitutive activation of β -catenin on bone strength and bone growth[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(7): 1184-1194.
- [12] Li J, Bao Q, Chen S, et al. Different bone remodeling levels of trabecular and cortical bone in response to changes in Wnt/beta-catenin signaling in mice[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(4): 812-819.
- [13] Yee CS, Xie L, Hatsell S, et al. Sclerostin antibody treatment improves fracture outcomes in a type I diabetic mouse model[J]. *Bone*, 2016, 82: 122-134.
- [14] Jia M, Chen S, Zhang B, et al. Effects of constitutive beta-catenin activation on vertebral bone growth and remodeling at different postnatal stages in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74093.
- [15] Davies-Tuck ML, Wang Y, Wluka AE, et al. Increased fasting serum glucose concentration is associated with adverse knee structural changes in adults with no knee symptoms and diabetes[J]. *Maturitas*, 2012, 72(4): 373-378.
- [16] Szabo ME, Zekonyte J, Katsamenis OL, et al. Similar damage initiation but different failure behavior in trabecular and cortical bone tissue[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2011, 4(8): 1787-1796.
- [17] Bruderer M, Richards RG, Alini M, et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis[J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 269-286.
- [18] Feng JQ, Ward LM, Liu S, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(11): 1310-1315.
- [19] Dai Z, Guo F, Wu F, et al. Integrin α v β 3 mediates the synergistic regulation of core-binding factor α 1 transcriptional activity by gravity and insulin-like growth factor-1 through phosphoinositide 3-kinase signaling[J]. *Bone*, 2014, 69: 126-132.
- [20] Yano S, Kitamura K, Satoh Y, et al. Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales[J]. *Zoolog Sci*, 2013, 30(3): 217-223.
- [21] Wu Y, Liu F, Liu Y, et al. GSK3 inhibitors CHIR99021 and 6-bromoindirubin-3'-oxime inhibit microRNA maturation in mouse embryonic stem cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8666.
- [22] Chen J, Long F. β -catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(5): 1160-1169.
- [23] Zuo C, Huang Y, Bajis R, et al. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling[J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(6): 1653-1663.
- [24] Kitagaki J, Iwamoto M, Liu JG, et al. Activation of beta-catenin-LEF/TCF signal pathway in chondrocytes stimulates ectopic endochondral ossification[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11(1): 36-43.
- [25] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [26] Li C, Xing Q, Yu B, et al. Disruption of LRP6 in osteoblasts blunts the bone anabolic activity of PTH[J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(10): 2094-2108.
- [27] Riddle RC, Diegel CR, Leslie JM, et al. Lrp5 and Lrp6 exert overlapping functions in osteoblasts during postnatal bone acquisition[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63323.
- [28] Naruse K, Uchida K, Suto M, et al. Alendronate does not prevent long bone fragility in an inactive rat model[J]. *J Bone Miner Metab*, 2016, 34(6): 615-626.
- [29] Bui M, Bjornerem A, Ghasem-Zadeh A, et al. Architecture of cortical bone determines in part its remodelling and structural decay[J]. *Bone*, 2013, 55(2): 353-358.
- [30] Borah B, Dufresne T, Nurre J, et al. Risedronate reduces intracortical porosity in women with osteoporosis[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(1): 41-47.
- [31] Ominsky MS, Brown DL, Van G, et al. Differential temporal effects of sclerostin antibody and parathyroid hormone on cancellous and cortical bone and quantitative differences in effects on the osteoblast lineage in young intact rats[J]. *Bone*, 2015, 81: 380-391.

(责任编辑: 冉明会)