

· 论 著 ·

阿法骨化醇对糖尿病小鼠骨组织的作用

刁腾月 张岩* 潘海 张方怡 刘亚茹 李陇燕

上海理工大学 系统生物医学研究中心, 上海 200093

中图分类号: R336 R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 11-1130-05

摘要: **目的** 考察阿法骨化醇对糖尿病小鼠骨组织的作用。 **方法** 使用腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病模型。ELISA 方法检测血清骨代谢指标。微焦点定量 CT 检测骨密度、并经三维重建获得微观结构。使用 RT-PCR、蛋白印迹分别检测基因、蛋白表达。 **结果** 糖尿病小鼠血清 B-ALP、TRACP-5b、尿钙水平升高, 股骨远端的骨密度降低, 骨组织 RAS 组分 AGT、Renin-R、ANG II 表达显著上调。阿法骨化醇降低糖尿病小鼠血清 TRACP-5b、尿钙水平, 提高骨密度, 抑制骨组织高 RAS 活性, 显著下调破骨因子 CAII、MMP-9 表达。 **结论** 阿法骨化醇通过抑制糖尿病小鼠骨组织 RAS 活性而防治糖尿病性骨质疏松症。

关键词: 阿法骨化醇; 糖尿病; 骨组织; 肾素-血管紧张素系统

Effect of alfa-calcidol on bone tissue in diabetic mice

DIAO Tengyue, ZHANG Yan, PAN Hai, ZHANG Fangyi, LIU Yaru, LI Longyan

Systematic Biomedical Research Center, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

Corresponding author: ZHANG Yan, Email: medicineyan@usst.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the effect of alfa-calcidol on bone tissue in diabetic mice. **Methods** The diabetic mouse model was established using intraperitoneal injection of streptozotocin. Serum bone metabolic markers were detected using ELISA. Bone mineral density was detected using micro-CT, and the three-dimensional microstructure was reconstructed. Gene expression was detected using RT-PCR, and protein expression was detected using Western blotting. **Results** The serum levels of B-ALP and TRACP-5b and the urinary level of calcium increased in diabetic mice. The bone mineral density of the distal femur reduced, while the expression of RAS components, including AGT, Renin-R, and ANG II, increased significantly. Alfa-calcidol could reduce the level of serum TRACP-5b and urine Ca, improve the bone mineral density, inhibit the high activity of renin-angiotensin system (RAS) in bone tissue, and down-regulate the expression of osteoclastic factors, including CAII and MMP-9, in diabetic mice. **Conclusion** Alfa-calcidol can prevent diabetes-induced osteoporosis by inhibiting the RAS activity in bone tissue in diabetic mice.

Key words: Alfa-calcidol; Diabetes mellitus; Bone tissue; Renin-angiotensin system

近年基础研究发现, 肾素-血管紧张素系统(RAS)组分, 如血管紧张素转化酶(ACE)、肾素、血管紧张素 II 受体等表达于小鼠近端胫骨^[1], 这表明 RAS 存在于骨组织中, 进一步研究发现它对骨骼的生长、发育、代谢发挥着重要的调控作用^[2, 3]。此外, 流行病学研究报道, 对围绝经期妇女进行的 Cohort 研究^[4] 和对中国老年人开展的横断面研究^[5], 发现 ACE 抑制剂和血管紧张素 II 受体抑制剂具有增加骨量和降低骨折风险的作用。据此, 骨组织 RAS 是调控骨代谢的一个重要局部调节系统。

糖尿病可诱导体内多个组织、器官发生局部病变, 即糖尿病并发症。近来研究显示, 这些病变与局部组织的 RAS 活性升高相关^[6-8]。我们最近研究结果显示, 使用链脲佐菌素 STZ 诱导的糖尿病小鼠, 其骨组织 RAS 活性升高, 引起骨代谢异常, 骨量丢失^[9]。此外, 我们以维生素 D 受体(VDR)基因敲除小鼠为动物模型及取自 VDR 小鼠的肾小管细胞为体外生物模型, 研究证实, 维生素 D 信号通路可直接抑制 RAS 活性^[10, 11]。在本实验中, 我们研究了糖尿病小鼠经服维生素 D 药物阿法骨化醇后, 是否能够通过抑制骨组织局部 RAS 活性, 而改善糖尿病引起的骨代谢异常。

基金项目: 上海市科学技术委员会资助(10PJ1407700); 中国博士后科学基金资助项目(2012M511115)

* 通讯作者: 张岩, Email: medicineyan@usst.edu.cn

1 材料与方法

1.1 动物处理

8 周龄 DBA/2J 小鼠,体重 20 ~ 22 g,由上海市斯莱克实验动物中心提供。动物适应环境 1 周后,腹腔注射链脲佐菌素 (STZ,40 mg/kg),连续 5 天。注射完成后 1 周,测定空腹血糖 (CONTOUR, Bayer)。根据血糖值,将实验动物随机分成以下 3 组:正常对照组;糖尿病组;糖尿病 + 阿法骨化醇组 (0.5 μg/kg,ip),每组 10 只动物。经药物处理 8 周后,测定空腹血糖,称量体重,取血,分离血清,收集股骨与胫骨,待生物学分析。

1.2 生化指标测定

使用钙、肌酐检测试剂盒 (中生北控,北京,中国)测定血钙、尿钙、尿肌酐浓度;使用 ELISA 试剂盒结合酶标仪 (Bio-Tek,美国),测定血清骨转换指标,包括骨特异性碱性磷酸酶 (B-ALP) 和酸性磷酸酶 (TRACP-5b)。

1.3 骨密度测定

使用微焦点定量 CT (Scanco Medical, 瑞士)检测股骨远端松质骨的骨密度,并使用系统分析软件 (μCT Evaluation Program, Image Processing Language v. 5.0A, Scanco)对该部位的松质骨微观结构进行三维重建。

1.4 RT-PCR

使用 Trizol (Invitrogen, 美国)提取胫骨 RNA,经

M-MLV 反转录酶 (Invitrogen) 制备 cDNA,扩增 RAS 组分、破骨因子 MMP9、CAII,以 GAPDH 作为内参基因,目标基因引物序列参见文献^[12]。使用凝胶成像系统 (Syngene, 英国)检测基因表达、拍照并定量。

1.5 蛋白表达测定

使用 Laemmli 蛋白裂解液提取股骨蛋白,经 Bradford 法测定蛋白浓度后,取 50 μg 蛋白上样,再经 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转移、一抗、二抗孵育,最后使用红外激光双色成像系统 (Licor, 美国)检测蛋白表达并拍照,使用 Odyssey Application Software version 3.0 进行蛋白表达定量。

1.6 数据分析

实验数据以 Mean ± SEM 表示。使用双尾 Student's *t* 检验组间差异,*P* < 0.05 表明二组间有显著差异。

2 结果

2.1 基础生理指标

小鼠在 STZ 注射 8 周后,糖尿病组的空腹血糖值显著高于正常对照组 (表 1, *P* < 0.001),而体重显著降低 (表 1, *P* < 0.001)。糖尿病小鼠经阿法骨化醇处理后,与糖尿病组比较,其空腹血糖与体重未发生明显改变,但可以明显抑制糖尿病小鼠的尿钙排泄增加 (*P* < 0.05)。各实验组血钙水平没有统计学差异。

表 1 各实验组小鼠空腹血糖、体重、血钙、尿钙数据

Table 1 Data of fasting blood glucose, body weight, serum calcium, and urinary calcium of mice in each group				
组别	空腹血糖 (mmol/L)	体重 (g)	血钙 (mg/dl)	尿钙/肌酐 (mg/mg)
正常对照组	8.5 ± 0.6	29.8 ± 0.8	9.00 ± 0.24	0.047 ± 0.012
糖尿病组	27.7 ± 1.9 ***	22.5 ± 0.9 ***	8.95 ± 0.44	0.113 ± 0.033 *
阿法骨化醇组	26.5 ± 1.2	23.4 ± 0.9	9.88 ± 0.40	0.027 ± 0.007 #

* *P* < 0.05, *** *P* < 0.001, vs. 正常对照组; # *P* < 0.05, vs. 糖尿病组

2.2 骨代谢指标

测定血清骨特异性碱性磷酸酶 (B-ALP) 和酸性磷酸酶 (TRACP-5b) 含量可分别反映生物体内骨形成与骨吸收的活性。糖尿病组小鼠血清 B-ALP 含量显著升高 (图 1A, *P* < 0.05),而 TRACP-5b 水平也有升高趋势 (图 1B)。糖尿病小鼠经阿法骨化醇处理后,血清 B-ALP 水平显著提升 (*P* < 0.05),而血清 TRACP-5B 水平显著降低 (*P* < 0.05)。

2.3 股骨远端松质骨特性

图 2 结果显示,糖尿病小鼠股骨远端骨小梁数

目减少,小梁网织结构破坏,骨量减少,而药物组可改善以上病理变化。对该部位的定量数据也表明,相对于正常对照组 (611 ± 12 mg HA),糖尿病小鼠股骨远端松质骨的骨密度显著降低 (583 ± 8 mg HA, *P* < 0.05),而阿法骨化醇能够明显提高糖尿病小鼠该部位的骨密度 (606 ± 9 mg HA, *P* < 0.05)。

2.4 骨组织 RAS 组分表达

对小鼠胫骨基因表达检测 (图 3) 及股骨蛋白表达检测 (图 4) 结果显示,糖尿病诱导小鼠骨组织

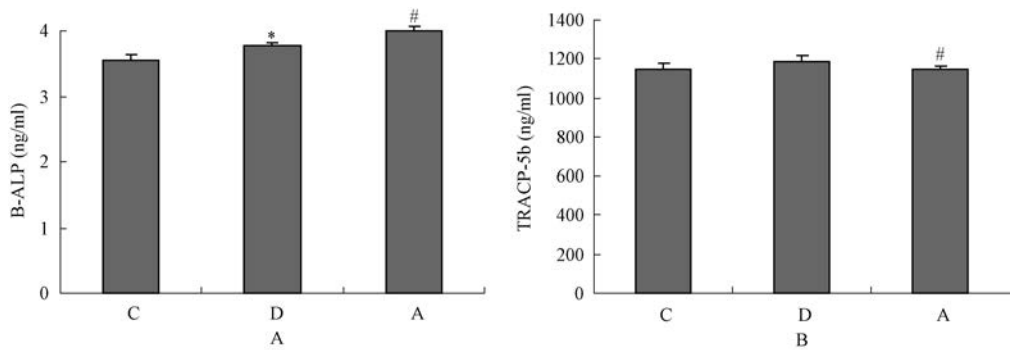


图 1 各实验组血清骨特异性碱性磷酸酶 (B-ALP) 和酸性磷酸酶 (TRACP-5b) 水平

C: 正常对照组; D: 糖尿病组; A: 阿法骨化醇组。* $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D。

Fig. 1 Serum levels of B-ALP and TRACP-5b of mice in each experimental group

C: Normal control group; D: Diabetic group; A: Alfa-calcidol group. * $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D.

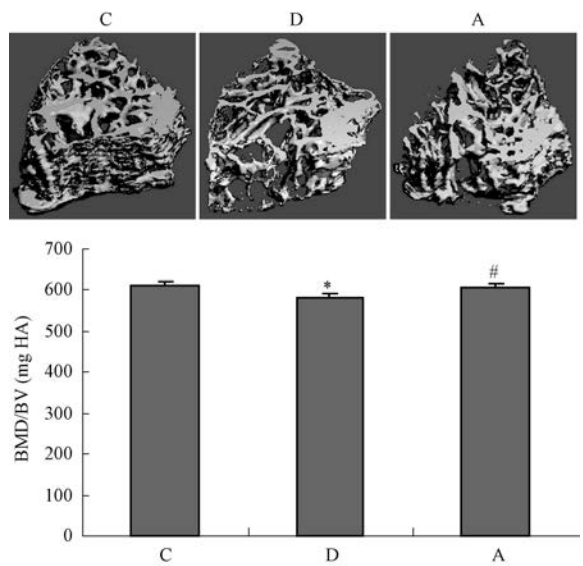


图 2 各实验组小鼠股骨远端松质骨的三维立体结构及骨密度

C: 正常对照组; D: 糖尿病组; A: 阿法骨化醇组。* $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D

Fig. 2 Three-dimensional microstructure and bone mineral density of the cancellous bone of the distal femur of mice in each experimental group

C: Normal control group; D: Diabetic group; A: Alfa-calcidol group. * $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D.

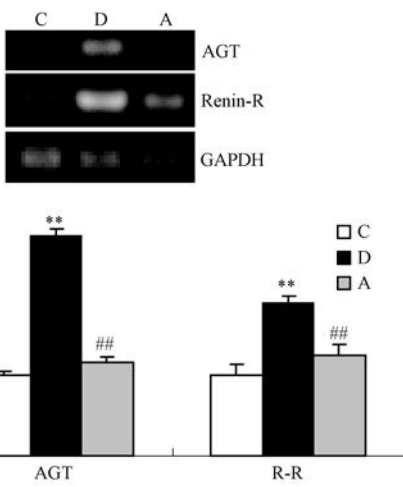


图 3 小鼠胫骨 RAS 组分血管紧张素原 (AGT)、肾素受体 (Renin-R) 基因表达

C: 正常对照组; D: 糖尿病组; A: 阿法骨化醇组。** $P < 0.01$, vs. C; ## $P < 0.01$, vs. D

Fig. 3 Gene expression of RAS components, angiotensinogen (AGT) and renin receptor (Renin-R) in the tibia in mice

C: Normal control group; D: Diabetic group; A: Alfa-calcidol group. * $P < 0.01$, vs. C; # $P < 0.01$, vs. D.

AGT ($P < 0.01$)、Renin-R ($P < 0.01$) 表达上调, 从而引起 ANG II ($P < 0.05$) 生成增加。阿法骨化醇可有效降低糖尿病鼠骨组织 AGT ($P < 0.01$)、Renin-R ($P < 0.01$)、ANG II ($P < 0.05$) 的表达丰度。

2.5 骨组织破骨因子表达

对小鼠胫骨破骨因子碳酸酐酶 CAII、基质金属蛋白酶 MMP-9 的基因表达检测结果显示 (图 5), 糖

尿病小鼠胫骨 CAII 表达显著上调 ($P < 0.01$)。与糖尿病组相比, 阿法骨化醇显著下调小鼠胫骨 CAII ($P < 0.05$)、MMP-9 ($P < 0.05$) 的 mRNA 表达。

3 讨论

本研究中, 阿法骨化醇未能改善糖尿病小鼠的高空腹血糖值、体重减轻等生理指标, 这同我们之前对维生素 D 类似物 Paricalcitol、Doxercalciferol 在糖尿病动物模型上的研究结果相符^[13-15]。糖尿病小鼠血清骨转换指标 B-ALP、TRACP-5b 较正常对照组

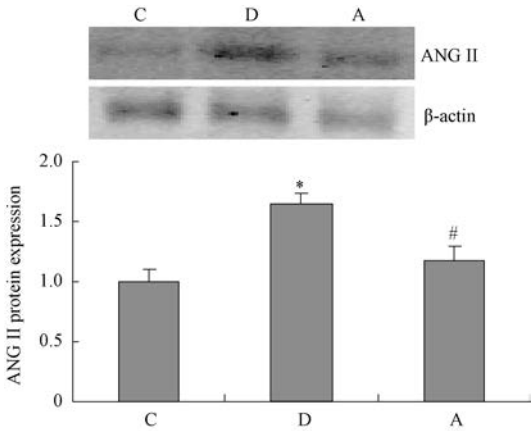


图 4 小鼠股骨血管紧张素 II (ANG II) 蛋白表达
C: 正常对照组; D: 糖尿病组; A: 阿法骨化醇组。
* $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D
Fig. 4 Protein expression of angiotensin II (ANG II) in the femur in mice
C: Normal control group; D: Diabetic group; A: Alfa-calcidol group. * $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D.

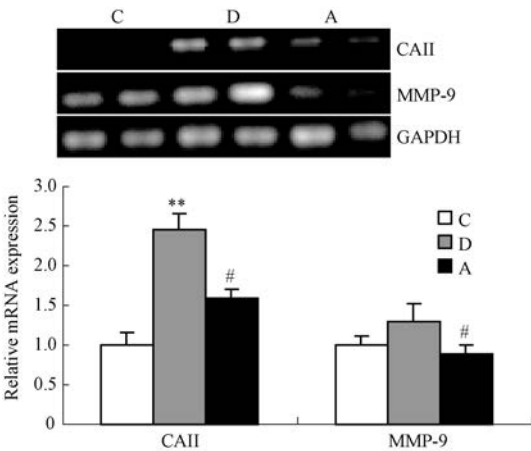


图 5 小鼠胫骨破骨因子的基因表达
C: 正常对照组; D: 糖尿病组; A: 阿法骨化醇组。
** $P < 0.01$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D
Fig. 5 Gene expression of osteoclastic factors in the tibia in mice
C: Normal control group; D: Diabetic group; A: Alfa-calcidol group. * $P < 0.05$, vs. C; # $P < 0.05$, vs. D.

都有升高,说明糖尿病小鼠处于高骨转换状态,并使糖尿病小鼠发生高骨转换型骨丢失,引起糖尿病小鼠骨质疏松症的发生。

糖尿病小鼠尿钙排泄增加,表明小鼠体内钙质流失增加,与骨密度定量检测结果相符,而糖尿病小鼠经阿法骨化醇干预后,尿钙明显恢复至正常水平,同时,有效改善骨密度,维持松质骨较好的微观架

构,从而提高骨质量。本实验结果提示阿法骨化醇不仅能够防治原发性骨质疏松症^[16],对于糖尿病性骨质疏松也有较好治疗作用。

通过对骨组织 RAS 组分的检测结果,发现糖尿病鼠骨组织 AGT、Renin-R、ANG II 水平升高,表明骨组织肾素 (Renin) 信号通路、RAS 效应分子 ANG II 信号通路增强,从而造成骨组织的局部损伤。此外,已有研究显示,ANG II 可通过作用于成骨细胞,促其分泌 VEGF、RANKL 等细胞因子,这些因子可诱导破骨细胞的成熟,刺激骨吸收活性增强^[17, 18],这与我们血清学的检测结果发现代表骨吸收活性的 TRACP-5b 水平升高相一致。同时,也与本实验中骨组织破骨因子表达的测定结果相符。破骨因子碳酸酐酶 CAII、基质金属蛋白酶 MMP-9 能够分别促进骨矿局部无机质与有机质的降解,增强破骨吸收^[19, 20]。

本研究中,阿法骨化醇能够通过有效抑制糖尿病引起的骨组织 RAS 活性增强,减少活性肽 ANG II 生成,从而下调破骨因子的表达,降低骨吸收活性,并能够明显提高松质骨的骨量。我们之前的研究结果显示,维生素 D 可通过抑制肾脏 RAS 活性,而改善长期高血糖状态^[13-15]或单侧输尿管结扎^[10]引起的小鼠肾脏功能低下,恢复肾功能,阻止肾炎、纤维化的发生。可以看到,维生素 D 对于糖尿病引起的微血管病变在肾脏、骨骼系统出现的并发症都有较好改善作用。

本研究结果,首次提出阿法骨化醇通过作用于骨组织 RAS 而维护骨骼健康,这为深入理解维生素 D 保护骨骼的作用机制提出一个新的角度。维生素 D 对糖尿病合并骨质疏松患者骨骼系统的作用以及维生素 D 对糖尿病引起其他局部组织病变的作用还有待进一步的研究。

【 参 考 文 献 】

[1] Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, et al. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass[J]. J Biol Chem, 2009, 284(8): 4857-4864.

[2] Asaba Y, Ito M, Fumoto T, et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(2): 241-250.

[3] Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts[J]. FASEB J, 2008, 22(7): 2465-2475.

[4] García-Testal A, Monzó A, Rabanaque G, et al. Evolution of the bone mass of hypertense menopausal women in treatment with fosinopril[J]. Med Clin (Bare), 2006, 127(18): 692-694.

- [5] Lynn H, Kwok T, Wong SY, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese[J]. Bone, 2006, 38(4): 584-588.
- [6] Miyashita Y, Saiki A, Endo K, et al. Effects of olmesartan, an angiotensin II receptor blocker, and amlodipine, a calcium channel blocker, on Cardio-Ankle Vascular Index (CAVI) in type 2 diabetic patients with hypertension [J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16(5): 621-626.
- [7] Vijan SG. Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs), not angiotensin receptor blockers (ARBs), are preferred and effective mode of therapy in high cardiovascular risk patients[J]. J Indian Med Assoc, 2009, 107(3): 178-182.
- [8] Robles NR, Romero B, Fernandez-Carbonero E, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors versus angiotensin receptor blockers for diabetic nephropathy: a retrospective comparison[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2009, 10(4): 195-200.
- [9] Zhang Y, Diao TY, Gu SS, et al. Effects of angiotensin II type 1 receptor blocker on bones in mice with type 1 diabetes induced by streptozotocin[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst (in press)
- [10] Zhang Y, Kong J, Chang A, et al. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis in obstructive nephropathy by suppressing the renin-angiotensin system[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(6): 966-973.
- [11] Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system[J]. J Cell Biochem, 2003, 88(2): 327-331.
- [12] Gu SS, Zhang Y, Li XL, et al. Involvement of the skeletal renin-angiotensin system in age-related osteoporosis of ageing mice[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(7): 1367-1371.
- [13] Zhang Y, Deb DK, Kong J, et al. Long-term therapeutic effect of vitamin D analog Doxercalciferol on diabetic nephropathy: strong synergism with AT1 receptor antagonist[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(3): F791-801.
- [14] Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 receptor blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(41): 15896-15901.
- [15] Deb DK, Sun T, Wong KE, et al. Combined vitamin D analog and AT1 receptor antagonist synergistically block the development of kidney disease in a model of type 2 diabetes[J]. Kidney Int, 2010, 77(11): 1000-1009.
- [16] Kubodera N. D-hormone derivatives for the treatment of osteoporosis: from alfacalcidol to eldecalcitol[J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(12): 1416-1422.
- [17] Asaba Y, Ito M, Fumoto T, et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(2): 241-250.
- [18] Guan XX, Zhou Y, Li JY. Reciprocal roles of angiotensin II and angiotensin II receptors blockade (ARB) in regulating Cbfa1/RANKL via cAMP signaling pathway: possible mechanism for hypertension-related osteoporosis and antagonistic effect of ARB on hypertension-related osteoporosis[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(7): 4206-4213.
- [19] He B, Hu M, Li SD, et al. Effects of geraniin on osteoclastic bone resorption and matrix metalloproteinase-9 expression[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(3): 630-634.
- [20] Gu SS, Zhang Y, Wu SY, et al. Early molecular responses of bone to obstructive nephropathy induced by unilateral ureteral obstruction in mice[J]. Nephrology, 2012, 17(8): 767-773.

(收稿日期: 2013-04-22)

阿法骨化醇对糖尿病小鼠骨组织的作用

作者：[刁腾月](#)，[张岩](#)，[潘海](#)，[张方怡](#)，[刘亚茹](#)，[李陇燕](#)，[DIAO Tengyue](#)，[ZHANG Yan](#)，
[PAN Hai](#)，[ZHANG Fangyi](#)，[LIU Yaru](#)，[LI Longyan](#)
作者单位：[上海理工大学系统生物医学研究中心, 上海, 200093](#)
刊名：[中国骨质疏松杂志](#)



英文刊名：[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年，卷(期)：[2013\(11\)](#)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201311005.aspx