文章编号:1000-5404(2007)11-1053-04

论著

糖尿病大鼠早期骨微结构改变及其BMP-2基因的表达

范 伟[1],杨妤欣[2],陈 隽[3],蒋电明[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院骨科,重庆 400016;[3]附属第二医院内分泌科,重庆 400010;[2]重庆大学生物工程学院,重庆 400044)

提 要:目的 观察糖尿病大鼠早期的骨密度、骨微结构改变及骨组织中BMP-2基因的表达。**方法** 清洁级健康成年雄性Wistar大鼠30只,按照随机数字表将其分为A组(普通饲料对照组)、B组(高脂饲料+链脲佐菌素组)和C组(普通饲料+大剂量链脲佐菌素组)。饲养12周后,分别对各组大鼠进行骨密度、光镜、扫描电镜、骨形态计量学的观察以及BMP-2基因表达等指标的检测。**结果** 与A组相比,B组骨微结构无明显变化($P>0.05$),但BMP-2基因表达增高($P<0.05$),C组骨微结构明显改变($P<0.05$),BMP-2基因表达降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 不同的糖尿病大鼠模型早期骨微结构及BMP-2基因表达情况改变不完全一致,可能与高胰岛素血症、胰岛素抵抗有一定关系。

关键词: 糖尿病;骨微结构;BMP-2
中图法分类号: R329.26; R336; R587.102 **文献标识码:** A

Bone microstructure changes and bone BMP-2 expression in rats at early period of diabetes

FAN Wei[1], YANG Yu-xin[2], CHEN Juan[3], JIANG Dian-ming[1] ([1]Department of Bone Surgery, The First Affiliated Hospital, [3]Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of bone density, bone microstructure, bone BMP-2 expression in rats at early period of diabetes. **Methods** Thirty SPF 4-month-old male Wistar rats were randomly divided into 3 groups ($n=10$ in each group): A (fed with common forage as normal control group), B (fed with high-lipid forage and intraperitoneally injected with STZ to establish type 2 diabetes with insulin resistance), C (fed with common forage and intraperitoneally injected with STZ to establish type 2 diabetes with insulin secretion defaulting). The bone histomorphology, bone histomorphometry, bone BMP-2 expression were investigated 12 weeks later. **Results** As compared with group A, bone microstructure was of no obvious changes and bone BMP-2 expression was higher in group B ($P<0.05$), and obvious bone breakage was observed in group C ($P<0.05$). **Conclusion** The changes of bone microstructure and bone BMP-2 expression at the early period of diabetes are not consistent absolutely in individual rat model of diabetes. It maybe relate to hyperinsulinism and insulin resistance.

Key words: diabetes mellitus; bone microstructure; BMP-2 expression

糖尿病(diabetes mellitus, DM)和骨质疏松症(osteoporosis, OP)均是影响老龄人群生活质量的主要疾病,两者间是否存在必然的联系,已成为医学研究的热点之一。多数学者认为骨质疏松与1型糖尿病有关[1],而与2型糖尿病有无关系则存在争议[2-4]。目前大部分研究仅对糖尿病患者骨代谢生化指标及骨密度(bone mineral density, BMD)进行检测,较少对骨微结构、骨组织内基因表达情况进行观察。本实验对糖尿病大鼠动物模型进行了骨微结构及骨组织BMP-2基因表达的观察和分析,以进一步明确糖尿病与骨质疏松间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型建立

清洁级雄性4月龄Wistar大鼠30只,体质量180~200 g,

作者简介:范 伟(1964-),男,四川省隆昌县人,博士,副教授,主要从事骨愈合方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68431338,E-mail: fanxianan@sina.com
通讯作者:陈 隽,电话:15923206636
收稿日期:2007-03-13;修回日期:2007-04-13

由第三军医大学实验动物中心提供，饲养于重庆医科大学实验动物中心清洁级环境，动物实验过程经重庆医科大学伦理委员会审批同意。用随机数字表法将小鼠随机分为3组，每组10只。A组：普通饲料喂养4周，腹腔注射柠檬酸盐缓冲液，为正常对照组；B组：高脂饲料喂养4周，链脲佐菌素（STZ）按30 mg/kg剂量腹腔内注射；C组：普通饲料喂养4周，STZ按50 mg/kg剂量腹腔内注射。1周后，采集尾静脉血检测各组动物空腹血糖（FBG）、空腹胰岛素（FINS）、糖化血红蛋白（HbA_{1c}）、甘油三脂（TG）、总胆固醇（TC）等血生化指标，并计算胰岛素敏感指数[ISI，$ISI = In(FBG \times FINS)^{-1}$]，并继续按原方式饲养动物至实验结束。将空腹血糖≥7.8 mmol/L或糖负荷后2 h血糖（2HBG）≥11.1 mmol/L的大鼠确定为糖尿病大鼠，ISI小于正常大鼠ISI负值的均数+3倍标准差的大鼠确定为胰岛素抵抗大鼠[5]。

1.2 标本检测

实验至第12周（即腹腔注射后8周），各组大鼠用10%乌拉坦按10 ml/kg行腹腔内麻醉，采用NORLAND双能X线骨密度仪小动物检测软件进行全身扫描，对腰椎、股骨及胫骨等兴趣区进行骨密度测定分析，并处死大鼠进行以下检测。

1.2.1 组织形态学标本观察 剥离出腰椎椎体（L_1）和右侧胫骨，盐酸脱钙30 d，常规脱水，包埋，切片，厚度5 μm，HE染色后光镜下观察。

1.2.2 骨组织超微结构观察 剥离出腰椎椎体（L_2），2.5%冷戊二醛溶液固定，超声振荡清洗仪洗涤20～30 min，真空干燥、喷金处理后，扫描电镜观察。

1.2.3 骨形态计量学检测 剥离出左侧胫骨上1/3置70%乙醇中固定，经脱水、渗透、包埋、切片，厚度8 μm，HE染色后用图像数字化分析仪测量干骺端骨松质的4个静态参数：骨小梁面积百分数（Tb. Ar%）、骨小梁宽度（Tb. Wi）、骨小梁数量（Tb. N）及骨小梁分离度（Tb. Sp）。

1.2.4 BMP2 mRNA在骨组织中表达检测 切取椎骨和胫骨置于4%多聚甲醛固定，经脱钙，乙醇逐级脱水，石蜡包埋、切片后按BMP-2原位杂交试剂盒进行操作。阴性对照：用血清稀释液代替原位杂交液，余步骤相同。

染色结果观察：表达BMP2 mRNA的细胞质着色呈棕黄色。

以上各步骤所使用的容器、玻片均经泡酸、泡碱彻底清洗，200 ℃干烤2 h以彻底消灭RNA酶污染。在固定、冲洗、脱钙、脱水等步骤所用液体中均加入0.1% DEPC，以抑制RNA酶对RNA的分解。

1.3 统计学处理

采用SAS 8.0统计软件进行成组设计资料的F检验和t检验及相关性分析。

2 结果

2.1 血糖、空腹胰岛素、HbA_{1c}指标测定并计算ISI

与A组比较，B、C两组FBG显著升高（$P<0.01$）；与A组比较，B组FINS明显升高（$P<0.05$），C组则明显减少（$P<0.05$）；ISI负值B、C组均明显高于A组（$P<0.05$）；与C组相比，B组ISI负值显著高于C组（$P<0.05$）FINS明显增高（$P<0.05$）；B、C组HbA_{1c}值均高于A组（$P<0.05$）。见表1。

表1 各组大鼠血糖、空腹胰岛素、ISI、HbA_{1c}测量结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	FBG（mmol/L）	FINS（μU/ml）	HbA_{1c}（%）	ISI
A	5.2±0.5	42.7±9.6	4.7±0.9	−5.38±0.19
B	12.5±3.9[b]	58.9±13.8[a]	6.3±1.4[a]	−6.52±0.23[a]
C	17.5±4.1[b]	27.4±8.7[ad]	7.9±1.6[a]	−5.82±0.10[ac]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与A组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与B组比较

2.2 BMD测定

腰椎BMD：与A组相比，B、C组明显降低（$P<0.05$）；与B组相比，C组有下降趋势，但无显著性差异（$P>0.05$）。股骨、胫骨BMD：与A组相比，仅C组有显著下降（$P<0.05$），与B组相比，C组有下降趋势，但无显著性差异（$P>0.05$）。

2.3 骨组织形态学改变

胫骨上段HE染色光镜观察结果：A、B组骨小梁排列密集，骨小梁厚度较宽，间距小，小梁间的连接较多；C组骨组织中骨小梁排列较稀疏，骨小梁厚度变窄，数量减少，骨小梁明显变细、间距加宽，小梁间出现较多空白区域。

2.4 骨组织超微结构改变

椎骨扫描电镜观察结果：A、B组骨小梁相互连接成密集的立体网状结构，骨小梁数目较多，骨小梁间距小；C组骨小梁排列稀疏，骨小梁间隙增宽，部分区域骨小梁出现断裂、游离残端，三维结构遭到破坏。

2.5 骨形态计量学改变

骨形态计量学检测结果：与A组相比，C组Tb. Ar%、Tb. Th、Tb. N明显降低（$P<0.05$），B组有下降趋势，但无统计学差异（$P>0.05$）；与B组相比，C组Tb. Ar%、Tb. Th、Tb. N明显降低（$P<0.05$）。与A组比较，C组Tb. Sp值明显增高（$P<0.05$），B组有升高趋势，但无统计学差异（$P>0.05$）；与B组相比，C组Tb. Sp明显增高（$P<0.05$）。见表2。

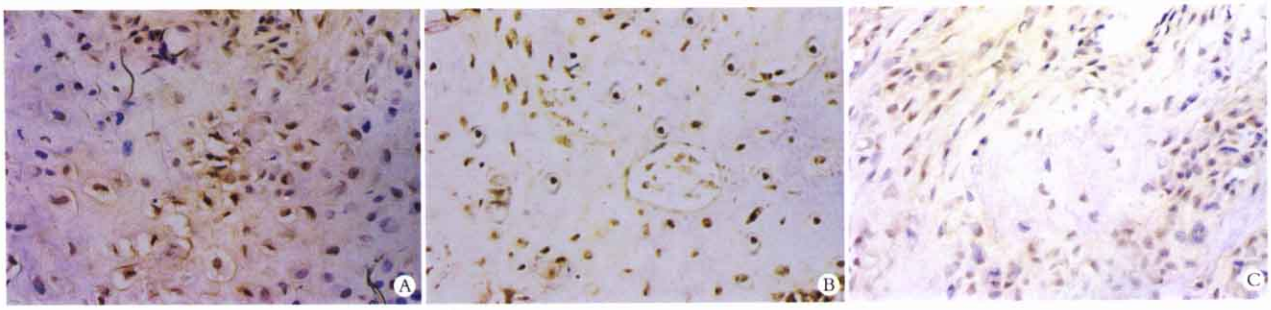
表2 骨形态计量学静态指标测定结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Tb. Ar%	Tb. Th	Tb. N	Tb. Sp
A	6.90±2.41	66.46±14.50	1.16±0.48	1 026.31±256.13
B	6.56±2.66	62.97±13.55	1.09±0.29	1 115.62±317.51
C	2.66±0.64[ab]	53.04±10.28[ab]	0.54±0.12[ab]	4 498.07±512.21[ab]

a：$P<0.05$，与A组比较；b：$P<0.05$，与B组比较

2.6 BMP2 mRNA表达及平均光密度值

A组原位杂交阳性染色出现于部分成骨细胞、骨细胞，阳性着色较深；B组原位杂交阳性染色较广泛出现于成骨细胞、骨细胞及部分间充质细胞，阳性着色深；C组阳性染色细胞少，且阳性着色较浅。与A组相比，B组大鼠椎骨、胫骨上段BMP2 mRNA表达染色平均光密度（average optical density，AOD）显著升高[分别为（0.12±0.021）、（0.20±0.035），$P<0.05$]，C组（0.08±0.032）则有降低趋势，但无统计学差异（$P>0.05$）；与C组比较，B组明显增高[分别为（0.08±0.032）、（0.20±0.035），$P<0.05$]。见图1。



A：正常对照组；B：高脂饲料 + STZ 30 mg/kg 组；C：普通饲料 + STZ 50 mg/kg 组

图 1　各组骨组织 BMP2 的表达（原位杂交 ×400）

2.7　BMP2 mRNA 表达平均光密度值与 FBG、HbA_{1c}、FINS 及血脂相关性分析

BMP-2 平均光密度值与 FINS 有正相关关系（$r = 0.658$，$P < 0.05$），与 FBG、HbA_{1c} 及血脂无明显相关性（$r = 0.113$，$P > 0.05$）。

3　讨论

DM 为具有多种并发症的代谢性疾病，OP 即是其并发症中的一种。高血糖、低胰岛素血症、高血脂可能引起骨代谢的改变、骨密度的降低、骨量的丢失[1,6-8]。DM 发病机制复杂，各种不同糖代谢受损时，尤其伴有肥胖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗及药物影响等情况，OP 的表现复杂，各实验结果也不同[2-4,8]。

本实验中，与 A 组相比，C 组腰椎、股骨、胫骨 BMD 均明显下降，B 组仅腰椎 BMD 有显著差异，股骨、胫骨 BMD 虽有下降趋势，但无统计学意义；与 B 组相比，C 组有下降趋势，也无统计学差异。提示在糖耐量受损早期，血糖升高、胰岛素缺乏、血脂异常、胰岛素敏感性下降、促炎因子释放等都可能会导致骨量丢失，在骨松质表现尤甚。其中血糖升高、胰岛素缺乏对骨量的影响可能更明显。

正常骨小梁呈立体网状结构，在相同骨密度下，骨小梁结构越合理，生物力学性能越好，抗骨折能力也越强。本实验通过光镜和扫描电镜，观察和对比了各组大鼠骨组织形态结构的差异。结果显示，B 组大鼠骨组织形态结构基本正常，而 C 组大鼠骨组织形态结构遭到破坏，用骨形态计量学（bone histomorphometry）方法对骨微结构变化定量分析的结果也相同。这表明 B 组骨微结构并未因血糖增高和血脂异常有明显变化，推测可能与其存在胰岛素抵抗有关，可能因 IR 时常伴有肥胖、高胰岛素血症等对骨起到一定的保护作用。肥胖时外周脂肪组织中睾酮向雌二醇转化及雄烯二酮向雌酮转化较多；肥胖本身又增加骨负荷，刺激骨形成。胰岛素有促进骨细胞内氨基酸蓄积、核苷酸形成、刺激骨胶原合成；促进肾小管上皮细胞对钙、磷的重吸收；刺激肾 1α-羟化酶维持体内活性维生素 D_3 合成，促进钙的吸收等作用。这些可能都在一定程度上促进了骨的形成，维持了骨的微结构，减少了血糖增高，血脂异常导致的骨量丢失，延缓了骨质疏松的发生、发展。但本实验的时间较短，样本量较小，仅提示了糖尿病大鼠早期骨微结构的改变情况。

骨形态发生蛋白（bone morphogenetic protein，BMP）是由成骨细胞和骨细胞分泌的一种低分子量酸性多肽，能诱导血管周围未分化的间充质细胞和骨髓基质细胞分化成为软骨细胞和骨细胞，是一种高效的骨诱导物质[9]。已发现的 16 种 BMP 亚型中，以 BMP-2 骨诱导活性最强，是骨形成和骨折愈合中最重要的细胞因子之一。尽管对 BMP-2 的研究很早就已有报道，但多数是观察其在骨折愈合过程中的作用，BMP-2 在骨质疏松症发病机制中其作用的研究还不深入。有学者发现绝经后骨质疏松症患者血中 BMP 浓度明显降低。动物实验中，有学者发现 BMP-2 基因表达在去势大鼠骨组织局部显著降低[10]，但也有发现去势大鼠骨髓微环境中 BMP-2 表达明显增强[11]。糖尿病时，BMP-2 在骨组织中的表达情况尚少见报道。有报道 IGF-1 促进成骨细胞的增殖、分化以及促进长骨的生长可能是通过增加细胞中 BMP-2 基因表达所介导的[12]。前已述及，高血糖、胰岛素缺乏、胰岛素抵抗、高胰岛素血症等原因可能会造成骨代谢、骨结构的改变，而脂代谢的紊乱及促炎因子的释放也会对 OP 的发生产生影响。这些因素是否会通过影响 BMP-2 在骨组织的表达来影响骨的代谢和微结构呢？因此，本实验利用原位杂交的方法，利用 BMP2 mRNA 特异性寡核苷酸探针对各组大鼠骨组织表达 BMP-2 的情况进行检测。结果显示，B 组大鼠椎骨、胫骨上段 BMP-2 表达染色平均光密度明显高于 A 组（$P < 0.05$），C 组则有降低趋势（$P > 0.05$），B、C 组间比较，B 组明显增高（$P < 0.05$）；即 BMP-2 在伴有 IR 大鼠的骨组织中

的表达是明显增强的。BMP-2 主要是成骨细胞及骨细胞的表达产物，BMP-2 表达的增强说明其成骨活跃，表达降低则提示其成骨功能的不足，两组的差异则说明 IR 可能通过增强 BMP-2 表达来诱导骨形成，延缓 OP 的发生。相关分析结果显示 BMP-2 平均光密度值仅与 FINS 呈正相关关系（$P<0.05$），说明 BMP-2 表达的增强可能主要与 IR 所致的高胰岛素血症有关，胰岛素除前已述及的成骨作用外，还可能通过增强 BMP-2 表达来促进骨形成，这也可能是伴 IR 大鼠骨微结构并无明显破坏的机制之一。尽管高血糖、高血脂、促炎因子的释放会导致骨量的丢失，骨形成的减少，但是否发生骨质疏松引起骨强度的下降取决于骨量和骨结构的综合作用，正因为高胰岛素血症可能对骨微结构的维持有一定作用，BMD 的变化才与骨微结构及力学性能改变不完全一致。另外，BMP-2 的高表达也提示存在高骨转换率的可能，不过这仍只是早期糖尿病大鼠骨组织中的改变情况。

综上所述，不同糖尿病状态下，OP 的发生与诸多因素有关。胰岛素缺乏、高血糖状态下的糖、脂代谢紊乱是影响骨和钙、磷代谢的重要因素，引起骨量的丢失；但伴有 IR 时，肥胖、高胰岛素血症等对骨有一定的保护作用，它们可能通过维持骨的微结构延缓 OP 的发生、发展。

参考文献：

[1] Liu E Y, Wactawski-Wende J, Donahue R P, *et al*. Does low bone mineral density start in post-teenage years in women with type 1 diabetes? [J]. Diabetes Care, 2003, 26(8): 2365 - 2369.

[2] Sahin G, Polat G, Bagis S, *et al*. Study of axial bone mineral density in postmenopausal women with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis related to type 2 diabetes mellitus[J]. J Women Health (Larchmt), 2002, 11(9): 801 - 804.

[3] Yawar A, Zuberi L M, ul-Haque N. Type 2 diabetes and risk of osteoporosis[J]. J Pak Med Assoc, 2005, 55(12): 568 - 569.

[4] Al-Elq A H, Sadat-Ali M. Diabetes mellitus and male osteoporosis. Is there a relationship? [J]. Saudi Med J, 2006, 27(11): 1729 - 1733.

[5] 郭啸华，刘志红，李 恒，等. 高糖高脂饮食诱导的2型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. 中国糖尿病杂志，2002，10(5)：290 - 294.

[6] Tenover J S. Prevalence and management of mild hypogonadism: introduction[J]. Int J Impot Res, 2003, 15 (Suppl 4): S1 - S2.

[7] Willey K A, Singh M A. Battling insulin resistance in elderly obese people with type 2 diabetes: bring on the heavy weights[J]. Diabetes Care, 2003, 26(5): 1580 - 1588.

[8] Xu L, Cheng M, Liu X, *et al*. Bone mineral density and its related factors in elderly male Chinese patients with type 2 diabetes[J]. Arch Med Res, 2007, 38(2): 259 - 264.

[9] 郭书权，许建中. BMP-2 诱导成骨及传递的研究进展[J]. 第三军医大学学报，2005，27(16)：1707 - 1710.

[10] 张 勇，马 平，刘 健，等. 去势大鼠骨中 BMP-2，BMP-7 基因表达[J]. 第四军医大学学报，2000，21(1)：125 - 126.

[11] 陈一冰. 运动对去势雌性大鼠松质骨 BMP-2、TNF-α 表达的影响[J]. 中国运动医学杂志，2003，22(6)：611 - 613.

[12] 梁东春，王宝利，左爱军，等. 胰岛素样生长因子1对成骨细胞中 BMP-2、BMP-7 基因表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志，2004，10(1)：45 - 47.

（编辑 王小寒）

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 x，卡方的符号是希腊字母 χ^2，自由度的符号是希腊文"υ"，不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r"，不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"-"或"+"表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等，不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+3}、O^{-2} 表示。核素的核子素（质量数）应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角，例如：$^{99}Tc^{m}$、$^{113}In^{m}$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称，即不能写成^{131}碘、铟^{113m}、P^{32}、Tc^{99m}。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA 有 rRNA（ribosomal RNA）、tRNA（transfer RNA）、mRNA（messenger RNA）3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写，RNA 应大写。

本刊编辑部