

糖尿病大鼠骨质疏松发病过程中骨桥蛋白变化的实验研究

郑若昆 陈星 张振南 蒋曙光

中图分类号: R363 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)10-0883-04

摘要: **目的** 研究糖尿病大鼠骨质疏松发病过程中骨桥蛋白的表达。**方法** 24只雄性Wistar大鼠随机分成2组,糖尿病大鼠组12只,空白对照组12只,饲养4月后处死动物,检查骨桥蛋白mRNA水平表达。**结果** 糖尿病组骨桥蛋白总RNA提取及RT-PCR、琼脂糖凝胶电泳显示,糖尿病组大鼠在骨质疏松发病过程中,骨桥蛋白在骨组织中高表达,与空白对照组相比,差异具有显著性。**结论** 骨桥蛋白在糖尿病大鼠骨组织有显著性改变,推测骨桥蛋白参与调节骨质疏松发病过程。

关键词: 糖尿病; 骨质疏松; 骨桥蛋白

The experimental study of the changes of osteopontin during the genesis of osteoporosis in diabetic rats ZHENG Ruokun, CHEN Xing, ZHANG Zhennan, et al. Department of Orthopedic Surgery, The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: ZHENG Ruokun, Email: zhengruokun@126.com

Abstract: Objective To investigate the expression of osteopontin (OPN) during the genesis of osteoporosis in diabetes rats. **Methods** Twenty-four healthy male Wistar rats were randomly divided into two groups: the diabetic rat group and the blank control group. Each group had 12 rats. All the rats were executed after being raised for 4 months and the expression of OPN mRNA was examined. **Results** The total RNA extraction, RT-PCR, and agarose gel electrophoresis showed that OPN in diabetic rat group was overexpressed during the genesis of osteoporosis. The difference was significant compared with that in blank control group. **Conclusion** The level of OPN is significantly changed in the bone tissue of diabetic rats, and we speculate that OPN may participate in the regulation of the genesis of osteoporosis

Key words: Diabetes; Osteoporosis; Osteopontin

糖尿病发病率在全球范围内呈上升趋势,糖尿病合并骨质疏松是一种常见的危害性很大的糖尿病慢性并发症。骨质疏松一旦发生,不可逆转,所以重在预防。了解它的发病机理,提前治疗就显得非常重要。本实验研究糖尿病大鼠继发骨质疏松骨组织中骨桥蛋白的表达情况,探讨骨桥蛋白在糖尿病继发骨质疏松过程中的调控机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

24只成年健康雄性Wistar大鼠(河南省实验动物中心提供),月龄2月,重量 200 ± 10 g。实验试

剂:Trizol、RT试剂盒、PCR试剂盒、Maker均由Transgene公司提供,DEPC由Sigma公司提供,引物由北京博大泰克公司提供,

大鼠骨钙素试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供。

1.2 实验模型的建立

随机选用12只雄性Wistar大鼠,禁食12 h,一次腹腔注射STZ 55 mg/kg(溶于柠檬酸缓冲液中,pH4.5),7 d后测定血糖,以空腹血糖水平16.7 mmol/L(300 mg/kg)为糖尿病模型成功的标准。术后不使用抗生素,任其自由活动,统一条件喂养,每周称量动物体重1次。对照组12只雄性Wistar大鼠,注射等量柠檬酸缓冲液,普通饲料喂养,自由饮用自来水,其余条件同观察组。

作者单位: 450000 郑州,河南中医学院第一附属医院

通讯作者: 郑若昆,Email:zhengruokun@126.com

1.3 指标观测

1.3.1 骨密度测定

剔除股骨和胫骨表面的软组织,以 Lunar Prodigy 双能 X 线骨密度仪测定右侧胫骨和股骨的骨矿物密度,用小动物分析软件进行分析。

1.3.2 尿钙(Ca)、尿肌酐(Cr)及 Ca/Cr

实验进行 4 个月后,各组实验大鼠实验完毕当晚置代谢饲养笼饲养 12h,次晨收集 12h 空腹尿液,经自动生化仪测定尿钙(calcium, Ca)与尿肌酐(creatinine, Cr),计算出 Ca/Cr 比值。

1.3.3 血钙、骨钙素

眼球摘除法取血,置于 37℃ 水浴 30 min 加速血液凝固,然后置于 3000 r/min 离心机上离心 20 min,用吸管吸取上层血清按试剂盒操作说明在全自动测定仪上检测血钙。酶联免疫法(ELISA)测定血清骨钙素(bone gal protein, BGP),批内及批间 CV 小于 10%,单位 ng/mL。

1.3.4 RT-PCR 法检测骨桥蛋白 mRNA 水平表达

组织中 RNA 的提取采用 Trizol 试剂盒提供的方法,具体步骤为:

(1) 研磨组织:将高温消毒的研钵置冰上,取一小块骨(至研钵内,加入液氮研磨成细颗粒状后加入 Trizol 1 mL,边研磨边加入液氮至组织完全研碎。

(2) 分离 RNA:将组织转移至 0.1% DEPC 处理过的 EP 管,室温静置 5 min。加入氯仿 0.2 mL,剧烈混匀 15 s,室温静置 3 min;4℃ 12000 r/min 离心 15 min,上清液中即含有所需之 RNA。

(3) 沉淀 RNA:取上清液至另一 EP 管,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min;4℃ 12000 r/min 离心 15 min。

(4) 洗涤 RNA:弃上清,加入 75% 冷乙醇(DEPC 水配制)1 mL,颠倒混匀,清洗、悬浮沉淀,4℃ 9000 r/min 离心 10 min,弃上清,室温晾干。

(5) 溶解 RNA:将 RNA 溶于 30 μL DEPC 水中,-80℃ 保存或进行后续实验。

(6) 测定 RNA 浓度:取 5 μLRNA 样品,加入 DEPC 水 1.5 mL,于紫外分光光度计上测定 260 nm 和 280 nm 波长处的 OD 值,OD260/OD280 在 1.6 ~ 2.0 之间为所需 RNA 纯度,RNA 浓度计算公式如下:

提取 RNA 浓度(μg/μL) = OD260 值 × 0.04 × 稀释倍数

cDNA 的合成及 PCR RT 反应:反应体系如下:

万方数据

Components	Volume
Total RNA/mRNA	50 ng ~ 5 μg/5 ~ 500 ng
Anchored Oligo(dT) ₁₈ (0.5 μg/μL)	1 μL
or Random Primer(N9) (0.1 μg/μL)	1 μL
or GSP	2 pmol
2 × ES Reaction Mix	10 μL
Easy Script RT/RI Enzyme Mix	1 μL
RNase-free Water to	20 μL

轻轻混匀,42℃ 孵育 30 min,85℃ 加热 5 min。取 2 μL 进行后续扩增,其余 -80℃ 保存。

PCR 扩增:取逆转录产物 2 μL,按以下体系加入,

Components	Volume	Final Concentration
Template DNA	<0.5 μl	as required
Forward Primer(10 μM)	1 ~ 2 μL	0.2 ~ 0.4 μM each
Reverse Primer(10 μM)	1 ~ 2 μL	0.2 ~ 0.4 μM each
10 × Easy Taq Buffer(含 Mg ²⁺)	5 μL	1 ×
2.5 mM dNTPs	4 μL	0.2 mM
Easy Taq DNA Polymerase	0.5 μL	2.5 units
ddH ₂ O to final volume	50 μL	Not applicable

其中 OPN 引物序列为: Sense: 5'-TGAACCTCGGATGAATCTGACG-3', Antisense: 5'-CTGGGATGACCTTGATAGCC-3',扩增长度:264 bp,退火温度为 56℃。内参 β-actin 的引物序列为 β-actin, sense: 5'-AATCGTGCCTGACATTAAGAG-3', antisense: 5'-CATTGCCGATAGTGATGACCT-3',扩增长度为:137 bp,退火温度为:55℃。扩增条件如下:94℃ 预变性 2 min,1 个循环;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;72℃ 总延伸 6 min。

琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物:取 5 μL 扩增产物与缓冲液混合后加入琼脂糖凝胶的加样孔中,进行电泳。电泳条件为 2% 琼脂糖凝胶,电压 4 ~ 10 V/cm。EB 染色,在紫外线投射仪下观察电泳条带,用 D-140 图像记录分析系统进行分析,目的基因 OPN mRNA 的表达量以 OPN 的 DNA 条带和 β-actin 的 DNA 条带灰度值比值计算。

1.3.5 骨组织形态学观察

取出大鼠左侧股骨近端在 10% Formalin 液中固定,0.5% 硝酸脱钙,每天更换 1 次脱钙液,直至大头针可刺入为止,流水冲洗 24h 以后,以梯度酒精逐渐脱水,透明石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,观察骨组织显微结构的改变。

1.4 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计分析软件。均采用双侧检验,取检验水准 α = 0.05。对服从合正态分布的计

量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述;对不服从正态分布的计量资料采用中位数 ± 四分位数 ($M \pm Q$) 进行统计描述;分类变量采用频数(率/构成比)进行统计描述。两组计量资料的比较采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 Lunar Prodigy 双能 X 线骨密度仪测定

饲养 4 月后,观察组股骨骨密度显著低于对照组 ($P < 0.05$),结果见表 1。

表 1 大鼠左股骨干骨密度值($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

组别	n	BMD
对照	12	0.217 ± 0.022
实验	12	0.173 ± 0.031

注: $t = 4.0097, P = 0.0006 < 0.05$

2.2 尿钙 (Ca)、尿肌酐 (Cr) 及 Ca/Cr、血清钙 (Ca)、血清骨钙素 (BGP) 检测

尿钙 (Ca)、尿肌酐 (Cr) 及 Ca/Cr 水平:尿钙 (Ca)、尿肌酐 (Cr) 及尿 Ca/Cr 水平观察组明显增高,与正常对照组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$)。

血清钙 (Ca) 含量:血清钙含量观察组与正常对照组比较,无显著性差异 ($P < 0.05$)。

血清骨钙素 (BGP) 含量:血清骨钙素观察组明显降低,与正常对照组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$)

结果见表 2。

表 2 不同组别雄性 Wistar 大鼠 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BGP (ng/mL) ¹	尿钙 (mmol/L) ²	Ca/Cr ³
对照	12	43.27 ± 4.58	1.59 ± 0.48	0.156 ± 0.082
实验	12	38.51 ± 3.92	2.18 ± 0.61	0.162 ± 0.137

注: $t_1 = 2.7352, P_1 = 0.0121 < 0.05; t_2 = 2.6331, P_2 = 0.0152 < 0.05; t_3 = 0.2162, P_3 = 0.8269 < 0.05$

2.3 骨桥蛋白 mRNA 水平表达

观察组骨桥蛋白 mRNA 高于对照组,组间差别

在 $\alpha = 0.05$ 水准上有显著的统计学意义 ($P < 0.05$),结果见表 3,图 1。

表 3 不同组别雄性 Wistar 大鼠 OPNmRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OPNmRNA
对照	12	0.126 ± 0.011
实验	12	0.543 ± 0.037

注: $t = 37.4226, P = 0.0001 < 0.05$

经统计学分析,两组大鼠骨桥蛋白 mRNA 在骨骼表达水平,原始数据均呈正态性分布,且方差齐。

2.4 光学显微镜结果

对照组:骨小梁粗壮饱满,着色较深,形态结构完整,相互连接成网,粗细一致,分布均匀,无断裂,骨髓腔相对较小,拱状结构完整,骨板层结构致密,排列有序,无吸收陷窝。

观察组:骨皮质变薄,骨小梁分布稀疏,排列杂乱扭曲,粗细不等,着色淡,形态结构不完整,连续性差,大量断裂现象,骨髓腔大小不匀,吸收陷窝明显。

3 讨论

由于我国近些年膳食结构发生了很大变化,糖尿病 (DM) 的发病率增加,随着医疗卫生条件的提高,DM 患者生存寿命越来越高,DM 的并发症也越来越多。糖尿病并发骨质疏松症是近几年才开始被医学界认识,事实上,糖尿病合并骨质疏松是一种常见的糖尿病慢性并发症。

糖尿病性骨质疏松发病率较高 (24% ~ 52%)^[1]。容易导致骨折 (常见于腕部、椎体、髋关节),致残率很高。骨质疏松一旦发生,不可逆转,所以了解它的发病机制,提前预防治疗就显得非常重要。

关于糖尿病诱发骨质疏松的机理,目前报道的有:1. 胰岛素缺乏:胰岛素缺乏可导致骨基质成熟和转换下降,骨基质分解,引起骨质疏松^[2];胰岛素缺乏可影响维生素 D 的代谢^[3],导致骨密度下降。

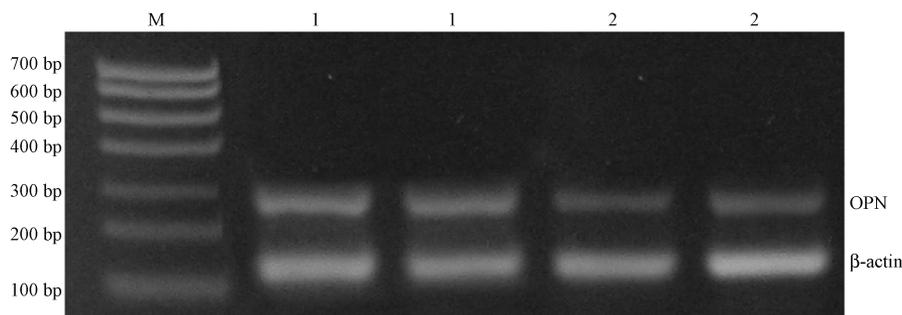


图 1 不同组别大鼠骨组织中骨桥蛋白 mRNA 的表达 (M: marker; 1: 实验组; 2: 对照组)

2. 胰岛素样生长因子(IGF): IGF 可以增加成骨细胞数目;同时抑制骨胶原降解,对于骨量的维持起重要作用^[4]。高血糖抑制 IGF 合成和释放。3. 钙磷代谢异常:高血糖时渗透性利尿作用将大量钙、磷、镁离子排出体外,并阻止肾小管对钙、磷、镁的重吸收,加重骨盐丢失。4. 其他:激素水平的变化,晚期糖基化终末产物,瘦素,骨保护素,脂代谢紊乱等等。

综上所述,DM 并发骨质疏松(OP)的机制和原因错综复杂,目前尚无统一意见,有些实验研究得出的结论相差很远,甚至互相矛盾。因此,深入开展研究,进一步明确 DM 与 OP 的关系,了解其糖尿病继发骨质疏松的发病机理对于骨质疏松的防治至为重要。

Junaid 等^[5]报道,高糖培养可通过 P13K 途径诱导肾小管细胞骨桥蛋白(OPN)的表达。高糖刺激血管平滑肌细胞骨桥蛋白的表达上调的可能机制:高糖浓度可激活蛋白激酶 C(PKC),可进一步激活 RHO/RHO 激酶系统;其次葡萄糖的终末代谢产物氨基己糖增加亦可使 RHO/RHO 激酶系统激活, RHO/RHO 激酶活化→激活细胞外信号调节激酶(ERK)→有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)激活→AP-1, AP-1 作为 DNA 结合蛋白,可与平滑肌细胞中骨桥蛋白基因启动子结合,促进 OPN 基因表达^[6]。我们试验中发现,糖尿病大鼠胫骨骨组织中 OPN mRNA 含量相比对照组明显增高,差异具有统计学意义。

骨桥蛋白首先于 1986 年在成骨细胞中发现。OPN 翻译后加工主要是通过 OPN 的磷酸化过程掺入唾液酸和硫酸盐基^[7],磷酸化的 OPN 可调节成骨细胞和破骨细胞的功能,对其与各种细胞的结合能力也有一定的影响^[8],从而影响了骨重建-破坏的平衡。OPN 对于破骨细胞的生理功能非常重要,它可促进破骨细胞与骨基质的黏附,诱导破骨细胞的破骨过程。Uemura 等^[9]证实 OPN 可通过与 $\alpha v\beta 3$ 整合素受体间相互作用来上调破骨细胞的活性,OPN 可诱导破骨细胞表达金属蛋白酶-9、组织蛋白酶-K

和 TRAP 来降解骨基质。这可能是糖尿病继发骨质疏松重要的发病机制。

综上所述,糖尿病大鼠继发骨质疏松是多因素、多环节,相互影响共同诱发。其中糖尿病高血糖可以引起的 OPN 的高表达,从而上调破骨细胞的活性,可以单独、或与其他致病因子共同引起骨质疏松。这可能是糖尿病继发骨质疏松的关键点。

【参 考 文 献】

- [1] 向明珠,杨柳,李海平,等. 糖尿病患者的骨钙素与骨密度变化及临床意义. 新医学,2000,31(1):80-81.
- [2] Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, et al. The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. J Orthop Res, 1988, 6(3):317-320.
- [3] Levy JR. Demonstration of insulin receptors and modulation of alkaline phosphatase activity by insulin in rat osteoblastic cells. Endocrinology, 1986, 119(4):1786-1792.
- [4] Dominguez LJ, Mumtore M, Quana E, et al. Osteoporosis and diabetes. Reumatismo, 2004, 56(4):235-241.
- [5] Junaid A, Amara FM. Osteopontin: correlation with interstitial fibrosis in human diabetic kidney and P13-kinase mediated enhancement of expression by glucose in human proximal tubular epithelial cells. Histopathology, 2004, 44(2):136-146.
- [6] Takemoto M, Yokote K, Yazamaki M, et al. Enhanced expression of osteopontin by high glucose in cultured rat aortic smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258:722-726.
- [7] Safran JB, Butler WT, Faxeah-Carson MC. Modulation of OPN posttranslational state by 1 α ,25-(OH)₂D₃ dependence on Ca²⁺ in flux. J Biol Chem, 1998, 273:29935-29941.
- [8] Ashkar S, Weber GF, Panontsakopoulou V, et al. Eta-1 (OPN): an early component of type I (cell-mediated) immunity. Science, 2000, 287:860-864.
- [9] Uemura T, Liu YK, Kuboki Y. Preliminary communication. MRNA expression of MT 1-MMP, MMP-9, cathepsin K, and TRAP in highly enriched osteoclasts cultured on several matrix proteins and ivory surfaces. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64:1771-1773.

(收稿日期:2012-04-06,修回日期:2012-06-02)

(上接第 939 页)

to liver specific clearance due to liver-specific inactivation to CECAM 1. J Bone, 2010, 46(4):1138-1145.

- [9] 马尊良,陈超,陈若平,等. 胰岛素治疗对 2 型糖尿病患者骨代谢的影响. 中国保健杂志, 2011, 14(2):134-137.
- [10] 瞿木绪,董砚虎,王海燕,等. 糖尿病对骨密度及相关激素的影响. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(1):28-31.
- [11] 孙衍. 胰岛素强化治疗对 2 型糖尿病 β 细胞功能的影响. 实用糖尿病杂志, 2011, 7(1):63-64.

万方数据

- [12] 郭世级. 骨质疏松与临床. 天津科学技术出版社, 2001:391-398.
- [13] 邓浩华,徐焱成. 男性 2 型糖尿病患者骨质疏松相关型糖尿病患者骨质疏松相关因素分析. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(3):75-76.
- [14] 梁军. 关于 2 型糖尿病病人应用胰岛素治疗的新概念. 中国社区医生, 2011, 2(13):124.

(收稿日期:2012-04-20,修回日期:2012-06-12)