

2 型糖尿病性骨质疏松的鼠类模型的研究进展

梁燕龙^{1,2} 杜敏群^{1,2} 赖文秀^{1,2} 李淑惠^{1,2} 崔燎^{1,2*}

1. 广东医学院药理学教研室 广东 湛江 524023

2. 广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室 广东 湛江 524023

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1164-04

摘要: 2 型糖尿病性骨质疏松 (Type 2 Diabetic Osteoporosis, T2DOP) 的病因复杂, 对治疗带来困难, 因此, 建立符合人类 2 型糖尿病发病特点、骨代谢和骨结构的动物模型在 T2DOP 发病机制及其防治研究中的意义重大。由于鼠类的骨结构特点与人类相似, 而且容易繁殖, 目前国内外 T2DOP 动物模型研究也大多数在鼠类的研究。国内采用诱发性鼠类模型观察到其骨代谢和骨结构异常报道居多, 国内外观察自发性 2 型糖尿病鼠类模型和转基因/基因敲除 2 型糖尿病鼠类模型的骨代谢和骨结构也存在异常, 但是尚无一种既能在其骨骼成熟后发展为 2 型糖尿病, 又能协同多基因和环境因素的 2 型糖尿病鼠类模型。故本文对研究的 T2DOP 鼠类模型的构建、骨代谢特征及其骨结构做一综述, 为建立更为完善的 2 型糖尿病模型, 进一步推动 2 型糖尿病性骨质疏松的机制研究和药物研发。

关键词: 2 型糖尿病; 骨质疏松; 动物模型; 骨代谢; 骨结构; 骨密度

Research progress in the rodent model of type 2 diabetic osteoporosis

LIANG Yanlong^{1,2}, DU Minqun^{1,2}, LAI Wenxiu^{1,2}, LI Shuhui^{1,2}, CUI Liao^{1,2}

1. Department of Pharmacology Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524023, China

2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang Guangdong 524023, China

Corresponding author: CUI Liao, Email: cuiliao@163.com

Abstract: The complicated etiology of type 2 diabetic osteoporosis (T2DOP) brings difficulties for treatment. Therefore, it is important to establish animal models which fit the feature of human type 2 diabetes, bone metabolism, and bone structure for study of the mechanism and prevention of T2DOP. Since the bone structure in rodent is similar to that in humans and the rodent is easy in propagation, the most studies both at home and abroad for the animal model of T2DOP tend to study in rodent model at present. More and more national literatures report the abnormal bone metabolism and structure in the experimental type 2 diabetic rodent model. The abnormal bone metabolism and structure are also found in spontaneous type 2 diabetic rodent model and gene knockout type 2 diabetic rodent model. However, there is no single type 2 diabetic rodent model that not only spontaneously develops diabetes after skeletal maturity, but also combines multiple genes and environmental factors. This paper reviews the establishment, bone metabolism, and bone structure of the T2DOP animal model, in order to build a more perfect model of type 2 diabetes, and to further promote the development of pathogenesis research and drug research for T2DOP.

Key words: Type 2 diabetes; Osteoporosis; Animal model; Bone metabolism; Bone structure; Bone mineral density

糖尿病性骨质疏松症 (Diabetic Osteoporosis, DOP) 是一种以高血糖, 骨量减少, 骨脆性增加, 易发生骨折为特征的内分泌代谢性疾病, 是糖尿病在骨

骼系统引起的严重慢性并发症。迄今, 糖尿病对骨和矿盐代谢的改变有许多不同的结果, 低骨密度和糖尿病之间的关系在 1 型糖尿病患者中已得到一致性肯定, 公认 1 型糖尿病患者易发生骨质疏松, 而 2 型糖尿病 (Type 2 Diabetic, T2D) 病人的骨密度 (Bone Mineral Density, BMD) 观察结果有或低、或高、或正常的不同报道^[1], 但是其骨折风险均显著增加^[2]。目前, T2DOP 的发病机制尚不明确, 建立一种既符

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81273518); 广东省科学计划项目 (2012B060300027); 广东医学院科技创新基金项目 (STZF101104)

* 通讯作者: 崔燎, Email: cuiliao@163.com

合人类 T2D 发病特点和骨代谢特点,又稳定、实用的动物模型在 T2DOP 研究中起到至关重要的作用。鼠类作为目前应用最广的糖尿病动物模型,因其体积小、生长周期短、经济易得、易于实现基因修饰等,较其他种属有着无比可拟的优势。现今,研究 T2DOP 的鼠类模型主要分为三大类:诱发性 2 型糖尿病模型、自发性 2 型糖尿病模型和转基因/基因敲除 2 型糖尿病模型。该文对近年来国内外较常研究的 T2DOP 鼠类模型的构建、骨代谢特征及其骨结构进行概述,为研究者提供参考。

1 成人 2 型糖尿病患者的骨代谢和骨结构的变化特点

T2D 多发生在 35~40 岁之后,占糖尿病患者 90% 以上,因此成人 T2D 患者居多。成人 T2D 患者的骨代谢状态主要通过骨转换来反映,骨转换指成骨细胞新骨形成与破骨细胞骨吸收的骨代谢活动,骨细胞分泌多种骨转换生物标志物,包括骨钙素(OCN)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)、I 型胶原 N 末端肽(NTX)、I 型胶原 C 末端肽(CTX)等。在 Meta 分析中发现,与正常人相比,T2D 患者的骨形成标志物中的 OCN 和骨吸收标志物中的 CTX 的含量下降,其他的骨转化标志物中 BAP 和 NTX 的含量并没有明显变化^[3]。同样,在 T2D 患者血清中观察到 OCN 和骨硬化素含量显著降低^[4,5],这些异常的生物标志物提示,T2D 患者处于低骨转换状态,从而导致骨矿物质大量丢失。

虽然 T2D 患者的骨结构的研究报道并不多,但是普遍认为与非糖尿病患者相比,T2D 患者的骨小梁体积骨密度相近或稍高^[6]。T2D 对皮质骨结构的影响存在两种截然不同报道:无影响和破坏作用^[6,7],但是最近有研究报道发现,与非糖尿病患者相比,皮质骨结构受损只发生在潜在骨折风险的绝经后的 T2D 患者,相反,没有存在骨折风险的 T2D 患者具有与非糖尿病患者相似的皮质骨密度、孔隙度和骨微结构^[8]。综上所述,需要更多临床研究数据去进一步发现成人 T2D 患者的骨结构变化,为临床治疗提供有力支持。

2 2 型糖尿病性骨质疏松的鼠类模型

目前,研究 T2DOP 鼠类模型主要分为三大类:诱发性 2 型糖尿病模型、自发性 2 型糖尿病模型和转基因/基因敲除 2 型糖尿病模型。

2.1 诱发性 2 型糖尿病模型

诱发性 2 型糖尿病模型是通过物理、化学等致

病因素人工诱发出具有 T2D 特征动物模型。制备方法主要有手术诱导、化学药物诱导和饮食诱导。目前国内外最常用的为化学药物联合高糖高脂饮食诱导,因为不仅能造出同时具有胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺乏特征的 T2D 动物模型,而且造模时间短。

国内外学者采用高糖高脂饲料结合低剂量链脲佐菌素(STZ)成功制备 T2D 大鼠模型^[9,10],发现该模型大鼠的 BMD、骨钙含量和碱性磷酸酶(ALP)含量下降。同时,有研究发现,采用以上方法制备 T2D 大鼠模型,与造模 0 周后的大鼠股骨的骨形态计量学指标比较,造模 12 周后的大鼠骨体积分数(Bone Volume/Total Volume, BV/TV)、骨小梁厚度(Trabecular thickness, Tb. Th)和骨小梁数目(Trabecular number, Tb. N)均显著减少^[11]。虽然诱发性 2 型糖尿病鼠类模型,与人类肥胖引起的 T2D 发病机制相似,并且该模型大鼠处于低骨转换和骨小梁结构受损状态,但是并不能更好模拟由于多基因遗传而造成的 T2DOP 疾病,因此需要寻找与人类发病机制相似的 T2D 鼠类模型。

2.2 自发性 2 型糖尿病模型

该模型是指动物自然发生的或通过遗传育种培养而保留下来的 T2D 动物模型,未经过有意识的人工处理,其发病过程和临床特征更接近人类患者。该模型可分为肥胖自发性 2 型糖尿病模型和非肥胖自发性 2 型糖尿病模型。

2.2.1 肥胖自发性 2 型糖尿病模型

常用的肥胖自发性糖尿病模型包括单基因遗传背景的 ob/ob 小鼠、Zucker 糖尿病肥胖大鼠(Zucker diabetic fatty rat, ZDF)和多基因遗传背景的 KK/Ay 小鼠、OLETF 大鼠。

ob/ob 小鼠接近人类 T2D 特征,它们是瘦素基因突变引起的。ob/ob 小鼠(C57BL/6J 背景),表现为饮食过量,在 3~4 周龄出现明显肥胖、高血糖和胰岛素抵抗。有学者研究发现,12 周龄的 ob/ob 小鼠血清 OCN 与 CTX 含量显著低于正常鼠,这提示 ob/ob 小鼠体内骨代谢水平下降^[12]。并且该研究中发现,与正常鼠比较,ob/ob 小鼠的股骨中段骨的皮质骨骨量、皮质骨厚度均显著减少,胫骨近端的松质骨的 BV/TV、连接骨密度(Connection Density, Conn-Dens)和 Tb. N 也均显著减少,但是 Tb. Th 并无统计学差异。有学者观察 ZDF 鼠在 9~11 周龄发展为 2 型糖尿病鼠,21 周龄时,其股骨远端及腰椎的 BMD 和骨小梁三维结构参数与非糖尿病鼠相比均下

降^[13]。但是关于 ZDF 鼠的骨代谢研究并不多,在研究 ZDF 鼠的骨折愈合的实验中发现,骨形成标志物 PINP 和 OCN 显著降低^[13]。另外,ZDF 鼠的骨吸收标志物的含量变化存在分歧,因为有研究发现,与正常鼠比较,ZDF 鼠血清 CTX 显著增加,但是尿脱氧吡啶酚(DPD)并没有明显变化^[14]。

KK/Ay 小鼠是 KK 小鼠编码调节皮毛颜色的 Agouti 基因突变而培育的一种自发性 2 型糖尿病模型。该小鼠是研究肥胖诱导的 T2D 和糖尿病肾病的良好模型,但是关于 T2DOP 研究甚少。有学者研究发现^[15],与正常鼠对比,12 周龄的 KK/Ay 小鼠血清 ALP 活性明显下降,血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性明显升高,该小鼠体内骨代谢水平下降,BMD 明显降低。并且该研究发现 KK/Ay 小鼠的 BV/TV、Tb. N 和 Tb. Th 也存在不同程度的受损。因此,T2D 可能在早期会引起骨吸收加快而骨形成不足,导致其骨量减少及骨折风险增大,故早期 T2D 患者应及早防治骨质疏松的发生。

OLETF 大鼠是多基因遗传的肥胖 2 型糖尿病模型,在 18~25 周龄发展为糖尿病,表现为多食、轻度肥胖、高胰岛素血糖和慢性高血糖。关于 OLETF 大鼠的 BMD 存在不一致观察结果,有国外学者发现^[16],OLETF 大鼠的胫骨近端 BMD 在 56 周龄之前一直保持高于正常鼠;国内学者发现^[17],24 周龄的 OLETF 大鼠的胫骨 BMD 与正常鼠并没有统计学差异,但是有研究发现,13、20 和 40 周龄的 OLETF 大鼠的胫骨 BMD 比正常鼠均降低^[18]。关于 OLETF 大鼠的骨微结构的研究甚少,国内研究发现^[17],24 周龄的 OLETF 大鼠的 BV/TV、Tb. N 均显著低于正常鼠,骨小梁分离度(Trabecular separation,Tb. Sp)高于正常鼠,但 Tb. Th 的差异无统计学意义。另外,OLETF 大鼠的骨形成标志物 OCN 和 PINP 含量在不同时期有不同的变化^[18]。研究发现,与同周龄的正常鼠相比,13 周龄 OLETF 大鼠的血清 PINP 含量显著下降,但 20 和 40 周龄 OLETF 大鼠血清 PINP 含量并无差异;40 周龄 OLETF 大鼠中发现其血清 OCN 显著下降,但 13 和 20 周龄的 OLETF 大鼠血清 OCN 也无统计学差异。在该研究里也发现 40 周龄 OLETF 大鼠骨吸收标志物 CTX 显著升高比正常鼠,但血清 TRAP5b 却显著减少。同样有研究发现 OLETF 大鼠的骨转换代谢是存在异常的,实验中结果显示 OLETF 大鼠血清 OCN 显著低于正常鼠,并且 TRAP 无统计学差异。

2.2.2 非肥胖自发性 2 型糖尿病模型

GK 大鼠是学者从 Wistar 大鼠中反复选择形成的非肥胖性 2 型糖尿病鼠种。该鼠表现为葡萄糖刺激的胰岛素分泌受损, β 细胞分泌受损,空腹高血糖和胰岛素抵抗等特征,与人类 T2D 进展极为相似。

研究发现 6 月龄 GK 大鼠股骨和第五腰椎的 BMD 均低于正常对照 Wistar 大鼠,骨组织形态学研究显示 GK 大鼠 BV/TV、Tb. Th 和 Tb. N 均较正常鼠显著降低;骨代谢生化指标研究显示,与正常鼠比较,GK 大鼠骨形成指标血清 OCN 明显降低,而骨吸收指标血清 TRAP 活性显著升高^[19],这提示 GK 大鼠表现骨量减少和骨折危险性增加。

综上所述,虽然自发性 2 型糖尿病鼠类模型的病程发展特点与人类 T2D 类似,是 T2D 病理、病因研究最理想的动物模型,但是对于自发性 2 型糖尿病鼠类并发骨质疏松的研究中,并不是更稳定符合人类 T2D 的骨代谢和骨结构的变化,其原因可能是其频繁的近亲繁殖和单基因遗传与人类有所差异。

2.3 转基因/基因敲除 2 型糖尿病模型

目前已开发多种转基因或基因剔除小鼠糖尿病模型,常见的模型 IRS-1^{-/-} 基因敲除小鼠、IGF-1^{-/-} 基因敲除小鼠和 IR⁺/IR⁻ IRS-1⁺/IR⁻ 双基因敲除杂合小鼠等,但是关于 T2DOP 研究并不多。

有研究者对 4 周、8 周、12 周和 16 周龄 2 型糖尿病 IRS-1^{-/-} 小鼠的 BMD 进行观察,发现这不同周龄小鼠的 BMD 均显著低于正常鼠,另外该研究中对 8 周龄的 IRS-1^{-/-} 小鼠进行骨形态计量学实验观察,同样发现其 BV/TV、Tb. Th、皮质骨厚度较正常鼠均显著减少^[20],这提示 2 型糖尿病 IRS-1^{-/-} 小鼠在早期已经出现骨量丢失,但是该实验并没有对 IRS-1^{-/-} 小鼠的骨代谢生化指标进行检测。另外,有学者对 2 型糖尿病 IGF-1^{-/-} 小鼠的骨骼结构特点做了研究,发现 IGF-1^{-/-} 小鼠的胫骨的近端和远端的骨矿含量显著低于正常鼠,但是其 BMD 无统计学差异,同样,虽然胫骨近段的皮质骨厚度比正常鼠减少 17%,但是其松质骨的 BV/TV、Tb. N、Tb. Sp 均显著高于正常鼠,然而 IGF-1^{-/-} 小鼠的第一腰椎并没有发生以上的骨骼变化^[21]。因此 2 型糖尿病 IGF-1^{-/-} 小鼠的骨骼变化是复杂的,不同的骨骼部位有不同的骨结构变化。

综上所述,虽然转基因/基因敲除 2 型糖尿病鼠类模型能得到糖代谢中某个基因作用的关键信息,但是,T2D 是多基因与环境共同作用的结果,并非少数基因的作用,因此对于该类模型在研究 T2DOP 过程中并不能符合人类 2 型糖尿病发病特点和骨代谢特点。

3 2 型糖尿病并发骨质疏松的鼠类模型目前存在问题

目前 T2DOP 鼠类模型仍存在许多亟待解决的问题。首先,在 T2D 鼠类模型中,仍缺乏系统规范的血糖标准,以空腹血糖还是口服葡萄糖糖试验中糖负荷后血糖为标准? 血糖值是多少? 其次,成人 T2D 患者是经过骨骼生长成熟阶段后才患有 T2D,但是在 T2D 小鼠模型中都是在骨骼成熟之前已经患有 T2D,另外,在 T2D 大鼠模型中也没有存在在骨骼成熟后发展为肥胖性 T2D 大鼠,因此 T2D 鼠类模型的骨骼变化并不能更好模拟人类 T2D 的骨骼变化。绝大部分 T2D 鼠类模型是在骨骼成熟之前发展为 T2D,有学者认为这模型可能适用于研究青少年 T2D 患者的骨骼变化。

4 总结

随着对 T2DOP 研究的逐步深入,相应动物模型的发展势在必行。至今没有一种公认的最理想的 T2DOP 鼠类模型与人类 T2DOP 的特征完全吻合,不同类型的 T2DOP 鼠类模型各有其优势和不足,对于模型的选择应根据研究目的等具体情况而定。为了更好探索 T2DOP 的发病机制,需要将来建立一种协同多基因和环境因素的 T2D 鼠类模型,以便为 T2DOP 的临床防治提供实验基础。

【参 考 文 献】

- [1] Issa C, Zantout MS, Azar ST. Osteoporosis in men with diabetes mellitus[J]. J Osteoporos 2011; 2011: 651867.
- [2] P. Vestergaard. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes: a meta-analysis[J]. Osteoporos Int 2007; 18(2): 427-44.
- [3] Starup-Linde J, Eriksen SA, Lykkboe S. Biochemical of bone turnover in diabetes patients—a meta-analysis, and a methodological study on the effect of glucose on bone markers[J]. Osteoporos Int 2014; 25(6): 1697-708.
- [4] Jakob Starup-Linde. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone[J]. Front Endocrinol, 2013; 4: 21.
- [5] Reyes-Garcia R, Rozas-Moreno P, Lopez-Gallardo G. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patient with type 2 diabetes[J]. Acta Diabetol 2013; 50(1): 47-52.
- [6] Andrew J Burghardt, Ahi S Lssever, Ann V Schwartz. High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95(11): 5045-5055.
- [7] Melton LJ 3rd, Riqqs BL, Leibson CL. A bone structural basis for fracture risk in diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93(12): 4804-9.
- [8] Patsch JM, Li X, Baum T. Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures[J]. J Bone Miner Res, 2013; 28(8): 1721-8.
- [9] Qian C, Zhu C, Yu W. High-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats impacts osteogenesis and wnt signaling in bone marrow stromal cells[J]. PLoS One 2015; 10(8): e0136390.
- [10] 王亮, 马远征, 曾晓. 2 型糖尿病大鼠模型建立及骨密度特点研究[J]. 中国骨质疏松杂志 2010; 16(5): 331-3. Wang Liang, Ma Yuanzheng, Zeng Xiao. Establish type-2 diabetic rat model and characters of bone mineral density[J]. Chin J Osteoporos, 2010; 16(5): 331-3. (in Chinese)
- [11] 姚红, 郝光霞, 郭敏. 骨细胞 GLP-1 受体表达对 2 型糖尿病大鼠骨微结构的影响[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014; 7(2): 155-60. (in Chinese) Yao Hong, Xi Guang-xia, Guo Min. Effect of GLP-1 receptor expressed of bone cells on the bone microstructure in the type 2 diabetic rats[J]. Chin J Osteoporosis and Bone Miner Res, 2014; 7(2): 155-60.
- [12] Turner RT, Philbrick KA, Wong CP. Morbid obesity attenuates the skeletal abnormalities associated with leptin deficiency in mice[J]. J Endocrinol 2014; 233(1): M1-15.
- [13] Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J. Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab 2011; 301(6): E1220-8.
- [14] Hamann C, Rauner M, Hohna Y. Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus[J]. J Bone Miner Res, 2013; 28(3): 627-38.
- [15] 徐飞, 董永辉, 黄鑫. 2 型糖尿病对小鼠骨代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志 2014; 20(3): 238-41. (in Chinese) Xu Fei, Dong Yonghui, Huang Xin. Effect of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism: an in vivo study[J]. Chin J Osteoporos, 2014; 20(3): 238-41.
- [16] Naomin Omi, Taro Maruyama, Yutaka Suzuki. Bone loss in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus, the OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty strain) rat[J]. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 1998; 16(4): 250-8.
- [17] 程彦臻, 陈珺, 王丹. 自发性 2 型糖尿病 OLETF 大鼠骨质量特点的研究[J]. 中国骨质疏松杂志 2015; 21(4): 395-8. (in Chinese) Cheng Yanzhen, Chen Jun, Wang Dan. Characteristics of bone property in spontaneous diabetic OLETF rats[J]. Chin J Osteoporos 2015; 21(4): 395-8.
- [18] Hinton PS, Shankar K, Eaton LM. Obesity-related changes in bone structural and material properties in hyperphagic OLETF rats and protection by voluntary wheel running[J]. Metabolism, 2015; 64(8): 905-16.
- [19] Zhang L, Liu Y, Wang D. Bone biomechanical and histomorphometrical investigation in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats[J]. Acta Diabetol 2009; 46(2): 119-26.
- [20] Ogata N, Chikazu D, Kubota N. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. J Clin Invest 2000; 105(7): 935-43.
- [21] Bikle D, Majumdar S, Laib A. The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. J Bone Miner Res, 2001; 16(2): 2320-9.

(收稿日期: 2016-03-26; 修回日期: 2016-06-15)