

骨 科 学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002168

探讨糖尿病对兔膝前交叉韧带重建术后骨隧道的影 响

林 泉,李豫皖,吴向东,秦磊磊,刘子铭,陶宇章,王啸宇,肖昊卓,肖鹏程,黄 伟

(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究糖尿病对兔膝前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)重建术的影响,评估模型的有效性。**方法:**健康雄性新西兰兔 36 只随机分为 A、B 2 组。B 组于耳缘静脉注射四氧嘧啶(alloxan, ALX) 80 mg/kg, 48 h 后再予 120 mg/kg; A 组同法注射等量生理盐水。糖尿病建模后, 2 组均取自体跟腱重建 ACL。通过大体观察、血糖变化、组织学、骨密度(bone mineral density, BMD)、Micro CT、qRT-PCR 等评估糖尿病对 ACL 重建术的影响。**结果:**大体观察见 A 组关节腔内移植腱表面光滑、质匀, B 组表面毛糙、质脆、色黄。糖尿病建模后至术后 8 周, B 组空腹血糖明显升高且维持稳定, 明显高于 A 组($P<0.01$)。组织学发现术后 8 周时 B 组胰岛数目及胰岛细胞明显减少($P<0.01$)。术后 4 周, A 组骨隧道及周围 BMD 值明显高于 B 组($P<0.01$); 术后 8 周, 2 组 BMD 值均有升高, 组间存在统计学差异($P<0.01$)。Micro CT 发现, 术后 4、8 周, A 组骨隧道截面积分别为(4.544 ± 0.056) mm², (3.667 ± 0.095) mm², 明显小于 B 组的(4.734 ± 0.044) mm², (4.247 ± 0.069) mm²($P<0.05$)。**结论:**应用 ALX 诱导的糖尿病兔重建膝 ACL 模型, 是一种安全、可靠、经济、稳定的方法; 糖尿病兔 ACL 重建术后骨隧道及周围骨密度减少, 骨隧道生长滞后。

【关键词】糖尿病; 骨密度; 骨隧道; 前交叉韧带; 四氧嘧啶; micro CT**【中图分类号】**R686.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-02-24

Influence of diabetes on bone tunnel after anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits

Lin Xiao, Li Yuwan, Wu Xiangdong, Qin Leilei, Liu Ziming, Tao Yuzhang,

Wang Xiaoyu, Xiao Haozhao, Xiao Pengcheng, Huang Wei

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the influence of diabetes on anterior cruciate ligament(ACL) reconstruction in rabbits and the validity of this animal model. **Methods:** A total of 36 healthy male New Zealand rabbits were randomly divided into groups A and B. The rabbits in group B were given the injection of alloxan 80 mg/kg via the auricular vein, followed by alloxan 120 mg/kg after 48 hours, and those in group A were given an equal volume of normal saline. After a model of diabetes was established, autologous tendon was used for ACL reconstruction. Gross observation, blood glucose, histology, bone mineral density(BMD), micro-CT, and qRT-PCR were used to observe the influence of diabetes on ACL reconstruction. **Results:** Gross observation showed that group A had smooth surface and homogeneous texture of the tendon graft in the articular cavity, while group B had rough surface, brittle texture, and yellow color of the tendon graft. From after modeling to 8 weeks after surgery, group B had a significant increase in fasting blood glucose and a significantly higher level of fasting blood glucose than group A($P<0.01$). Histological examination showed that at 8 weeks after surgery, group B had significant reductions in the numbers of pancreatic islets and islet cells($P<0.01$). At 4 weeks after surgery, group A had significantly higher BMD values of the bone tunnel and the surrounding area than group B($P<0.01$); at 8 weeks after surgery, both groups had a significant increase in BMD, and there was a significant difference between the two groups($P<0.01$). Micro-CT showed that compared with group B at 4 and 8 weeks after surgery, group A had a significantly smaller cross-sectional area of the bone tunnel than group B(4.544 ± 0.056) mm², (3.667 ± 0.095) mm² vs. (4.734 ± 0.044) mm², (4.247 ± 0.069) mm², $P<0.05$. **Conclusion:** The rabbit model of alloxan-induced diabetes and ACL reconstruction is safe, reliable, economic, and stable. There is a significant reduction in BMD of the bone tunnel and the surrounding area in diabetic rabbits after ACL reconstruction, which results in delayed growth of the bone tunnel.

tion in BMD of the bone tunnel and the surrounding area in diabetic rabbits after ACL reconstruction, which results in delayed growth of the bone tunnel.

【Key words】diabetes; bone mineral density; bone tunnel; anterior cruciate ligament; alloxan; micro-CT

作者介绍: 林 泉, Email: xiao5401@163.com,

研究方向: 关节外科。

通信作者: 黄 伟, Email: huangwei68@263.net。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81572142)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190516.1611.004.html>

(2019-05-17)

随着人民生活水平的日益提高和社会老龄化的不断加剧,糖尿病已成为严重威胁国民健康的流行病。国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)第八版糖尿病地图显示:截至 2017 年全球已有 4.25 亿(20~79 岁人群)糖尿病患者,而我国占 1.14 亿,且未诊断比例达 53.6%^[1]。根据中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版),我国 2013 年成人 2 型糖尿病患病率为 10.4%,未诊断比例高达 63%^[2]。

无论是美国糖尿病协会(American Diabetes Association, ADA)2018 年糖尿病诊疗标准^[3],还是中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)^[2]都将糖尿病患者的体育运动管理置于极其重要的地位。然而,糖尿病可造成骨骼运动系统的功能紊乱,并且与肌腱相关疾病关系密切^[4],较之于非糖尿病人群,糖尿病患者的肌腱疾病(肌腱损伤、肌腱病、肌腱修复障碍、腱鞘粘连等)发生率明显增长^[5]。其肌腱组织脆性增加,抗拉强度和生物力学性能均降低^[6-9],更容易发生肌肉肌腱等运动系统损伤^[10],肌腱撕裂的风险高于非糖尿病患者。而其中膝关节前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)的损伤,通常需要进行手术重建,以确保日常生活和体力活动的维持。

有报道指出,糖尿病是 ACL 重建术后再入院的危险因素^[11]。但是,目前国内外尚无关于糖尿病对 ACL 重建术后愈合影响的基础研究,特别是糖尿病引起的骨量丢失对 ACL 重建后的骨隧道是否存在影响尚未得到充分表征,然而这些信息对于确定糖尿病人群中 ACL 损伤或病变的适当非手术和手术治疗方案、围手术期管理、康复指导等具有非常重要的意义,尤其对于血糖控制不良和数量庞大的未诊断的糖尿病患者具有极其重要的参考价值。鉴于此,本研究一方面创立了一种安全、可靠且可重复的动物模型,为相关研究提供稳定的模型来源;另一方面基于糖尿病兔 ACL 重建术,对骨隧道的变化进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要材料

选取 36 只成年健康雄性新西兰兔,体质量 2.1~2.4 kg (重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK 渝 2017-0008),检查均可自由活动,无关节及其他肢体异常,双膝关节前抽屉试验、Lachman 试验均阴性。单笼饲养,适应性喂养 1 周,体质量均稳定增长。

四氧嘧啶(Sigma, 美国),注射用青霉素钠(华北科技),强生血糖仪和试纸条(强生, 美国),qRT-PCR 引物序列(上海生工合成),逆转录试剂盒(Takara, 日本),倒置显微镜(Nikon, 日本),双能 X 线骨密度仪(Hologic, 美国),磁共振扫描仪(GE Signa HDxt3.0T, 美国),Micro CT(Bruker SkyScan 1176, 德国)等。

1.2 模型的制备

所有兔随机检测 3 次清晨空腹血糖为 4.3~6.1 mmol/L,随机分成 A、B 2 组,每组 18 只,2 组间体质量、血糖差异无统计学意义。本实验遵循美国科学院颁布的实验动物使用指南^[12],并经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准。

1.2.1 糖尿病模型的建立 将四氧嘧啶(alloxan, ALX)用 0.9% 生理盐水制成 5% 溶液,通过 0.22 μm 过滤器除菌。B 组禁食 12 h 后于耳缘静脉注射 ALX 80 mg/kg,48 h 后再予 ALX 120 mg/kg。A 组同法注射等量生理盐水对照。注药后 48 h 内予 10% 葡萄糖水自由摄取以防严重低血糖,高于 30 mmol/L 时即行普通胰岛素皮下注射 1~2 U(剂量视具体血糖而调整)。此后 2 周随机检测 3 次清晨空腹血糖持续稳定 $>300 \text{ mg/dL}$ ^[13-14](16.67 mmol/L)且尿糖阳性则表明建模成功。

1.2.2 ACL 重建模型的建立 糖尿病模型稳定后,参照相关文献^[15-17]方法,进行手术造模。2 组兔均随机行单侧 ACL 重建术。采用戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉注射进行麻醉,严格无菌下,取自体跟腱外侧 1/3(直径 2.6 mm、长 45 mm)编织为移植腱备用(图 1A、B、C)。经髌旁内侧切口打开关节腔(关节腔内未见明显积液及滑膜炎表现),显露 ACL(图 1D),将其切断并清理残端。在原 ACL 起止点中心处,选用与移植腱相匹配的 2.5 mm 钻头分别建立胫骨和股骨骨隧道,用牵引线将移植腱缓慢置入骨隧道,调整张力满意后在骨隧道外口附近钻孔并牢靠固定(图 2A)。然后常规分层关闭切口。术后,送回笼中自由活动,肌注青霉素 5 d[10 万 U/(kg·d)]预防感染。

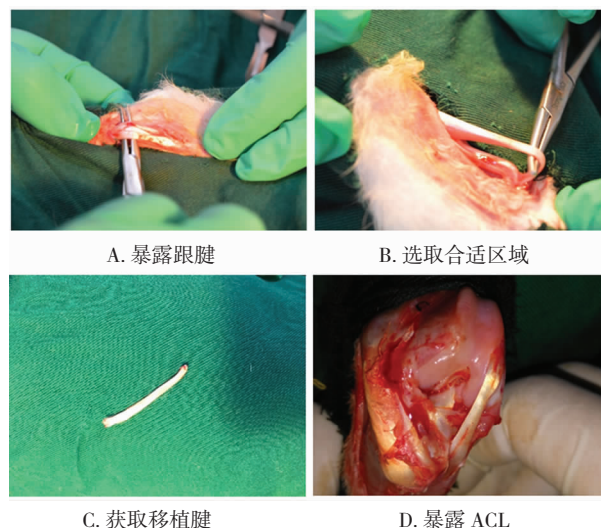


图 1 制备移植腱和暴露膝 ACL

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 一般情况和大体观察 定期观察各组兔毛发、活动、饮食、尿量及精神状态,监测记录血糖、体质量。术后 2、4、8 周分别处死各组动物 6 只,取股骨-韧带-胫骨样品行大体观察。

1.3.2 组织学检查 术后 8 周取胰腺及肾组织经 10% 中性福尔马林固定、脱水、包埋、切片、HE 染色,行组织形态学观察,由经验丰富的病理医师在光学显微镜下进行盲法阅片及半定量分析。胰腺组织每张切片随机选择 5 个低倍视野($100\times$)进行胰岛计数,随机选择 5 个高倍视野($200\times$)对每个胰岛中切到核的胰岛细胞进行计数,并计算胰岛细胞占高倍视野中所有细胞的百分比。肾组织每张切片随机采集 10 个高倍视野($400\times$),每个视野随机选择 10 个肾小管,按 100 个肾小管采用 Paller 法对其评分,分数越高则肾小管损伤越重,标准如下:1 分(上皮细胞核固缩);1 分(上皮细胞颗粒变性);1 分(上皮细胞空泡变性);1 分(肾小管明显扩张、细胞扁平);1 分(肾小管腔内有脱落坏死细胞,但无管型或细胞碎片);2 分(管型)^[19]。

1.3.3 骨密度(bone mineral density, BMD)测定 术后 2、4、8 周进行 BMD 检测,分别测量股骨和胫骨骨髓道,选取感兴趣区域为:以骨髓道中轴线为中线的 $3.5\text{ mm}\times 12\text{ mm}$ 的矩形范围,所得数据进行统计学分析。

1.3.4 RT-PCR 检测 从各时间点腱骨界面组织中分离提取总 RNA,用分光光度计测定 RNA 浓度,取 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 分光比值为 1.8~2.0 的样品。逆转录后提取 cDNA,用相关特异性引物(表 1)进行实时荧光定量 PCR,测定样品相关基因骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨形成蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)和 I 型胶原(collagen type I alpha 1, COL1A1)的 mRNA 表达水平,以 GAPDH 作为内参。

表 1 RT-PCR 所用引物序列

基因	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
OCN	上游 CAGGCGCTACCTGTATCAATGGC	118
	下游 GCCGATGTGCTCAGCCAACTC	
OPN	上游 AGCGAGGAGTTGAATGGTGCATAC	152
	下游 AATCTGGACTGCTTGTGGCTGTG	
BMP2	上游 GCTGTACTAGCGACACCCAC	131
	下游 GCTGTACTAGCGACACCCAC	
COL1A1	上游 GCGAGAGCATGACCGATGGATTC	181
	下游 GCCTTCTTGAGTTGCCAGTCTG	
GAPDH	上游 CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	106
	下游 CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	

1.3.5 影像学检查 采用 GE 3.0T 磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)扫描仪和配套小动物线圈,对各时间点样品进

行扫描。首先进行骨髓道及腱骨界面 MRI 影像的大体观察,然后在配套工作站上取横断位测量胫骨骨髓道直径,记录并统计分析,方法参考^[18]。

1.3.6 Micro CT 检测 通过 Micro CT 成像系统对术后 4、8 周样品进行分析,扫描平面垂直于骨髓道中轴,分辨率为 $18\text{ }\mu\text{m}$,测量骨髓道面积。再选取以骨髓道中轴线为中点的直径 3.5 mm 的圆形区域,进行 3D 重建并获取骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 t 检验分析 2 组间差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

糖尿病建模后, A 组兔精神状态上佳,活动矫健,体质量持续稳定增长;而 B 组毛发稀松易脱落、精神萎靡、反应迟钝、不善活动、食欲下降、皮脂减少,同时出现饮水及排尿量增加、体形日渐消瘦等糖尿病表现,部分伴有特殊烂苹果腥臭味。术后各组兔恢复良好,2 周即可灵活跑跳(图 2B)。实验过程中未发生死亡,其中糖尿病建模时,有 3 只未成模,首次成模率为 83.3%,予再次追加 ALX 120 mg/kg 后,全部造模成功。

2.2 大体观察

在设定各时间点处死动物时,2 组兔半月板和关节软骨面均未见明显磨损、退变。从整体来看,相比于 A 组, B 组样品体积有所减小,皮质较菲薄而影响通透性使其外观色泽出现改变(图 2C)。A 组移植腱关节腔内部分表面光滑、质地剔透,张力、弹性良好;而 B 组表面毛糙、增厚变宽、质脆易碎、色泽偏黄、弹性较差(图 2D)。

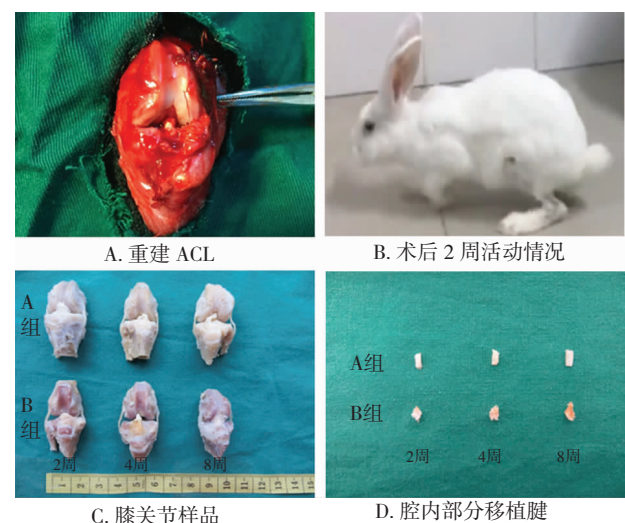


图 2 ACL 重建完毕和大体情况

2.3 血糖、体质量变化

造模前,2 组兔的空腹血糖和体质量基础值比较,无统计学差异($P>0.05$);糖尿病造模后至术后 8 周,B 组的血糖明显升高且维持在高水平,明显高于 A 组($P<0.01$),而 A 组血糖稳定在正常范围(图 3A);糖尿病造模后 1 周至术后 8 周,B 组的体质量迅速下降,明显低于 A 组($P<0.01$),这种下降程度在术后 4 周逐渐趋于平稳,而 A 组体质量随时间呈稳定增长(图 3B)。在手术日的空腹血糖及体质量,2 组间存在统计学差异($P<0.01$);相较于基础值,B 组在手术日空腹血糖增长明显($P<0.01$)、体质量下降明显($P<0.01$),而 A 组血糖维持正常、体质量明显增长($P<0.05$),见表 2。

2.4 组织形态学观察及半定量分析

胰腺:A 组胰岛较多,轮廓饱满,胰岛内细胞较圆、数量多、排列紧密;外分泌腺结构正常(图 4A、C)。B 组胰岛数目明显减少,胰岛萎缩,严重者仅残存胰岛轮廓影,胰岛内细胞数量明显减少、分布松散、多数细胞呈梭形(图 4D 红箭头所示);外分泌腺未见异常(图 4B、D)。2 组兔胰岛数目、胰岛细胞计数和占比存在统计学差异($P<0.01$),见表 3。肾:B 组可见肾小球体积增大,系膜细胞增生,系膜基质增多,部分毛细血管祥闭塞。肾小管明显扩张,上皮细胞肿胀,胞质疏松,存在空泡和颗粒样变性,少数胞浆内可见絮状结构,部分管腔内存在管型,严重者见上皮细胞脱落(图 4F、H)。A 组肾组织结构正常(图 4E、G)。2 组兔肾小管损伤 Paller 评分存在统计学差异($t=23.740, P=0.000$),如图 4I 所示。

2.5 BMD 检测

术后 2 周,2 组间骨髓道及周围 BMD 值无统计学差异($P>0.05$);术后 4 周,相比于 B 组,A 组的 BMD 值明显升高($P<0.01$);术后 8 周,2 组 BMD 值均有升高,组间差异存在统计学意义($P<0.01$)。A 组无论股骨侧还是胫骨侧 BMD 值都随时间逐渐增长,而 B 组在术后 8 周才呈现明显增长。与 A 组相比,B 组 BMD 值的增长趋势和幅度明显减缓(表 4、图 5)。

2.6 腱骨界面的相关基因表达

采用 RT-PCR 对相关 mRNA 的表达进行评估(图 6),2 组 OPN、BMP2、COL1A1 的表达均随时间呈现增长趋势,B 组在术后 4、8 周时 OPN($t_{4周}=2.997, P_{4周}=0.040; t_{8周}=2.918, P_{8周}=0.043$)、OCN($t_{4周}=8.863, P_{4周}=0.000; t_{8周}=12.02, P_{8周}=0.000$)、BMP2($t_{4周}=2.971, P_{4周}=0.041; t_{8周}=3.377, P_{8周}=0.028$)的表达出现下调,明显低于 A 组。而 B 组 COL1A1 的表达在术后 8 周明显下降,2 组间存在统计学差异($t=3.419, P=0.027$)。

2.7 影像学评价

在 MRI 矢状位 T2 加权相对骨髓道、移植腱和腱骨界面进行形态观察和信号变化分析可见,2 组移植腱走行良好,并且移植腱与骨髓道相适宜,与 B 组相比,8 周时 A 组的骨髓道明显缩小,隧道内信号增高(图 7A、B),在横断位上同样观察到了骨髓道的缩小(图 7C、D)。取横断位测量胫骨骨髓道直径的统计结果显示,2 组兔术后 2 周时骨髓道的直径无统计学差异($t=0.459, P=0.670$),4 周时,A 组的骨髓道明显减小,B 组变化不大,2 组间存在统计学差异($t=4.899, P=0.008$),在 8 周时差异同样存在统计学意义($t=10.18, P=0.001$)(图 7E)。

表 2 2 组兔手术日血糖、体质量与基础值比较($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	血糖 (mmol/L)		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	体质量 (kg)		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	基础值	手术日			基础值	手术日		
A	5.328 ± 0.093	5.339 ± 0.126	0.071	0.944	2.210 ± 0.019	2.281 ± 0.020 ^c	2.513	0.017
B	5.172 ± 0.094	22.84 ± 0.495 ^{ab}	35.100	0.000	2.231 ± 0.022	2.069 ± 0.020 ^{ab}	5.384	0.000
<i>t</i> 值	1.178	34.300			0.700	7.365		
<i>P</i> 值	0.247	0.000			0.489	0.000		

注:与 A 组比较,a, $P<0.01$;与基础值比较,b, $P<0.01$,c, $P<0.05$

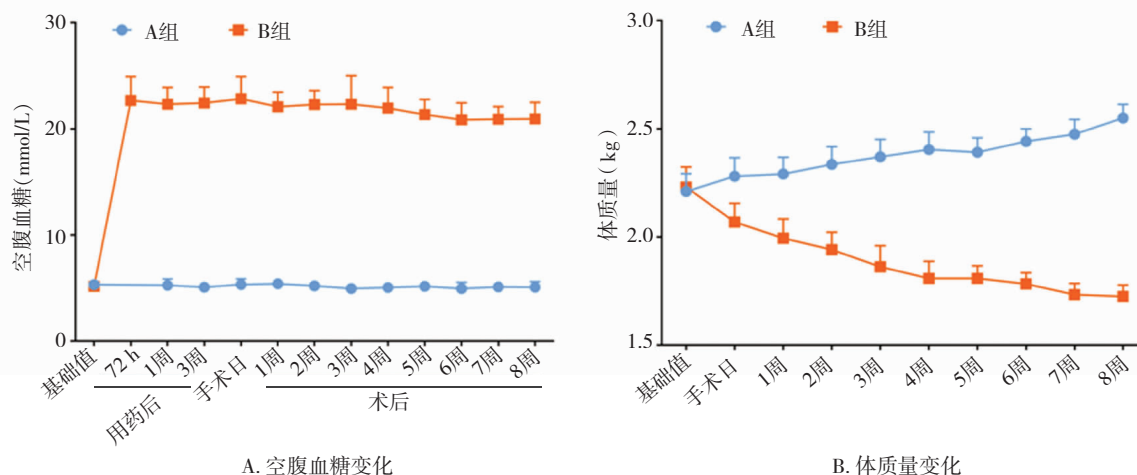
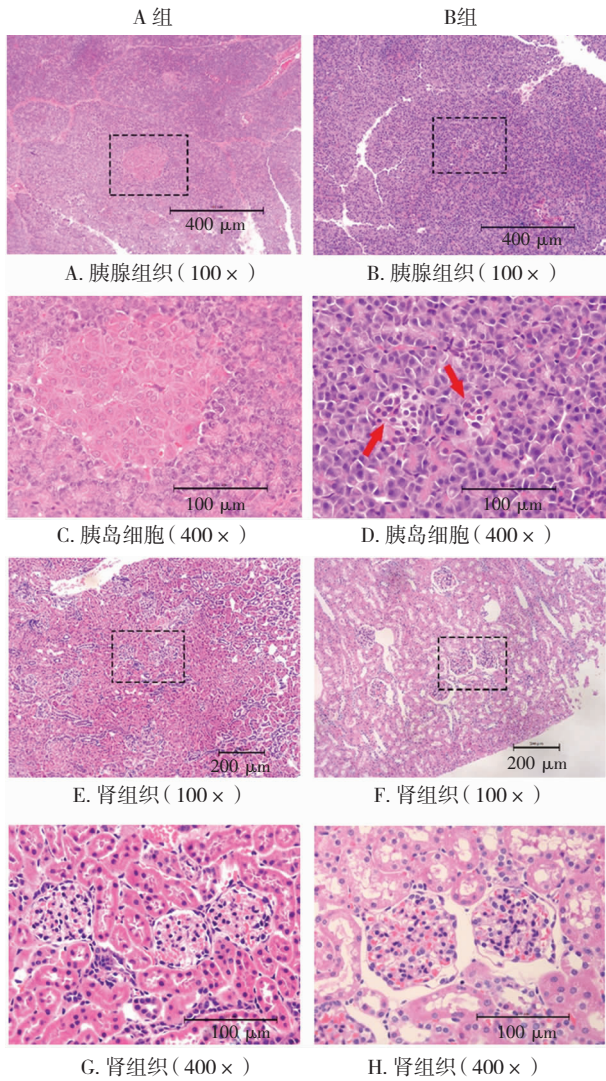


图 3 2 组兔空腹血糖和体质量变化的比较



A. 胰腺组织 (100 ×)

B. 胰腺组织 (100 ×)

C. 胰岛细胞 (400 ×)

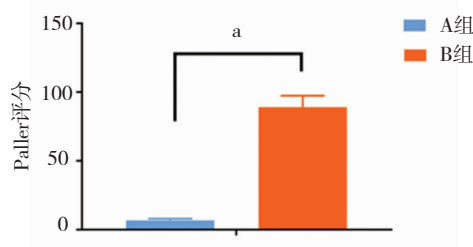
D. 胰岛细胞 (400 ×)

E. 肾组织 (100 ×)

F. 肾组织 (100 ×)

G. 肾组织 (400 ×)

H. 肾组织 (400 ×)



I. Paller 评分比较

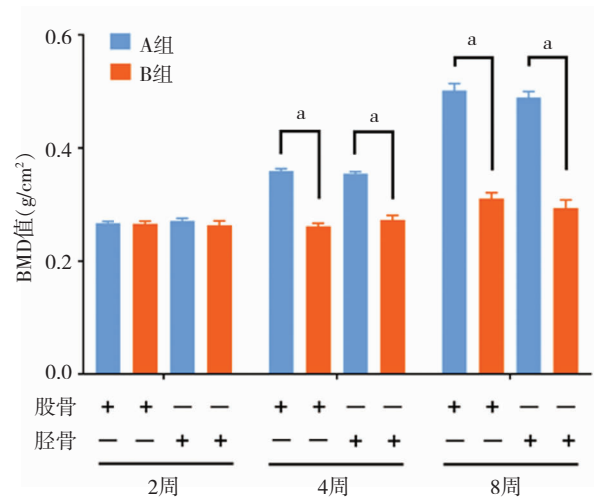
注: a, $P < 0.05$

图 4 术后 8 周时 (HE 染色), 2 组胰腺和肾组织学比较
及肾小管损伤 Paller 评分

表 3 2 组兔胰腺组织病理相关指标比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	胰岛计数	胰岛细胞计数	胰岛细胞占比 (%)
A	5.667 ± 0.232^a	200.900 ± 12.670^a	9.446 ± 0.594^a
B	0.633 ± 0.163	8.433 ± 2.061	0.397 ± 0.097
t 值	17.790	15.000	15.030
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 与 B 组比较, a: $P < 0.01$



注: a, $P < 0.01$

图 5 2 组兔各时间点骨髓道及周围 BMD 值比较

2.8 micro CT 分析

micro CT 所示, A 组在术后 4 周骨髓道内可见少量新骨生成, 骨髓道处骨密度有所增加, 而 B 组未见明显新骨形成, 骨髓道处骨密度也低于 A 组 (图 8A、B 白箭头)。术后 8 周, A 组骨髓道明显缩小, 伴有大量新生骨, 骨髓道处骨密度明显高于 B 组, 而 B 组骨髓道内可见少量新骨形成, 骨密度有所增加, 但明显低于 A 组 (图 8C、D 白箭头)。统计发现, 术后 4、8 周, A 组骨髓道截面积 [$(4.544 \pm 0.056) \text{ mm}^2$ 、 $(3.667 \pm 0.095) \text{ mm}^2$] 明显小于 B 组 [$(4.734 \pm 0.044) \text{ mm}^2$ 、 $(4.247 \pm 0.069) \text{ mm}^2$] ($t_{4\text{周}}=2.682, P_{4\text{周}}=0.023; t_{8\text{周}}=4.941, P_{8\text{周}}=0.001$) (图 8F); 而术后 4、8 周骨体积分数 BV/TV (%), A 组 (6.317 ± 0.305 、 10.12 ± 0.515) 明显高于 B 组 (5.183 ± 0.396 、 7.55 ± 0.357) ($t_{4\text{周}}=2.267, P_{4\text{周}}=0.047; t_{8\text{周}}=4.099, P_{8\text{周}}=0.002$) (图 8E)。

表 4 2 组兔各时间点骨髓道及周围 BMD 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{g/cm}^2$)

组别	股 骨		t 值	P 值	胫 骨		t 值	P 值
	A 组	B 组			A 组	B 组		
2 周	0.267 ± 0.001	0.266 ± 0.002	0.571	0.580	0.271 ± 0.002	0.263 ± 0.003	2.069	0.065
4 周	0.360 ± 0.002^a	0.261 ± 0.002	35.090	0.000	0.355 ± 0.001^a	0.273 ± 0.003	23.350	0.000
8 周	0.502 ± 0.005^a	0.311 ± 0.004	28.930	0.000	0.490 ± 0.004^a	0.294 ± 0.006	27.050	0.000

注: 与 B 组比较, a: $P < 0.01$

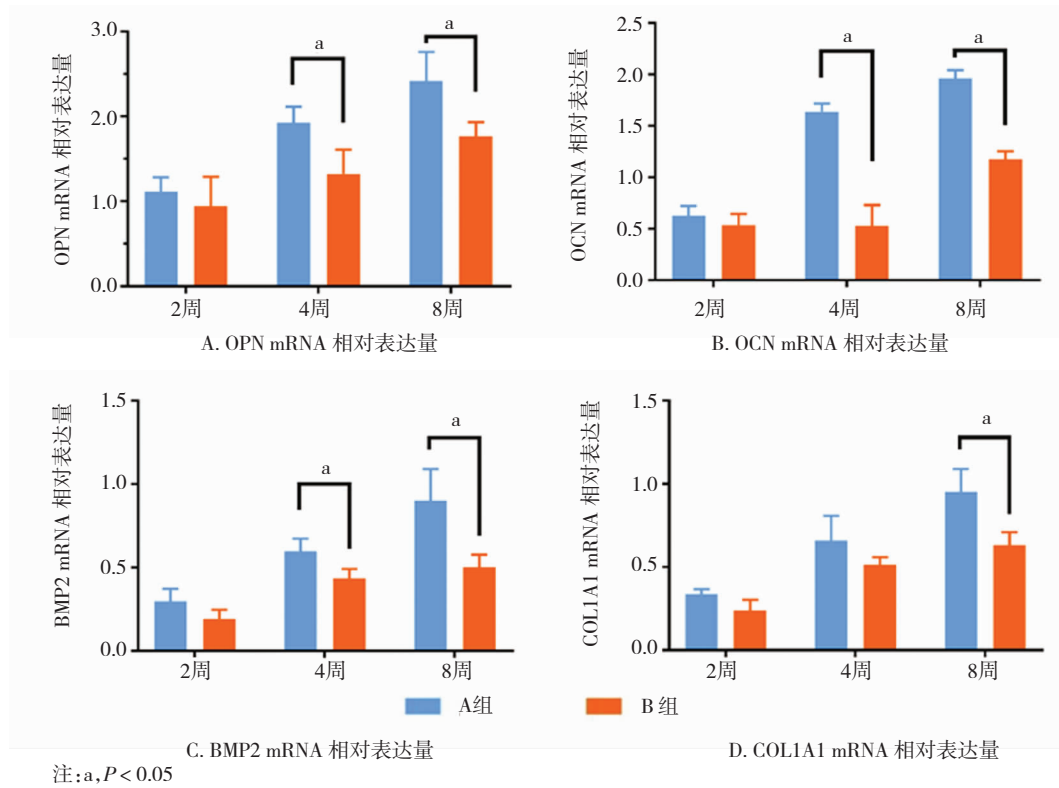


图6 各时间点 OPN、OCN、BMP2 和 COL1A1 mRNA 表达水平的比较

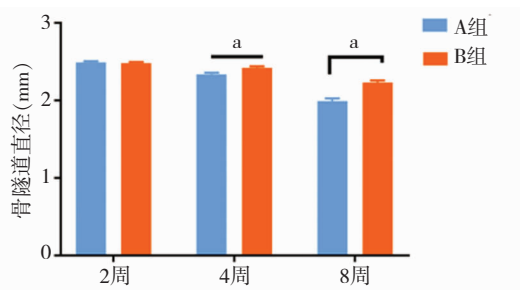
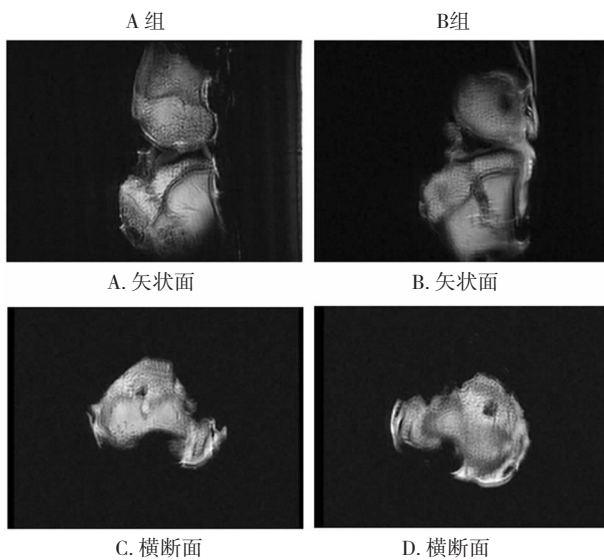
注: a, $P < 0.05$

图7 术后8周时 MRI 矢状面和横断面影像及各时间点胫骨骨隧道直径比较

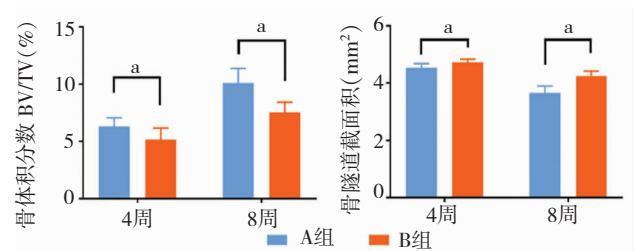
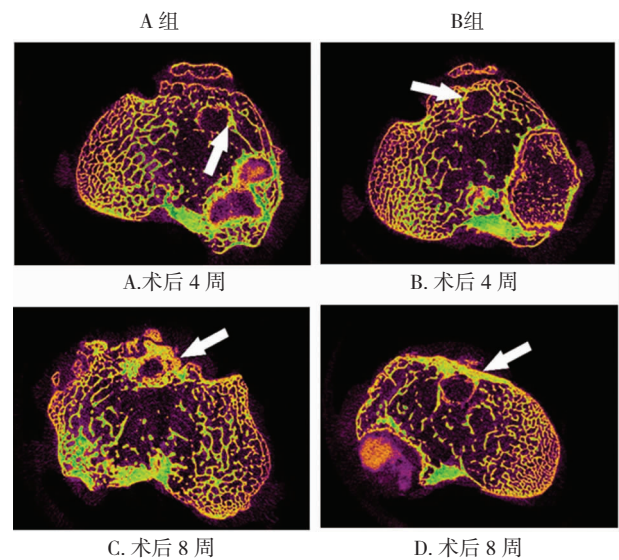
注: a, $P < 0.05$

图8 术后4、8周 micro CT 上胫骨隧道面积和骨体积分数的比较

3 讨论

3.1 糖尿病动物模型

目前,化学药物诱导是制作糖尿病动物模型的常用方法,其中链脲佐菌素和 ALX 长期应用于诱导实验性糖尿病,选择性破坏胰岛 β 细胞进而造成胰岛内分泌功能障碍,胰岛素生成减少导致高血糖,形成糖尿病,通常在实验前 5~7 d 诱发糖尿病,以保证稳定的高血糖^[20-21]。有报道指出,ALX 比链脲佐菌素更敏感、更适宜诱导兔糖尿病^[22]。但是,国内外文献关于 ALX 剂量的报道差异较大(80~150 mg/kg),给药频次、间隔也存在诸多方式,普遍存在死亡率高、成模率低的情况,是当前一大困惑。本研究的给药方法一次成模率 83.3%,追加 ALX 后全部成功、无动物死亡,并且通过血糖、体质量的明显变化及胰和肾组织的显著病理改变验证了模型的成功,说明此造模方法结合科学的血糖管理既能降低死亡率,又可使高血糖长期维持稳定,可作为糖尿病兔造模的参考。

3.2 糖尿病组骨隧道新骨形成减少

本研究通过 BMD 和 MRI 检测,发现正常对照组兔 ACL 重建术后,骨隧道及周围 BMD 随时间逐渐增加、隧道直径逐渐缩小,而糖尿病组虽然也出现了相应的变化,但其幅度和趋势明显弱于对照组,这种现象在 micro CT 中也得了印证。糖尿病组的骨隧道截面积明显大于对照组,而新生骨量体积分数 BV/TV 又明显低于对照组。这种糖尿病带来的新骨形成减缓和骨量的隐性丢失,导致骨隧道的生长出现滞后现象,表明糖尿病对早期骨隧道的生长可能会产生不利影响,进而阻碍腱骨愈合的进程。有临床研究发现,糖尿病患者肩袖修补术后复发率明显增加,是非糖尿病组的 2.49 倍,影响术后腱骨愈合^[23]。骨隧道的生长和成熟是 ACL 重建后腱骨愈合过程中极其重要的一环,腱骨界面的新骨形成障碍,直接影响腱骨愈合的骨质基础,导致移植腱和骨隧道的腱合受阻,妨碍两者间的直接愈合,继而整个腱骨系统不能提供有效的稳定性,出现关节不稳、功能受损、疼痛等。Brophy 等^[24]研究指出,ACL 重建后糖尿病组的平均膝关节损伤与骨关节炎评分(knee injury and osteoarthritis outcome score, KOOS)中疼痛

方面、日常活动方面和运动方面及国际膝关节评分委员会评分(international knee documentation committee, IKDC),分别较非糖尿病组低 56%、58%、56% 及 53%,患者的关节功能明显降低。

3.3 糖尿病通过影响骨代谢降低成骨能力

骨形成减少是骨隧道生长不良的关键,研究发现糖尿病通过影响骨代谢而抑制成骨能力,本课题组最新的研究成果显示,糖代谢下降会阻碍 Wnt7b 介导的成骨分化^[25]。在体外研究中,高血糖水平可减少骨吸收、增加非矿化基质的生成、降低骨矿化^[26-27]。在动物实验中,糖尿病大鼠血糖失控时可抑制软骨细胞的生成和软骨内骨化的进程,而血糖调控理想者未出现这些变化^[28]。针对成骨细胞,糖尿病可导致其功能受损,影响其分化、增殖并抑制其成熟^[29-32],胰岛素分泌减少也可对上述过程产生影响^[33],甚至出现骨质量变化^[34],而胰岛素可增加成骨细胞骨钙素分泌^[35]。Hou 等^[14]研究表明,糖尿病兔成骨细胞数量、新生骨面积、I 型胶原含量均明显下降。同样,在本实验中也得到了相似的结果,通过 RT-PCR 对成骨相关标志物的评估,发现在术后 4 周和 8 周,糖尿病组 OPN、OCN、BMP2 的表达下调,明显低于对照组,表明腱骨交界区域成骨能力的下降。I 型胶原广泛存在于韧带和骨组织中,本研究观察到糖尿病组 COL1A1 的表达在术后 8 周明显下调,说明糖尿病对腱骨界面韧带的重塑和骨组织的修复成熟均产生了影响。此外,TGF- β 、IGF-1 等因子的表达也受糖尿病的影响而出现下降^[36]。前述成果表明,糖尿病通过抑制这些重要生长因子的产生,继而影响成骨的进程,进一步导致相关微结构、生理功能和生物力学的改变,如 IGF-1 的降低就被证实与椎骨骨折相关^[37-38],糖尿病动物的生物力学特性也下降^[39-40]。糖尿病导致骨形成减少,骨吸收超过骨形成^[41],从而引发骨质疏松、骨折延迟愈合^[42-43]、脆性骨折等严重的骨骼并发症^[44-45]。其本身是骨折的独立危险因素,糖尿病患者髌部骨折的风险明显高于非糖尿病患者^[46-47],其中,骨微结构恶化、骨量分布不当、骨重塑机制紊乱等导致骨强度降低,可能是糖尿病骨折风险增加的关键因素^[48-51]。

本研究创造性地制作了具有糖尿病背景的 ACL 重建动物模型,便于以此为基础深入探究相关机制,寻找前述临床现象的相关实验室证据,从而

为该类患者提供更加个性化的诊疗方案和临床康复指导。但也存在不足之处,本实验建立的糖尿病是一种持续高血糖的理想状态,可能不适用于血糖控制良好的糖尿病患者,相反却能为血糖控制不佳和大量未诊断的糖尿病人群提供参考价值。糖尿病性骨病目前尚未得到应有的重视,而我国糖尿病患者数量巨大,其伴随的骨量丢失、骨质量的隐性下降、潜在的骨质疏松及其造成的骨折等严重后果,值得警惕,尤其是血糖控制不良和未诊断的糖尿病人群所面临的潜在威胁更大,亟待医患双方和全社会予以足够的重视,以期最大程度减少糖尿病病程在骨骼运动系统中的累加侵害。

综上所述,应用 ALX 诱导的糖尿病兔重建 ACL 模型,是一种安全、可靠、经济、稳定的方法,能为相关研究提供稳定的模型来源;本研究发现,糖尿病对兔 ACL 重建手术的影响,主要是骨髓腔及周围骨密度的减少,骨髓腔生长不良。当然,其确切的机制还有待后续更深入系统的研究。

参 考 文 献

- [1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 8th ed[EB/OL]. Brussels, Belgium; International Diabetes Federation, 2017. [2019-04-01]. <https://www.diabetesatlas.org/>.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [3] Association American D. Updates to the standards of medical care in diabetes-2018[J]. Diabetes Care, 2018, 41(9): 2045-2047.
- [4] Zakaria MH, Davis WA, Davis TM. Incidence and predictors of hospitalization for tendon rupture in type 2 diabetes; the Fremantle diabetes study[J]. Diabet Med, 2014, 31(4): 425-430.
- [5] Longo UG, Franceschi F, Ruzzini L, et al. Higher fasting plasma glucose levels within the normoglycaemic range and rotator cuff tears[J]. Br J Sports Med, 2009, 43(4): 284-287.
- [6] Oliveira RR, Medina de Mattos R, Magalhaes Rebelo L, et al. Experimental diabetes alters the morphology and nano-structure of the achilles tendon[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169513.
- [7] Gumucio JP, Korn MA, Saripalli AL, et al. Aging-associated exacerbation in fatty degeneration and infiltration after rotator cuff tear[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2014, 23(1): 99-108.
- [8] Karim L, Bouxsein ML. Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties[J]. Bone, 2016, 82: 21-27.
- [9] Boivin GP, Elenes EY, Schultze AK, et al. Biomechanical properties and histology of db/db diabetic mouse Achilles tendon[J]. Muscles Ligaments Tendons J, 2014, 4(3): 280-284.
- [10] de Jonge S, Tol JL, Weir A, et al. The tendon structure returns to asymptomatic values in nonoperatively treated achilles tendinopathy but is not associated with symptoms; a prospective study[J]. Am J Sports Med, 2015, 43(12): 2950-2958.
- [11] Bokshan SL, DeFroda SF, Owens BD. Risk factors for hospital admission after anterior cruciate ligament reconstruction[J]. Arthroscopy, 2017, 33(7): 1405-1411.
- [12] US National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed[EB/OL]. Washington, DC: National Academies Press, 2010. [2019-04-01]. <http://dels.nas.edu/Report/Guide-Care/12910>.
- [13] Zhou X, Dong J, Zhang L, et al. Hyperglycemia has no effect on development of restenosis after percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in a diabetic rabbit model[J]. J Endocrinol, 2015, 224(2): 119-125.
- [14] Hou CJ, Liu JL, Li X, et al. Insulin promotes bone formation in augmented maxillary sinus in diabetic rabbits[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2012, 41(3): 400-407.
- [15] Sun L, Wu B, Tian M, et al. Comparison of graft healing in anterior cruciate ligament reconstruction with and without a preserved remnant in rabbits[J]. Knee, 2013, 20(6): 537-544.
- [16] Cai J, Wang J, Ye K, et al. Dual-layer aligned-random nanofibrous scaffolds for improving gradient microstructure of tendon-to-bone healing in a rabbit extra-articular model[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 3481-3492.
- [17] Bachy M, Sherifi I, Zadegan F, et al. Anterior cruciate ligament surgery in the rabbit[J]. J Orthop Surg Res, 2013, 8: 27.
- [18] Setiawati R, Utomo DN, Rantam FA, et al. Early graft tunnel healing after anterior cruciate ligament reconstruction with intratunnel injection of bone marrow mesenchymal stem cells and vascular endothelial growth factor[J]. Orthop J Sports Med, 2017, 5(6): 2325967117708548.
- [19] Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Clin Invest, 1984, 74(4): 1156-1164.
- [20] King AJ. The use of animal models in diabetes research[J]. Br J Pharmacol, 2012, 166(3): 877-894.
- [21] Islam MS. Animal models of diabetic neuropathy: progress since 1960s[J]. J Diabetes Res, 2013, 2013: 149452.
- [22] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview[J]. Indian J Med Res, 2007, 125(3): 451-472.
- [23] Cho NS, Moon SC, Jeon JW, et al. The influence of diabetes mellitus on clinical and structural outcomes after arthroscopic rotator cuff repair[J]. Am J Sports Med, 2015, 43(4): 991-997.
- [24] Brophy RH, Huston LJ, Wright RW, et al. Outcomes of ACL reconstruction in patients with diabetes[J]. Med Sci Sports Exerc, 2016, 48(6): 969-973.
- [25] Chen H, Ji X, Lee WC, et al. Increased glycolysis mediates

- Wnt7b-induced bone formation[J/OL]. The FASEB Journal, 2019. [2019-04-01]. <https://doi.org/10.1096/fj.201900201RR>.
- [26] Xu F, Ye YP, Dong YH, et al. Inhibitory effects of high glucose/insulin environment on osteoclast formation and resorption in vitro[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2013, 33(2): 244-249.
- [27] Cunha JS, Ferreira VM, Maquigussa E, et al. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro[J]. Cell Tissue Res, 2014, 358(1): 249-256.
- [28] Beam HA, Parsons JR, Lin SS. The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus[J]. J Orthop Res, 2002, 20(6): 1210-1216.
- [29] Ehnert S, Freude T, Ihle C, et al. Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation—description of a novel in vitro model[J]. Exp Cell Res, 2015, 332(2): 247-258.
- [30] Balint E, Szabo P, Marshall CF, et al. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization[J]. Bone, 2001, 28(1): 21-28.
- [31] Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways[J]. J Cell Biochem, 2006, 99(2): 411-424.
- [32] Zayzafoon M, Botolin S, McCabe LR. P38 and activating transcription factor-2 involvement in osteoblast osmotic response to elevated extracellular glucose[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37212-37218.
- [33] Gooch HL, Hale JE, Fujioka H, et al. Alterations of cartilage and collagen expression during fracture healing in experimental diabetes[J]. Connect Tissue Res, 2000, 41(2): 81-91.
- [34] Pramojanee SN, Phimphilai M, Chattipakorn N, et al. Possible roles of insulin signaling in osteoblasts[J]. Endocr Res, 2014, 39(4): 144-151.
- [35] Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism[J]. Cell, 2010, 142(2): 296-308.
- [36] Coords M, Breitbart E, Paglia D, et al. The effects of low-intensity pulsed ultrasound upon diabetic fracture healing[J]. J Orthop Res, 2011, 29(2): 181-188.
- [37] Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, et al. Serum insulin-like growth factor-I level is associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus[J]. Osteoporos Int, 2007, 18(12): 1675-1681.
- [38] Ardawi MS, Akhbar DH, Alshaikh A, et al. Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes[J]. Bone, 2013, 56(2): 355-362.
- [39] Brown ML, Yukata K, Farnsworth CW, et al. Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99656.
- [40] Follak N, Kloting I, Merk H. Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2005, 21(3): 288-296.
- [41] Inoue D, Muraoka R, Okazaki R, et al. Efficacy and safety of risendronate in osteoporosis subjects with comorbid diabetes, hypertension, and/or dyslipidemia: a post hoc analysis of phase iii trials conducted in Japan[J]. Calcif Tissue Int, 2016, 98(2): 114-122.
- [42] Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, et al. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation[J]. Endocrinology, 2003, 144(1): 346-352.
- [43] de Waard EA, van Geel TA, Savelberg HH, et al. Increased fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus: an overview of the underlying mechanisms and the usefulness of imaging modalities and fracture risk assessment tools[J]. Maturitas, 2014, 79(3): 265-274.
- [44] Shanbhogue VV, Mitchell DM, Rosen CJ, et al. Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2016, 4(2): 159-173.
- [45] Li G, Prior JC, Leslie WD, et al. Frailty and risk of fractures in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2019, 42(4): 507-513.
- [46] Janghorbani M, van Dam RM, Willett WC, et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture[J]. Am J Epidemiol, 2007, 166(5): 495-505.
- [47] Chen HF, Ho CA, Li CY. Increased risks of hip fracture in diabetic patients of Taiwan: a population-based study[J]. Diabetes Care, 2008, 31(1): 75-80.
- [48] Rubin MR, Patsch JM. Assessment of bone turnover and bone quality in type 2 diabetic bone disease: current concepts and future directions[J]. Bone Res, 2016, 4: 16001.
- [49] Chen Y, Huang YC, Yan CH, et al. Abnormal subchondral bone remodeling and its association with articular cartilage degradation in knees of type 2 diabetes patients[J]. Bone Res, 2017, 5: 17034.
- [50] Jiang N, Xia W. Assessment of bone quality in patients with diabetes mellitus[J]. Osteoporos Int, 2018, 29(8): 1721-1736.
- [51] Oei L, Rivadeneira F, Zillikens MC, et al. Diabetes, diabetic complications, and fracture risk[J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(2): 106-115.

(责任编辑:张辉洁)