

· 论 著 ·

通过 Micro-CT 评价瘦素受体缺乏的 2 型糖尿病小鼠四肢骨的骨代谢变化

何琪¹ 杨均政¹ 张昱瑜¹ 潘兆丰¹ 苏丽君¹ 王海彬² 陈鹏^{2*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 04-0492-06

摘要: **目的** 探讨瘦素受体(leptin receptor, Lepr)缺乏的 2 型糖尿病小鼠的骨骼表型, 为 2 型糖尿病((T2DM)合并骨质疏松(OP)的防治提供一个新的靶点。**方法** 获取 20 只 14 周龄雄性 db/db 小鼠(瘦素受体缺乏小鼠)和野生型小鼠(C57BL 小鼠)的胫骨(各 10 只), 通过 Micro-CT 检测比较两者骨小梁相对体积(BV/TV)、骨表面积组织体积比值(BS/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp)、骨结构模型指数(SMI)、骨皮质厚度(Ct.Th)、骨皮质面积(Ct.Ar)等骨微结构参数的差异。**结果** 与野生型小鼠相比, 14 周龄的 db/db 小鼠的胫骨骨小梁相对体积(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)明显减小, 小梁骨间距(Tb.Sp)相应增加, 皮质骨厚度(Ct.Th)、横截面积(Ct.Ar)减小, 两者比较差异均有显著统计学意义($P < 0.05$); 其结构模式指数(structure model index, SMI)较野生型明显减小, 两者比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 2 型糖尿病可能是通过瘦素受体参与的信号通路影响了骨量变化, 为利用该模型进行 DOP 病因及治疗方法研究提供了新的方向。且在缺乏瘦素信号传导的情况下, 骨质量和强度的降低验证了瘦素在体内起着合成代谢骨因子的作用。**关键词:** 瘦素受体; Micro-CT; 胫骨; 2 型糖尿病; 骨质疏松; 骨代谢

The changes of bone metabolism in the extremities of type 2 diabetic mice with leptin receptor deficiency were evaluated by micro-CT

HE Qi¹, YANG Junzheng¹, ZHANG Gangyu¹, PAN Zhaofeng¹, SU Lijun¹, WANG Haibin², CHEN Peng^{2*}

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Orthopedics Department, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

* Corresponding author: CHEN Peng, Email: docchen008@163.com

Abstract: Objective To investigate the skeletal phenotype of type 2 diabetic mice with Leptin receptor (Lepr) deficiency and to provide a new target for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) combined with osteoporosis (OP). **Methods** Get 20 males only 14 weeks of db/db mice (lack of leptin receptor) in mice and wild-type mice (C57BL mice) shin (10), through the Micro-CT detection to compare both trabecular bone volume (BV/TV) relatively, the surface area of bone tissue volume ratio (BS/TV), bone trabecular thickness (Tb.Th), bone trabecular number (Tb.N), separating degree (Tb.Sp), trabecular bone bone structure model index (SMI), bone cortical thickness (Ct.Th), bone cortex area (Ct.Ar) bone microstructure parameters, such as difference. **Results** Compared with wild type mice, 14 weeks of db/db mice tibial trabecular bone volume (BV/TV) and bone trabecular thickness (Tb.Th), bone trabecular number (Tb.N) significantly reduced, trabecular bone spacing (Tb.Sp) increased, the corresponding cortical thickness (Ct.Th), cross-sectional area (Ct.Ar) decreased, and compared the differences between all had significant statistical significance ($P < 0.05$); The structure model index (SMI) was significantly lower than that of the wild type, and the difference between the two was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Type 2 diabetes may affect the change of bone mass through the signal pathway involved in leptin receptor, which provides a new direction for the study of DOP etiology and treatment method by using this model. In addition, in the absence of leptin signal transduction,

基金项目: 国家自然科学基金(81774339, 82074462); 广东省科技计划项目(2017A020213030); 广东省中医药管理局科研项口(20191101)

* 通信作者: 陈鹏, Email: docchen008@163.com

bone mass and strength decrease, which proves that leptin plays a role of anabolic bone factor in the body.

Key words: leptin receptor; micro-ct; tibia; type 2 diabetes mellitus; osteoporosis; bone metabolism

随着我国人口老龄化问题的日益严峻及生活方式的改变,2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)和骨质疏松(osteoporosis, OP)已成为常见的危害人类健康的两大慢性代谢性增龄性疾病^[1]。目前,大量基础和临床研究均表明 T2DM 和 OP 的发生发展具有密切联系,长期处于高血糖状态会引起骨代谢紊乱,最终导致糖尿病性骨质疏松(diabetic osteoporosis, DOP)^[2]。DOP 主要表现为骨量低、骨脆性增加、骨质量下降和骨折风险增加,严重降低了患者的生存质量,给社会、医疗卫生机构、家庭造成沉重负担^[3]。

瘦素(leptin)是一个主要由白色脂肪组织分泌的具有 146 个氨基酸的蛋白质^[4],其功能主要是抑制食欲和调节机体能量代谢^[5]。最开始,瘦素仅仅被认为在下丘脑中枢水平作为一个饱感因子介导食物摄入量减少,并增加能量的消耗^[6-7]。但当前许多研究发现,瘦素涉及生殖功能、血管生成或骨生长等多种生理进程的控制^[6,8-9]。现有研究证实瘦素受体的分布除下丘脑外,还广泛存在于许多组织,骨骼系统就是其重要的作用部位。且随着研究的深入,瘦素受体的信号传导形式已经在多种骨骼细胞类型中发现,包括骨髓间充质细胞^[10]、成骨细胞^[11]、造血干细胞^[12]等。而 db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天性 2 型糖尿病小鼠,是由美国 Jackson 实验室于 1966 年在 C57BL/Ks 小鼠上发现的带有糖尿病突变基因(db)的动物^[13],db/db 小鼠的 2 型糖尿病综合征与 2 型糖尿病患者相似,表现为肥胖、胰岛素抵抗、高胰岛素血症和进行性高血糖。由于 T2DM 引起的骨质疏松症的潜在机制尚不清楚,我们拟通过 Micro-CT 检测 db/db 小鼠和正常野生型小鼠的胫骨近端,以期了解瘦素受体缺乏的 2 型糖尿病小鼠骨代谢的表型变化,从而加深对糖尿病性骨质疏松发病机制的研究,明确糖尿病与骨质疏松的认识,对预防和治疗糖尿病性骨质疏松有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物及标本准备

选择 6 周龄雄性野生型 C57BL/6 J 小鼠及 db/db 小鼠(瘦素受体缺乏小鼠)各 10 只,购置南京大学模式动物所。所有实验动物均饲养于广州中医药

大学实验动物中心 SPF 级动物设施,饲养环境维持恒温(22~25 ℃),湿度 55%~60%,自由摄食、饮水。实验和操作规程经所在单位的动物实验伦理委员会审核通过。(实验动物合格证号:SCXK(苏)2018-0008)动物喂养 8 周,在 14 周龄时过量麻醉处死,分离左腿胫骨,尽量清除干净周围软组织,然后置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h。

1.2 Micro-CT 原理扫描方法

所有标本采用 Skyscan1172 micro-CT 设备进行扫描(Skyscan, Bruker, Belgium)。扫描前,将样品从 4%多聚甲醛溶液中取出并用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, pbs)冲洗后,将骨标本置于垂直于扫描轴的直径为 10 mm 的标本管中,周围填塞少许医用纱条,加入 70%乙醇作为扫描介质。扫描仪的基本参数为:电压 50 kV,电流 200 μ A,总旋转角 360°,旋转角增量 0.4°,厚度 9 μ m。扫描后,使用 Skyscan NRecon 软件并利用 Feldkamp 圆锥束算法,将二维图像序列自动重建为 15.9 μ m 各向同性体素大小的三维体。胫骨骨小梁微结构分析,选用高度为 1.0 mm 的 VOI(the volume of interest),分析从胫骨近端生长板下方 0.45 mm 处开始延伸至近端 1.0 mm 处。另取同样高度的 VOI,分析胫骨中骨干的皮质骨结构。骨小梁参数分析,包括骨小梁相对体积(BV/TV, %)、骨表面积组织体积比值(BS/TV, 1/mm)、骨小梁厚度(Tb.Th, mm)、骨小梁数量(Tb.N, 1/mm)、骨小梁分离度(Tb.Sp, mm)、骨结构模型指数(structure model index, SMI)。通过分析骨皮质厚度(Ct.Th, μ m)、骨皮质面积(Ct.Ar, mm²),评估皮质骨结构。以上数据的操作和分析都使用 Custom Analysis 程序(CTAn, Skyscan)进行。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件处理,所有测定数值均使用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据采用独立样本 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

据图 1、图 2 示,与正常野生型小鼠(WT)相比,db/db 小鼠的胫骨近端三维成像显示,骨皮质变薄、骨量相对减少、骨小梁松散且结构呈“杆状”变化;据图 3、图 4 示,比较 WT 组,db/db 小鼠的骨小梁、皮质骨参数发生了显著变化,骨小梁相对体积

(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)明显增大,小梁骨质量和小梁骨连接性明显降低,并且小梁骨微结构恶化,小梁骨间距(Tb.Sp)相应增加,皮质骨厚度(Ct.Th)、横截面积(Ct.Ar)减小,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。db/db小鼠的胫骨近端骨小梁结构模式指数(structure model index, SMI)较野生型明显增大,意味着小梁结构组成中板层结构和杆状结构的比例发生了改变。如果结构中骨小梁主要为板层结构,那么SMI接近于0;反之,如果主要是杆状骨小梁,SMI则接近3^[14]。当发生骨质疏松时,骨小梁结构从板状向杆状转变,该值增大。这一参数与图1、图2三维成像相符合,表明db/db小鼠中骨小梁相比野生型已转为更多的“杆状”结构,发生了骨质疏松。

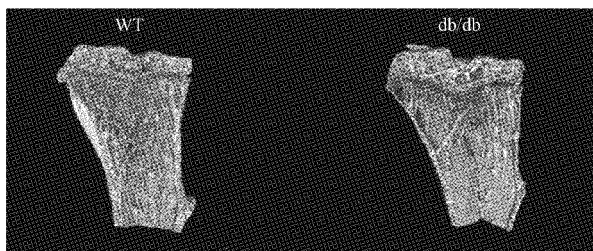
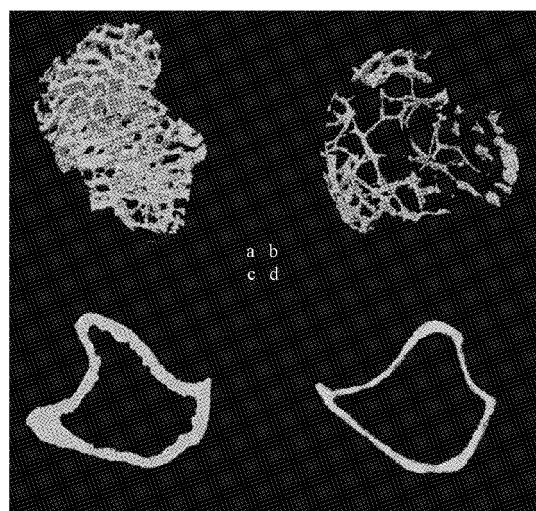


图1 野生型(WT)和db/db小鼠胫骨近端冠状切面三维模型

Fig.1 Wild-type (WT) and db/db mice coronal section 3d models of proximal tibia



注: * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ 。

图2 a 野生型(WT)小鼠胫骨近端骨小梁;b db/db小鼠胫骨近端骨小梁;c 野生型(WT)小鼠胫骨近端皮质骨;d db/db小鼠胫骨近端皮质骨

Fig.2 a. Proximal tibial trabecula in wild-type (WT) mice; b. db/db mouse proximal tibial trabecular bone; c. Cortical bone of proximal tibia in wild-type (WT) mice; d. Proximal tibial cortical bone in db/db mice

3 讨论

瘦素是脂肪细胞的主要激素产物,参与调节食欲和能量代谢,从而影响脂肪沉积和体重^[15]。越来越多的证据报道了瘦素参与了体外和体内对骨骼和骨细胞的合成代谢,最近已有研究证实成骨和软骨细胞也能够合成和分泌瘦素^[16-17],瘦素能够在中央和外周调节骨生成^[18-20]。Holloway等^[21]的研究证明瘦素通过RANKL/RANK/OPG系统抑制破骨细胞的形成及功能。此外,Thomas等^[22]研究发现,瘦素可作用于人骨髓间充质干细胞,促进其向成骨细胞分化,同时抑制该细胞向脂肪细胞分化。这些结果提示瘦素可能在骨科疾病的发生发展中起关键作用。然而瘦素受体缺乏所致的骨表型仍然存在争议,如Ducy等^[23]研究发现,在瘦素受体缺陷(db/db)的小鼠中表现为骨形成增加及骨矿质沉积速率增加,且骨密度比野生型高2~3倍,他们认为瘦素可能通过中枢性作用方式有效抑制骨形成作用。但许多随后的研究报道了与该假说相矛盾的发现,Ealey等^[24]、He等^[25]发现db/db小鼠表现出肢体骨量、机械强度和骨形成的显著降低,随后Williams等^[26]通过Micro-CT进一步证明了db/db小鼠胫骨的松质骨和皮质骨微结构受损,椎骨的松质和皮质骨厚度降低,且与野生型(WT)小鼠相比,db/db小鼠的骨形成率也显著下降。由于db/db小鼠骨表型矛盾的结果我们决定使用微型计算机断层扫描(μ CT)检查小鼠的骨骼。高分辨率Micro-CT优于传统的双能X线骨密度仪和组织形态学检测方法,因为它能够以微米分辨率确定骨骼的3D微观结构,是一种更快速、更准确、又不损伤样本内部结构的有效检查方法^[27],尤其是在小动物标本和大型动物离体标本的研究领域,Micro-CT已经成为评价骨形态和骨微结构的“金标准”^[28]。

在本研究中,我们通过高分辨率的Micro-CT对14周龄的db/db小鼠和正常野生型小鼠的胫骨进行检测,发现与野生型小鼠相比,db/db小鼠的胫骨表现为骨体积分数、骨小梁厚度及皮质骨厚度的明显减小,胫骨骨量减少、骨微结构遭到破坏,这与Jing等^[29]的发现相一致。另外,我们还以三角形骨表面辨别分析为基础通过三维分析方法计算获得结构模型指数(SMI)^[30],发现其与野生型小鼠相比增大,表示骨小梁从板状向杆状转变,说明了db/db小鼠胫骨已发生骨质疏松。因此,我们的结果进一步证实,在2型糖尿病小鼠的四肢中可观察到骨微结

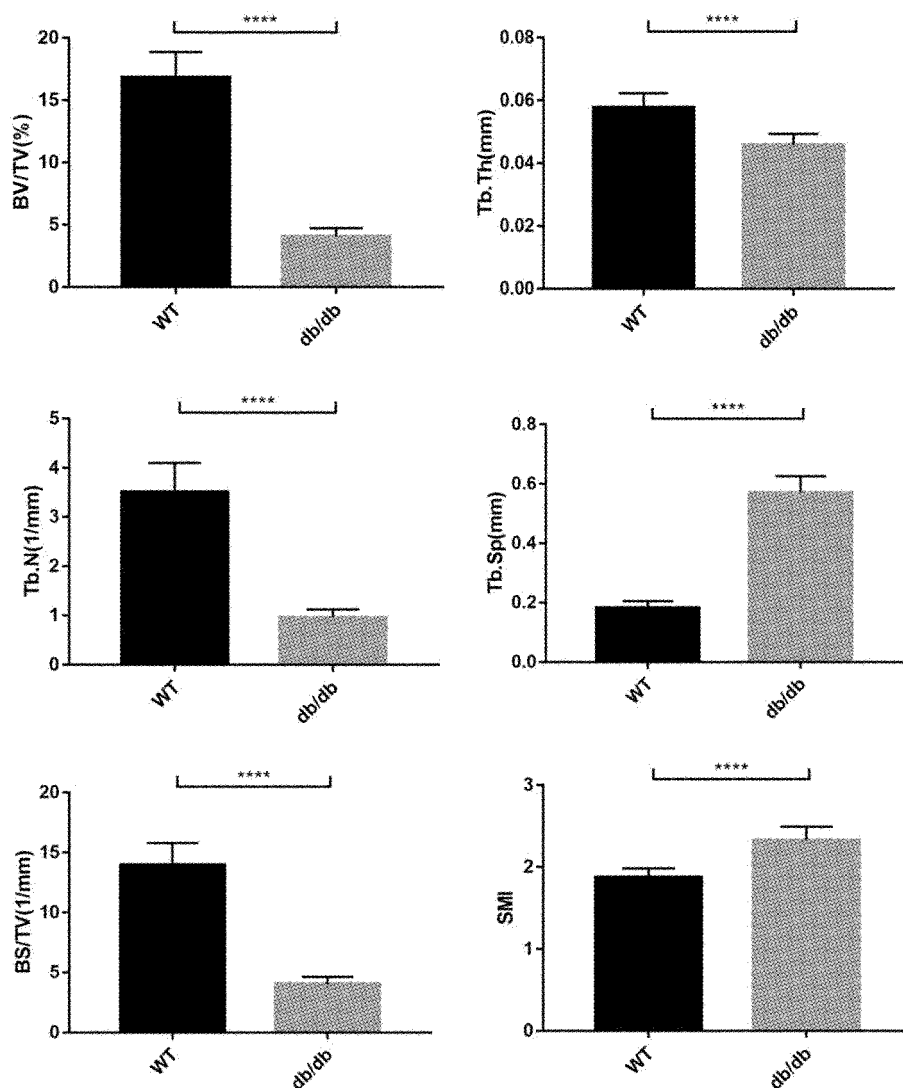
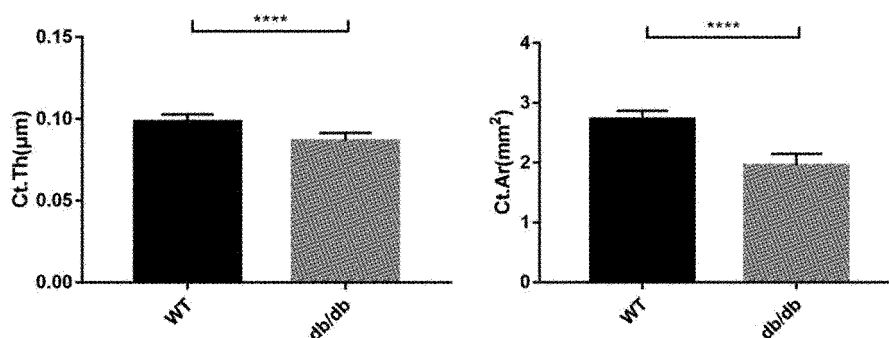


图 3 野生型 (WT) 和 db/db 小鼠胫骨近端骨小梁参数

Fig.3 Parameters of proximal tibial trabecular bone in WT and db/db mice: BV/TV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp, BS/TV and SMI



注: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

图 4 野生型 (WT) 和 db/db 小鼠胫骨近端皮质骨参数

Fig.4 Parameters of proximal tibial cortical bone in wild-type (WT) and db/db mice

构的显著恶化和骨强度的降低。

2 型糖尿病所引起的骨质疏松是糖尿病在骨骼

系统的重要并发症,也是成为糖尿病患者躯体骨骼长期疼痛和功能障碍的主要原因^[31]。DOP 发病机

制复杂、影响因素较多,涉及到多个通路的互相作用,且针对其的治疗手段又十分有限,因此探讨 2 型糖尿病与骨质疏松症间的关系以及影响因素已成为日前学界研究的热点问题之一。日前认为其发病机制主要包括高血糖、胰岛素相对或绝对缺乏、糖尿病微血管病变、激素水平异常等^[32]。其中激素水平异常可能是由于瘦素的影响,有临床观察^[33]显示,2 型糖尿病患者早期血清瘦素水平较高,表现为瘦素抵抗,因此 2 型糖尿病造成的骨质疏松可能与瘦素抵抗有一定的相关性,这与我们观察到的 db/db 小鼠的骨表型相吻合。

一般骨质疏松以骨强度下降为特点,其诊断主要依靠双能 X 线吸收法测定骨密度。然而,由于 DOP 患者早期症状不明显^[34],且通常以低骨转换性骨质疏松为特点,成骨细胞活性下降,骨修复能力受损,有些与骨强度相关的因素如骨微结构在骨密度检测中测不出,骨密度对于预测糖尿病患者的骨折风险具有局限性,因此,对 DOP 的早期诊断方法还有待进一步研究。Samelson 等^[35]通过高分辨率外周定量 CT 扫描 (high resolution peripheral quantitative CT, HR-pQCT) 对 1 069 例社区人群进行研究,结果显示与非糖尿病患者相比,2 型糖尿病患者胫骨骨微结构损伤,皮质骨骨厚度下降,横截面积更小,这与本研究中我们观察到的 2 型糖尿病小鼠中皮质骨厚度 (Ct.Th)、横截面积 (Ct.Ar) 减小,SMI 指数升高,骨微结构受损相符,表明高分辨率外周定量 CT 扫描可能成为早期诊断 DOP 的金标准,且 db/db 小鼠在骨微结构水平上,可能成为与 2 型糖尿病 (T2DM) 相关的继发性骨质疏松症的潜在动物模型。

但我们目前的研究也有一些局限性。首先,由于小鼠股骨颈测量困难,我们改用胫骨近端进行 μ CT 扫描,我们的结果可能不适用于骨折部位在股骨的 2 型糖尿病患者^[36]。其次,我们没有通过血液样本或骨组织形态计量学对骨转换标志进行评估,无法观察到动物模型骨代谢平衡的根本变化。最后,由于目前研究使用的评估技术的局限性,骨微结构的一些特征如皮质孔隙率,一个基质的微裂纹或骨的非矿物质相关特性不能被检测。

总之,本研究显示了 2 型糖尿病小鼠的四肢骨小梁和皮质骨微结构显著恶化,全骨结构特性下降。我们的研究证明了,在缺乏瘦素信号传导的情况下,骨质量和强度会降低,验证了瘦素在体内起着合成代谢骨因子的作用。这也与体外研究和体内给药的

结果相吻合,也表明瘦素对骨细胞的直接促进作用可能会抵消其通过中枢神经系统的抑制作用。由于瘦素不仅在骨骼代谢中起着重要的作用,而且还影响着 2 型糖尿病的发生发展,因此我们通过上述实验,认识到 db/db 小鼠骨代谢的变化,明确了 2 型糖尿病与骨质疏松之间的关系,而且认为 2 型糖尿病所引起的骨代谢变化可能与瘦素受体参与的信号通路相关,为 DOP 的研究方向提供了更具体的分子基础,打开了新的思路和视角,也为以后双联给药和精准医疗埋下了“伏笔”。但目前国内外关于该方面的研究相对局限,如瘦素是否参与 Wnt/ β -catenin 和 OPG/RANKL/RANK 系统等经典信号通路对成骨、破骨细胞的调节,具体是如何对下游基因表达和信号转导起调控作用仍不完全清楚。相信随着研究的深入,瘦素在 2 型糖尿病、骨代谢中的作用以及骨细胞上的瘦素受体在其分化转归中的调控将进一步揭示骨-脂代谢偶联在骨发育及干细胞调控中的作用,并作为潜在靶点为临床治疗糖尿病与骨代谢疾病提供新思路。

【参 考 文 献】

- [1] Miao X, Yonglan W, Wenxing W, et al. Association of LRP5 gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus and osteoporosis in postmenopausal women [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7 (1):247-254.
- [2] Lecka-Czernik Beata. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology [J]. *Diabetologia*, 2017, 60 (7): 1163-1169.
- [3] Hamann C, Kirschner S, Gunther K, et al. Bone, sweet bone-osteoporotic fractures in diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(5), 297-305.
- [4] Luoma K, Riihimäki H, Luukkainen R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration [J]. *Spine*, 200, 25 (4): 487-492.
- [5] Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles AM, et al. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture [J]. *FASEB J*, 1998, 12(9):747-752.
- [6] Rihn JA, Kurd M, Hilibrand AS, et al. The influence of obesity on the outcome of treatment of lumbar disc herniation: analysis of the Spine Patient Outcomes Research Trial (SPORT) [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013, 95(1): 1-8.
- [7] Hughes SP, Freemont AJ, Hukins DW, et al. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2012, 94 (10): 1298-1304.
- [8] Nomura T, Mochida J, Okuma M, et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, 389:94-101.

- [9] Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dys-function in obesity[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1):1-21.
- [10] Thomas T, Gori F, Khosla S, et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(4):1630-1638.
- [11] Cornish J, Callon KE, Bava U, et al. Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo[J]. *Endocrinol*, 2002, 175(2):405-415.
- [12] Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, et al. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis[J]. *Curr Bio*, 1996, 6(9):1170-1180.
- [13] 李娜, 张周, 冯颖. 自发性 II 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30(1):33-38.
- [14] 魏占英, 章振林. Micro-CT 在骨代谢研究中骨微结构指标的解读及应用价值[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018, 11(3):200-205.
- [15] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and Ob RNA in obese and weight-reduced subjects[J]. *Nat Med*, 1995, 1(11):1155-1161.
- [16] Vignaux G, Besnard S, Ndong J, et al. Bone remodeling is regulated by inner ear vestibular signals[J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(10):2136-2144.
- [17] Ge JF, Qi CC, Zhou JN. Imbalance of leptin pathway and hypothalamus synaptic plasticity markers are associated with stress-induced depression in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 249:38-43.
- [18] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372(6505):425-432.
- [19] Zhao CQ, Liu D, Li H, et al. Expression of leptin and its functional receptor on disc cells: contribution to cell proliferation[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008, 33(23):E858-E864.
- [20] Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher GL, et al. Leptin expression by annulus cells in the human intervertebral disc[J]. *Spine J*, 2007, 17(4):437-443.
- [21] Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al. Leptin inhibits osteoclast generation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(2):200-209.
- [22] Thomas T. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(4):1630-1638.
- [23] Ducy P, Ameling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: central control of bone mass[J]. *Cell*, 2000, 100(2):197-207.
- [24] Ealey KN, Fonseca D, Archer MC, et al. Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice[J]. *Regul Pept*, 2006, 136(1-3):9-13.
- [25] He H, Liu R, Desta T, et al. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(1):447-452.
- [26] Williams GA, Callon KE, Watson M, et al. Skeletal phenotype of the leptin receptor-deficient db/db mouse[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(8):1698-1709.
- [27] Mailer R, Van Campenhout H, Van Damme B, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography[J]. *Bone*, 1998, 23(1):59-66.
- [28] Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25:1468-1486.
- [29] Jing Da, Luo Erping, Cai Jing, et al. Mechanical vibration mitigates the decrease of bone quantity and bone quality of leptin receptor-deficient Db/Db mice by promoting bone formation and inhibiting bone resorption[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31:1713-1724.
- [30] Hildebrand T, Rueggsegger P. A new method for the model independent assessment of thickness in three-dimensional images[J]. *J Microsc*, 1997, 185:67-75.
- [31] 李晓宇, 冯正平. 糖尿病性骨质疏松发病机制的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(5):580-583.
- [32] Chen HL, Deng LL, Li JF. Prevalence of osteoporosis and its associated factors among older men with type 2 diabetes[J]. *Int J Endocrinol*, 2013, 2013:285729.
- [33] Kanabrocki EL, Hermida RC, Wright M, et al. Circadian variation of serum leptin in healthy and diabetic men[J]. *Chronobiol Int*, 2001, 18(2):273-283.
- [34] 卢艳慧, 李春霖. 老年 2 型糖尿病合并骨质疏松的临床进展[J]. *中华糖尿病杂志*, 2020, 12(6):353-356.
- [35] Samelson EJ, Demissie S, Cupples LA, et al. Diabetes and deficits in cortical bone density, microarchitecture, and bone size: Framingham HR-Pqet Study[J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(1):54-62.
- [36] Shan PF, Wu XP, Zhang H, et al. Age-related bone mineral density, osteoporosis rate and risk of Vertebral fracture in mainland chinese women with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34(3):190-196.

(收稿日期: 2020-10-11; 修回日期: 2020-12-02)