

地塞米松对护骨素基因敲除小鼠骨微结构的影响

段新云¹ 马育林¹ 旷小艳¹ 周培文¹ 袁妙兰¹ 盛志峰^{2*}

1. 南方医科大学附属小榄医院, 中山 528415
2. 中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所, 长沙 410011

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0795-04

摘要: 目的 探讨小剂量地塞米松对生长期小鼠骨密度及骨微结构的影响及其与 OPG 途径的关系。方法 20 只 4 周龄 OPG^{-/-} 雌性小鼠及 20 只野生型小鼠随机分四组 (n = 10): 野生型安慰剂组 (WT + saline), 野生型地塞米松干预组 (WT + DEX, 地塞米松 1mg/kg 体重, 肌肉注射, 每周 3 次), OPG^{-/-} 敲除小鼠安慰剂组 (OPG^{-/-} + saline), OPG^{-/-} 敲除小鼠 DEX 干预组 (OPG^{-/-} + DEX, 地塞米松 1 mg/kg 体重, 肌肉注射, 每周 3 次)。6 周后处死小鼠, 一侧胫骨行显微 CT 扫描分析。结果 OPG^{-/-} 组的组织骨密度、骨小梁体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度均较其他三组降低 (P < 0.05)。OPG^{-/-} + DEX 组的组织骨密度、骨小梁体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度均较 WT 及 WT + DEX 组降低 (P < 0.05)。OPG^{-/-} 组的骨小梁模型因子及骨小梁分离度均较其他三组增加 (P < 0.05); OPG^{-/-} + DEX 组的骨小梁模型因子及骨小梁分离度均较 WT 及 WT + DEX 组增加 (P < 0.05)。WT 及 WT + DEX 组之间骨小梁微结构参数均无统计学差异。结论 在生长期小鼠 OPG 基因功能缺失时, 地塞米松有部分拮抗骨量丢失的作用, 表明除了 OPG/RANKL 途径, 地塞米松对骨代谢的影响是多途径的。

关键词: 地塞米松; 小鼠; 护骨素; 基因敲除; 骨微结构; 骨密度

The effect of dexamethasone on bone micro-architecture in OPG^{-/-} mice

DUAN Xinyun¹, MA Yulin¹, KUANG Xiaoyan¹, ZHOU Peiwen¹, YUAN Miaolan¹, SHENG Zhifeng²

1. Department of Endocrinology, the Affiliated Xiaolan Hospital, Southern Medical University, Zhongshan 528415, China
 2. Institute of Metabolism and Endocrinology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China
- Corresponding author: SHENG Zhifeng, Email: 616234072@qq.com

Abstract: Objective To observe the effect of low-dose dexamethasone on bone mineral density and micro-architecture in growing mice without OPG gene. **Methods** Twenty 4-week-old female OPG^{-/-} mice and twenty 4-week-old wild type mice were randomly assigned to 4 groups (n = 10): wild type and placebo group (WT + saline), wild type and dexamethasone group (WT + DXM, 1mg/kg, intramuscular injection, 3 times/w), OPG^{-/-} and placebo group (OPG^{-/-} + saline), and OPG^{-/-} and dexamethasone group (OPG^{-/-} + DEX, 1mg/kg, intramuscular injection, 3 times/w). The mice were sacrificed after 6 weeks. One side of the tibia of each mouse was selected for micro-CT analysis. **Results** Tb. N, BS/BV, Tb. Th, and tBMD significantly decreased in OPG^{-/-} mice than those in the other three groups (P < 0.05). Tb. N, BS/BV, Tb. Th, and tBMD significantly decreased in OPG^{-/-} + DEX mice than those in WT and WT + DEX mice (P < 0.05). Tb. Pf and Tb. Sp significantly increased in OPG^{-/-} mice than those in the other three groups (P < 0.05). Tb. Pf and Tb. Sp significantly increased in OPG^{-/-} + DEX mice than those in WT and WT + DXM mice (P < 0.05). BMD and bone micro-architecture parameters were not significantly different between WT and WT + DXM mice. **Conclusion** Dexamethasone partly extenuates the bone loss in growing mice without OPG gene function. It indicates that in addition to OPG/RANKL pathway, dexamethasone affects bone metabolism through multiple pathways.

Key words: Dexamethasone; Mouse; Osteoprotegerin; Gene knockout; Micro-architecture; Bone mineral density

30% ~ 65% 的库欣综合征患者并发骨质疏松症^[1]。在成人, 糖皮质激素所致的骨质疏松症

(Glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是临床上最常见的继发性骨质疏松症。尽管大量成人和动物实验显示, 糖皮质激素导致骨量丢失, 但是糖皮质激素对生长期骨骼的影响尚未明确。我们最近在 4 周

基金项目: 广东省中山市科技局科研项目(20132A143)

* 通讯作者: 盛志峰, Email: 616234072@qq.com

龄小鼠中发现小剂量地塞米松干预4周对骨微结构无不良影响,表观骨密度及骨体积分数明显高于对照组^[5]。生长期的骨骼因受多种因素影响,在人体研究很难得出一致结论,建立动物模型对研究糖皮质激素对生长期骨骼的影响具有重要意义。

护骨素(osteoprotegerin, OPG)通过与NF- κ B受体活化因子(RANK)配体(RANKL)结合,抑制RANK/RANKL对破骨细胞信号传导的活化,发挥其抗骨丢失作用^[2]。研究提示,OPG可能是多种激素、细胞因子和转录因子调节骨代谢的关键中介分子^[3,4]。而OPG/RANKL比率是导致其抗破骨细胞活性差异的重要原因,但因影响因素多和调节机制复杂,研究OPG的生理作用十分困难。OPG基因敲除小鼠不仅为骨质疏松症的研究提供了一种新的动物模型,而且有助于深入阐明OPG的骨代谢作用模式^[6,7]。本研究通过观察小剂量地塞米松对OPG基因敲除小鼠的骨微结构、骨密度的改变,以探讨地塞米松对骨代谢调节的新机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

4周龄SPF级OPG基因敲除纯合子小鼠(OPG^{-/-})与野生型(WT)小鼠,由上海南方模式生物科技发展有限公司提供。OPG^{-/-}小鼠的制备参考Bucay法^[11],构建置换型载体PGK-Neo,将编码OPG蛋白前三个结构域的OPG基因第2外显子序列予以剔除。采用有C57BL/6J \times 129/SV背景OPG^{-/-}及WT小鼠均由OPG杂合子(OPG^{+/-})小鼠相互交配产生。在纳入实验前,提取尾部组织的DNA作PCR基因型鉴定。20只4周龄OPG^{-/-}雌性小鼠及20只野生型小鼠随机分四组($n=10$):野生型安慰剂组(WT+saline),野生型地塞米松干预组(WT+DEX,地塞米松1mg/kg体重,肌肉注射,每周3次)^[5,8,9],OPG^{-/-}敲除小鼠安慰剂组(OPG^{-/-}+saline),OPG^{-/-}敲除小鼠DEX干预组(OPG^{-/-}+DEX,地塞米松1mg/kg体重,肌肉注射,每周3次)。6周后禁食12h后处死小鼠,收集的血清-70℃保存。取一侧侧胫骨用作此 μ CT扫描与骨矿含量测定。

1.2 显微CT扫描及分析

实验所用显微CT为美国GE公司开发的explore Locus SP型产品(GE Health Care Co., USA),该系统专用于扫描小动物离体骨标本,采用锥形束扫描和三维重建技术,最高分辨率可达6.5

$\mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$ 体素。扫描开始前先将处理好的胫骨标本沿长轴垂直放置于样品固定容器内,周围填充少量塑料泡沫,以避免在扫描过程中样本发生漂移影响结果;使用70%乙醇作为扫描介质,充分浸没样品及塑料泡沫,以确保样品内外无空气干扰。扫描参数如下:电压80 kVp,电流80 μ A,曝光时间3000 ms,扫描方式220°旋转,角度增益0.4°,8.0 $\mu\text{m} \times 8.0 \mu\text{m} \times 8.0 \mu\text{m}$ 体素的各向同性分辨率。为确保标本扫描的完整性,以Fluro方式选择胫骨进行整体扫描,同时扫描标准体模,以备CT值校正。

扫描完成后,手动校正旋转中心和CT值。以70.0 $\mu\text{m} \times 70.0 \mu\text{m} \times 70.0 \mu\text{m}$ 体素的各向同性分辨率完成扫描标本的整体结构重建,从重建图像中分别选取胫骨中段厚约5 mm和距胫骨近端生长板下方0.8 mm、层厚0.7 mm骨组织为感兴趣区域(region of interest ROI),行14.0 $\mu\text{m} \times 14.0 \mu\text{m} \times 14.0 \mu\text{m}$ 体素的三维重建,所得三维图像分别行皮质骨和松质骨定量分析。以对照组皮质骨和松质骨平均阈值提取图像信息,完成图像二值化。定量分析采用MicroView 2.1+ABA(GE Health Care Co)软件。松质骨测量参数包括:骨小梁模型因子(Tb.Pf)、表观骨密度(vBMD)、组织骨密度(tBMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Th.Th)、骨小梁间隔(Th.Sp)、骨小梁数量(Th.N)和骨小梁连接密度(Com.D)。

1.3 统计学处理

所有统计分析用SPSS13.0软件包(SPSS, Chicago, IL, USA)完成。组间均数比较用两独立样本的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

松质骨 μ cT扫描参数的比较(见图1及表1)。

OPG^{-/-}组的骨小梁体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度均较WT、WT+DXM及OPG^{-/-}+DEX组降低($P < 0.05$)。OPG^{-/-}+DEX组的骨小梁体积分数、骨小梁数量、骨小梁厚度均较WT及WT+DXM组降低($P < 0.05$)。

OPG^{-/-}组的骨小梁模型因子及骨小梁分离度均较WT、WT+DXM及OPG^{-/-}+DEX组降低($P < 0.05$);OPG^{-/-}+DEX组的骨小梁模型因子及骨小梁分离度均较WT及WT+DXM组增加($P < 0.05$)。WT及WT+DEX组之间骨小梁微结构参数均无统计学差异。

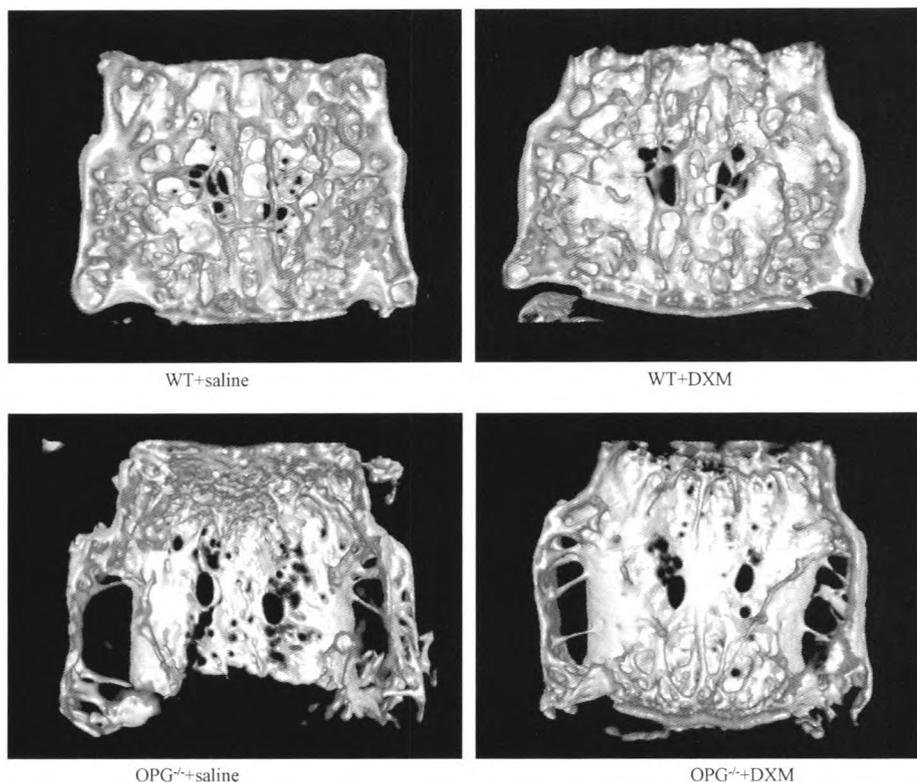


图1 小鼠胫骨松质骨 μCT 三维结构图

Fig. 1 3D morphological changes of the tibial cancellous bone in the mice

注:由图可见,野生型小鼠经小剂量地塞米松干预后骨小梁微结构无明显变化,OPG 基因敲除小鼠骨小梁明显变细,稀疏,断裂,趋向于杆状,地塞米松干预后骨小梁微结构明显改善。

Note: The microarchitecture of trabecular bone in wild type mice did not change significantly after low-dose dexamethasone intervention, but the bone trabeculae of OPG^{-/-} mice became thin, sparse, fracture, tend to rod-shaped, and the microarchitecture of trabecular bone has significantly improved after dexamethasone intervention.

表1 各组小鼠松质骨 μCT 扫描骨密度及骨微结构参数比较($\bar{x} \pm s$) (n = 10)

Table 1 Comparison of BMD and microstructure parameters of the trabecular bone between each group ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

	WT + Saline	WT + DXM	OPG ^{-/-} + Saline	OPG ^{-/-} + DXM
BV/TV (%)	32.2 ± 3.8 ^{a,b}	31.2 ± 5.0 ^{a,b}	6.1 ± 2.5	11.1 ± 4.5 ^a
Tb. Pf (mm ⁻¹)	9.3 ± 2.3 ^{a,b}	10.0 ± 2.9 ^{a,b}	30.8 ± 5.2	24.9 ± 3.1 ^a
Tb. Th (mm)	0.072 ± 0.004 ^{a,b}	0.070 ± 0.004 ^{a,b}	0.055 ± 0.005	0.060 ± 0.004 ^a
Tb. N (mm ⁻¹)	4.48 ± 0.45 ^{a,b}	4.42 ± 0.55 ^{a,b}	1.13 ± 0.51	1.84 ± 0.70 ^a
Tb. Sp (mm)	0.153 ± 0.015 ^{a,b}	0.156 ± 0.007 ^{a,b}	0.304 ± 0.035	0.268 ± 0.051
vBMD (mg/mm ³)	249.6 ± 31.2 ^{a,b}	252.3 ± 40.5 ^{a,b}	135.9 ± 17.7	169.6 ± 31.2 ^a

注:a:与 OPG^{-/-} + saline 组相比, P < 0.05; b:与 OPG^{-/-} + DXM 组相比, P < 0.05; BV/TV:骨体积分数; Tb. Pf:骨小梁模型因子; Tb. Th:骨小梁厚度; Tb. N:骨小梁数量; Tb. Sp:骨小梁间隔; vBMD:表观骨密度。

Note: a, compared with OPG^{-/-} + saline group, P < 0.05. b, compared with OPG^{-/-} + DXM group, P < 0.05. BV/TV, bone volume fraction; Tb. Pf, trabecular bone model factor, Tb. Th, trabecular thickness; Tb. N, trabecular number; Tb. Sp, trabecular separation; vBMD, volumetric bone mineral density.

3 讨论

已经证实内源性 OPG 并非胚胎骨形成所必需,但对出生后骨量的维持起重要作用^[8]。OPG 基因敲除小鼠早发严重的高转换型骨质疏松^[10], 出生时骨骼似乎正常,但出生一周后松质骨骨丢失已相当明显,性成熟前丢失更加严重。OPG 基因敲除小鼠

皮质骨主要由交织骨构成,从4周龄起多孔性显著增加^[10,11]。研究证实 OPG 基因敲除小鼠是很好的骨质疏松模型。我们首次应用显微 CT 研究了小剂量地塞米松对生长期 OPG 基因敲除小鼠松质骨骨密度及骨微结构的影响,结果表明,OPG 基因缺失导致小梁骨严重骨丢失。

既往研究发现小剂量和大剂量糖皮质激素均可

导致3月龄鼠干骺端骨小梁骨密度增高^[12]。我们最近研究发现^[5],小剂量地塞米松通过增加OPG/RANKL比率来维持生长期小鼠骨骼生长发育,但未阐明地塞米松的这种效应是否与通过直接调控OPG有关。因此,为了进一步探讨小剂量地塞米松对生长期小鼠骨密度及骨微结构的影响及其与OPG途径的关系,我们使用小剂量地塞米松干预4周龄OPG基因敲除小鼠,6周后检测其骨密度及骨微结构变化。结果显示OPG基因功能缺失时,骨吸收显著增加,骨密度降低,致骨小梁变细、正常骨小梁结构丧失,表现为骨小梁间隔增加、向棒状结果变化。小剂量地塞米松干预OPG基因敲除小鼠6周后,骨小梁数量增多,骨小梁厚度增加,趋向于厚实的板状结构,骨密度增加。在野生型小鼠,小剂量地塞米松作用6周后,松质骨体积骨密度、骨小梁厚度及骨小梁数量无减少,骨小梁间隔无扩大。结果显示在生长期小鼠,OPG基因功能缺失时,地塞米松有部分拮抗骨量丢失的作用,表明地塞米松对骨代谢的影响是多方面的,可能主要通过OPG/RANKL系统之外途径抑制骨吸收。在野生型生长期小鼠,小剂量地塞米松间断给药对骨微结构及骨密度无不良影响,与我们最近研究结果一致^[5]。

既往研究发现,糖皮质激素抑制骨髓基质干细胞向成骨细胞分化,促进成熟成骨细胞凋亡^[13],同时,糖皮质激素还可以刺激破骨样细胞的形成而抑制破骨细胞的凋亡,提示糖皮质激素对骨形成和骨吸收均有影响,而其影响的结果肯定与机体生理状态有关,似乎与药物剂量无关,与给药频率的关系尚不确定。我们的研究发现,用地塞米松干预的小鼠PINP和CTX均下降,即骨转换率降低,在8周龄大鼠^[14]有相似发现。在绝经后骨质疏松及类风湿关节炎导致的骨质疏松发生中,淋巴细胞被认为起一定的作用。最近研究发现,地塞米松(125 μg/d)干预8周龄小鼠2.5周,结果显示松质骨骨密度增高,但皮质骨骨密度及厚度是降低的,并且地塞米松组骨转换显著降低,脾脏淋巴细胞显著减少^[15],而在去卵巢小鼠未观察到此种效应,提示地塞米松对骨代谢的有益作用可能是通过减少炎症细胞介导骨的吸收。地塞米松也可促进脂肪细胞分化为骨髓基质细胞,并促进成骨细胞分化^[16],促进骨形成。

总之,在野生型生长期小鼠,小剂量地塞米松间断给药对骨微结构及骨密度无不良影响;在生长期小鼠OPG基因功能缺失时,地塞米松有部分拮抗骨量丢失的作用,表明地塞米松对骨代谢的影响是多

方面的,小剂量地塞米松可通过OPG/RANKL系统之外途径抑制骨吸收。

【参 考 文 献】

- [1] Kaltsas G, Makras P. Skeletal diseases in Cushing's syndrome: osteoporosis versus arthropathy. *Neuroendocrinology*, 2010, 92 Suppl 1:60-64.
- [2] Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11: 401-419.
- [3] Liu W, Xu C, Zhao H, et al. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS One*, 2015, 10: e0142519.
- [4] JU Jurado S, Garcia-Giralt N, Diez-Perez A, et al. Effect of IL-1β, PGE2, and TGF-β1 on the expression of OPG and RANKL in normal and osteoporotic primary human osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2010, 110:304-310.
- [5] 马育林,张建东,吴凤,等.小剂量地塞米松对生长期小鼠骨微结构及骨代谢的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21: 1201-1207.
Ma YL, Zhang JD, Wu F, et al. Effects of low dose dexamethasone on bone microstructure and bone metabolism in growing mice. *Chin J Osteoporos*, 2015, 21: 1201-1207.
- [6] Li XF, Xu H, Zhao YJ, et al. Icarin augments bone formation and reverses the phenotypes of Osteoprotegerin-deficient mice through the activation of Wnt/β-Catenin-BMP Signaling. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013:652317.
- [7] Xie H, Xie PL, Wu XP, et al. Omentin-1 attenuates arterial calcification and bone loss in osteoprotegerin-deficient mice by inhibition of RANKL expression. *Cardiovasc Res*. 2011, 92:296-306.
- [8] Ren H, Liang D, Jiang X, et al. Variance of spinal osteoporosis induced by dexamethasone and methylprednisolone and its associated mechanism. *Steroids*, 2015, 102:65-75.
- [9] Takahashi M, Ushijima K, Hayashi Y, et al. Dosing-time dependent effect of dexamethasone on bone density in rats. *Life Sci*, 2010, 86:24-29.
- [10] Bucay, Sarosj T, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12:1260-1268.
- [11] Sheng ZF, Xu K, Ma YL, et al. Zoledronate reverses mandibular bone loss in osteoprotegerin deficient mice. *Osteoporos Int*, 2009, 20:151-159.
- [12] Ogoshi T, Hagino H, Fukata S, et al. Influence of glucocorticoid on bone in 3-, 6-, and 12-month-old rats as determined by bone mass and histomorphometry. *Mod Rheumatol*, 2008, 18:552-561.
- [13] Guanabens N, Gifre L, Peris P. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Osteoporos Rsp*, 2014, 12:90-97.
- [14] Delany AM, Gabbitas BY, Canalis E. Cortisol downregulates osteoblast alpha 1 (I) procollagen mRNA by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biochem*, 1995, 57:488-494.
- [15] Grahnmemo L, Jochem C, Andersson A, et al. Possible role of lymphocytes in glucocorticoid-induced increase in trabecular bone mineral density. *J Endocrinol*, 2015, 224:97-108.
- [16] Ghali O, Broux O, Falgayrac G, et al. Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation. *BMC Cell Biol*, 2015, Mar 13, [Epub ahead of print]

(收稿日期: 2015-12-25)