

# 1型糖尿病模型大鼠股骨骨代谢紊乱及唑来膦酸的影响

曹鲁宁, 崔敏, 于灵芝, 张娜, 赵旭(山东大学附属济南市中心医院疼痛科, 山东省济南市 250013)

## 文章亮点:

唑来膦酸是第3代双膦酸类药物, 主要作用在于抑制破骨细胞, 但也可直接促进成骨细胞活性。实验构建了1型糖尿病模型大鼠, 并应用唑来膦酸干预, 检测股骨骨密度、血清骨碱性磷酸酶, 骨组织骨形态发生蛋白2和Noggin水平, 结果表明预防性应用唑来膦酸可以提高骨形态发生蛋白2表达, 降低Noggin表达, 恢复血清骨碱性磷酸酶水平, 提高骨密度, 改善骨代谢。

## 关键词:

实验动物; 骨及关节损伤动物模型; 唑来膦酸; 糖尿病; 骨质疏松; 成骨细胞; 骨形态发生蛋白2; Noggin; 骨密度; 骨碱性磷酸酶

## 主题词:

糖尿病, 1型; 骨质疏松; 骨疾病, 代谢性; 骨密度

## 基金资助:

山东省科技攻关计划(2011GSF11817)

## 摘要

背景: 糖尿病引起的骨质疏松作为常见的继发性骨质疏松, 近年来越来越受到重视; 唑来膦酸作为新型治疗骨质疏松的药物, 其对体内成骨细胞的作用尚未完全清楚。

目的: 观察1型糖尿病大鼠股骨干骺端骨形态发生蛋白2与Noggin的表达变化, 以及唑来膦酸的干预作用。

方法: 随机取130只Wistar大鼠腹腔注射链脲佐菌素建立1型糖尿病模型, 3d后连续3次血糖>16.7 mmol/L鼠为造模成功鼠, 共120只, 随机等分为模型组、预防组和治疗组。后2组大鼠分别在造模后当天和2周后一次性静脉给予唑来膦酸(0.1 mg/kg)。另取40只大鼠注射柠檬酸缓冲液作为对照组。

结果与结论: 与对照组相比, 模型组大鼠股骨骨密度、血清碱性磷酸酶水平、股骨骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平明显降低( $P < 0.05$ ), Noggin mRNA表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 预防组和治疗组大鼠骨密度和骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平显著升高( $P < 0.05$ ), Noggin mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ ), 血清骨碱性磷酸酶水平也逐渐恢复。提示1型糖尿病大鼠骨代谢紊乱在病程早期即出现, 而应用唑来膦酸可以促进骨形成, 增加骨密度, 改善骨代谢。

曹鲁宁, 崔敏, 于灵芝, 张娜, 赵旭. 1型糖尿病模型大鼠股骨骨代谢紊乱及唑来膦酸的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(40):6402-6407.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.40.002

## Effects of zoledronic acid on bone metabolism disturbance in the femur of type 1 diabetic rat models

Cao Lu-ning, Cui Min, Yu Ling-zhi, Zhang Na, Zhao Xu (Department of Pain Management, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, Shandong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Osteoporosis caused by diabetes mellitus as common secondary osteoporosis has been paid more and more attention recently. Zoledronic acid serves as a novel drug for osteoporosis, and its effect on osteoblasts *in vivo* remains unclear.

**OBJECTIVE:** To investigate the changes of the expression of bone morphogenetic protein 2 and *Noggin* in the femur of type 1 diabetes mellitus rats and the effect of zoledronic acid on them.

**METHODS:** Models of type 1 diabetes mellitus were established by intraperitoneal injection of streptozotocin in 130 Wistar rats. 3 days later, rats with blood sugar > 16.7 mmol/L for three consecutive times were considered as successful models, 120 in total. These models were randomly divided into model, prevention and treatment groups. Rats in the prevention and treatment groups were intravenously administered zoledronic acid (0.1 mg/kg) on the day of modeling and 2 weeks after model establishment. An additional 40 rats were injected with citrate buffer solution as control group.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, femur bone mineral density, serum alkaline phosphatase levels, and femur bone morphogenetic protein 2 mRNA expression levels were significantly lower in the model group ( $P < 0.05$ ), but *Noggin* mRNA expression significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, bone mineral density and bone morphogenetic protein 2 mRNA expression levels were significantly

曹鲁宁, 男, 1988年生, 山东大学在读硕士, 主要从事疼痛学研究。

通讯作者: 于灵芝, 博士, 主任医师, 山东大学附属济南市中心医院疼痛科, 山东省济南市 250013

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)40-06402-06

稿件接受: 2015-07-03

http://www.crter.org

Cao Lu-ning, Studying for master's degree, Department of Pain Management, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, Shandong Province, China

Corresponding author: Yu Ling-zhi, M.D., Chief physician, Department of Pain Management, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, Shandong Province, China

Accepted: 2015-07-03

higher in the prevention and treatment groups ( $P < 0.05$ ), but *Noggin* mRNA expression significantly lower ( $P < 0.05$ ), and serum alkaline phosphatase levels gradually restored. These results indicated that the bone metabolic disturbance occurs in early stage in rats with type 1 diabetes mellitus. Zoledronic acid can promote bone formation, increase bone density, and improve bone metabolism.

**Subject headings:** Diabetes Mellitus, Type 1; Osteoporosis; Bone Diseases, Metabolic; Bone Density

**Funding:** the Science and Technology Project of Shandong Province of China, No. 2011GSF11817

Cao LN, Cui M, Yu LZ, Zhang N, Zhao X. Effects of zoledronic acid on bone metabolism disturbance in the femur of type 1 diabetic rat models. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(40):6402-6407.

## 0 引言 Introduction

骨代谢紊乱是1型糖尿病常见的并发症之一<sup>[1]</sup>, 流行病学调查显示, 与普通人群相比, 1型糖尿病患者骨质疏松的发病率和骨质疏松性骨折的危险性均明显增加<sup>[2]</sup>。虽然1型糖尿病可以引起骨流失已得到基本共识, 但是其发病机制尚不完全清楚, 而且在对1型糖尿病引起的骨并发症的预防和治疗方面尚无可靠完善的方案。作为一种主要的抗骨质疏松药物, 唑来膦酸已经在众多临床试验中被证明可以提高原发性骨质疏松和绝经后骨质疏松的骨密度, 减少骨折风险, 但是对糖尿病继发性骨质疏松治疗的研究比较少<sup>[3-5]</sup>。且唑来膦酸抗骨质疏松主要是通过抑制破骨细胞来起作用的, 其对成骨细胞尤其是在体内的作用尚不完全清楚<sup>[6]</sup>。骨形态发生蛋白2作为促进成骨细胞的主要细胞因子, 能很好的反映成骨细胞的骨形成作用<sup>[7]</sup>。本实验通过建立1型糖尿病大鼠模型, 并且用唑来膦酸进行干预, 检测股骨干骺端骨形态发生蛋白2及*Noggin* mRNA表达, 同时测量骨密度和血清骨代谢指标骨碱性磷酸酶, 探讨骨形态发生蛋白2及*Noggin*在糖尿病致骨流失中的作用以及唑来膦酸对1型糖尿病大鼠骨形成代谢的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 造模动物及材料** SPF级健康雌性Wistar大鼠170只, 鼠龄6-8周, 体质量(200±20)g, 购自山东大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK(鲁)20090001, 于山东大学齐鲁医院基础实验室饲养, 为百级实验室, 室温保持于23℃, 室内相对湿度60%-80%, 12 h/12 h光暗交替。实验期间动物给以标准颗粒饲料喂养, 自由进食、进水。

唑来膦酸对1型糖尿病大鼠的影响检测使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
RNA提取试剂	RANiso Plus
反转录试剂盒和PCR试剂盒	大连宝生物工程有限公司
血清骨碱性磷酸酶ELISA试剂盒	美国安迪公司
XR-46型DEXA骨密度测量仪	美国Noland公司
ND2000紫外线可见光光度计	美国Nanodrop公司
LightCycler® 480II PCR仪	瑞士Roche公司

链脲佐菌素购自美国Sigma公司。唑来膦酸购自诺华药品公司(Novartis Pharma AG), 1 mg溶于2 mL生理盐水

配成唑来膦酸生理盐水注射液(0.5 g/L)。

**1.2 造模方法** 实验于2012年12月至2014年7月在山东大学齐鲁医院基础实验室完成。

**制备糖尿病模型大鼠及分组:** 随机取130只大鼠腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)建立1型糖尿病模型, 3 d后测随机血糖, 连续3次血糖> 16.7 mmol/L者为造模成功。另40只大鼠注射等量柠檬酸缓冲液作为对照组。将120只造模成功的大鼠随机等分为模型组、预防组和治疗组。后2组大鼠分别在造模后当天和2周后一次性静脉给予唑来膦酸(0.1 mg/kg)。各组大鼠均给予普通颗粒饲料喂养, 并于每周测随机血糖。

**成模大鼠标本收集:** 分别于成模后第1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 16周, 每组各取5只大鼠。腹腔注射1%氯胺酮(100 mg/kg)麻醉大鼠, 称质量后固定并处死, 留存全血室温静置1 h后3 000 r/min离心10 min, 取上层血清约3 mL, 用于检测骨代谢指标骨碱性磷酸酶水平; 测血糖后分离左右股骨, 仔细去除附着的肌肉、筋膜及肌腱等组织, 左侧股骨用生理盐水浸泡的纱布包裹, 用来进行股骨骨密度检测; 右侧股骨干骺端于-80℃保存, 用于实时荧光定量RT-PCR法检测骨形态发生蛋白2及*Noggin* mRNA的表达。

**1.3 大鼠股骨总骨密度测定** 采用XR-46型DEXA骨密度测量仪, 使用小动物测量软件, 测量左侧股骨骨密度, 测量时股骨长轴方向与测量仪臂相垂直放置, 扫描速度30 mm/s, 扫描宽度1.0 cm。

**1.4 血清中骨代谢指标碱性磷酸酶测定** 用ELISA法测定血清骨代谢指标碱性磷酸酶水平, 操作方法和步骤完全按照试剂盒说明书进行。

**1.5 股骨干骺端骨形态发生蛋白2及*Noggin* mRNA表达水平的测量** 用实时定量PCR法检测股骨干骺端骨形态发生蛋白2及*Noggin* mRNA的表达。应用Trizol法提取大鼠股骨总RNA后, 用ND2000紫外线可见光光度计测定RNA浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的完整性。将测定符合的RNA应用两步法行反转录反应。委托大连宝生物工程有限公司设计合成引物, PAGE方式纯化, 引物序列见下表: *Noggin*引物正向: 5'-GAA GTT ACA GAT GTG GCTGTG GTC-3', 反向: 5'-AAG CAG CTG CCC ACC TTC A-3', 产物长度108 bp; 骨形态发生蛋白2引物正向: 5'-ACC GTG CTC AGC TTC CAT CAC-3', 反向: 5'-CTA

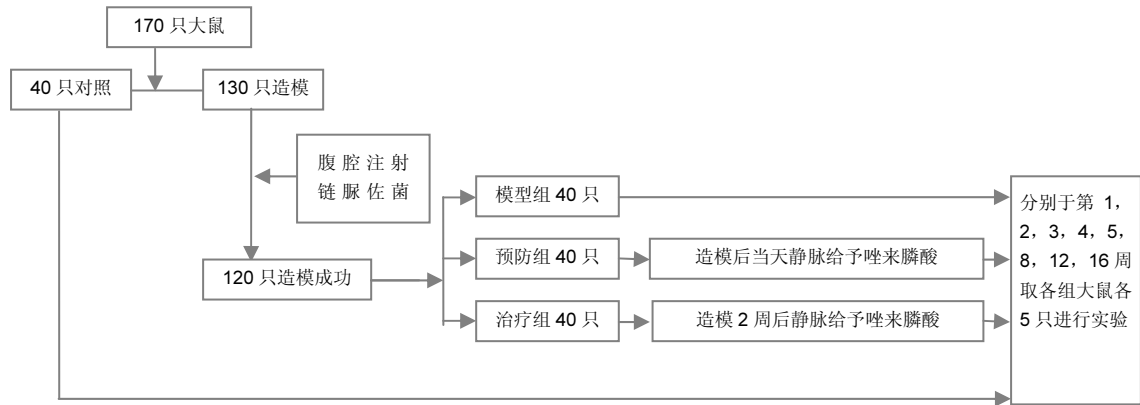


图1 糖尿病大鼠模型的建模流程图

Figure 1 Flowchart of establishment of rat models of diabetes mellitus

TTT CCC AAA GCT TCC TGC ATT T-3', 产物长度96 bp;  
 $\beta$ -actin引物正向: 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA-3', 反向: 5'-CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG-3', 产物长度116 bp。

在Roche LC480 Real-Time PCR System上进行实时PCR反应: 预变性, 95 °C 5 min; PCR反应, 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 45个循环; 溶解曲线: 95 °C 5 s, 65 °C 1 min; 冷却: 40 °C, 30 s。

采用比较阈值法计算目的基因的量, 计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中 $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{模型组} - \Delta Ct_{对照组}$ 。计算各组骨形态发生蛋白2及Noggin mRNA相对表达水平。

**1.6 主要观察指标** 大鼠股骨总骨密度、血清中碱性磷酸酶水平及股骨干骺端骨形态发生蛋白2及Noggin mRNA表达水平。

**1.7 统计学分析** 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用SPSS 16.0统计学软件进行t检验和方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用大鼠170只, 40只作为对照组。130只造模, 其中10只造模不成功, 120只造模成功的大鼠最终均纳入实验, 分为模型组( $n=40$ )、预防组( $n=40$ )和治疗组( $n=40$ )。3组大鼠均进入统计分析。实验流程图见图1。

**2.2 唑来膦酸对糖尿病模型大鼠血糖的影响** 模型组大鼠血糖水平明显高于对照组( $P < 0.01$ ), 与模型组相比, 预防组和治疗组大鼠血糖水平差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图2。

**2.3 唑来膦酸对糖尿病模型大鼠股骨骨密度的影响** 与对照组相比, 模型组大鼠股骨骨密度从第4周开始显著降低并持续到16周( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 预防组大鼠股骨骨密度从第4周开始明显升高并持续到16周( $P < 0.05$ ), 而

治疗组大鼠股骨骨密度从第8周才开始明显升高( $P < 0.05$ ); 治疗组大鼠股骨骨密度在16周前一直低于预防组( $P < 0.05$ ), 见图3。

**2.4 唑来膦酸对糖尿病模型大鼠血清碱性磷酸酶水平的影响** 与对照组相比, 模型组大鼠血清碱性磷酸酶水平从第2周开始显著下降( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 预防组大鼠血清碱性磷酸酶水平从第2周开始显著升高( $P < 0.05$ ), 治疗组大鼠血清碱性磷酸酶水平在第3周时显著降低( $P < 0.05$ ), 第4周后显著回升( $P < 0.05$ )一直持续到16周。与预防组相比, 治疗组血清碱性磷酸酶浓度在第3, 8周明显降低( $P < 0.05$ ), 第12周明显升高( $P < 0.05$ ), 见图4。

**2.5 唑来膦酸对糖尿病模型大鼠股骨骨形态发生蛋白2及Noggin mRNA表达水平的影响**

**2.5.1 骨形态发生蛋白2 mRNA** 与对照组相比, 模型组大鼠股骨骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平从第2周开始显著降低( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 预防组大鼠股骨中骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平从第2周开始明显升高( $P < 0.05$ ), 但到16周时却显著降低( $P < 0.05$ ), 治疗组大鼠股骨中骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平从第4周(用药2周后)开始明显升高( $P < 0.05$ ), 第5周出现一过性降低后, 8周开始又明显升高( $P < 0.05$ )并持续到16周, 2组整体均呈上升趋势; 与预防组相比, 治疗组大鼠股骨中骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平在8周前除第4周外( $P > 0.05$ )均明显降低( $P < 0.05$ ), 但到第12、16周时却明显升高( $P < 0.05$ ), 见图5。

**2.5.2 Noggin mRNA** 与对照组相比, 模型组大鼠股骨中Noggin mRNA表达水平从第1周开始就显著升高( $P < 0.05$ ), 并持续到16周; 与模型组相比, 预防组和治疗组大鼠股骨中Noggin mRNA表达水平均是从第4周开始显著降低( $P < 0.05$ ), 并持续到16周; 与预防组相比, 治疗组大鼠股骨中Noggin mRNA表达水平在第12, 16周时明显升高( $P < 0.05$ ), 见图6。

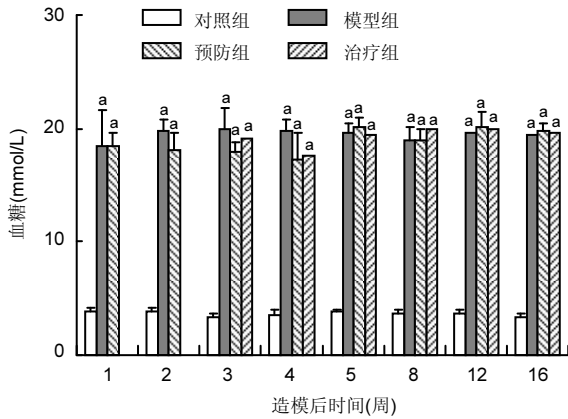


图2 各组大鼠血糖水平变化  
Figure 2 Changes of blood glucose level in rats of each group  
图注: 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05。

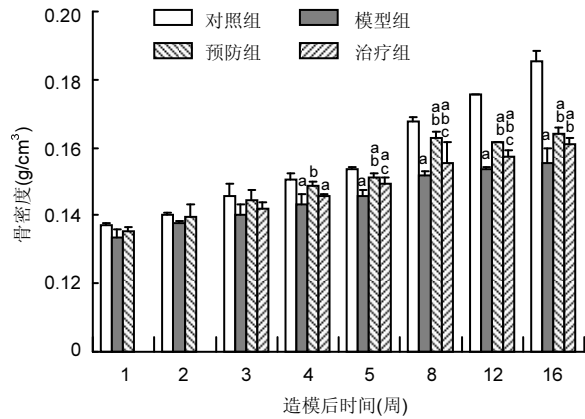


图3 各组大鼠骨密度的变化  
Figure 3 Changes of bone mineral density in rats of each group  
图注: 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与预防组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05。

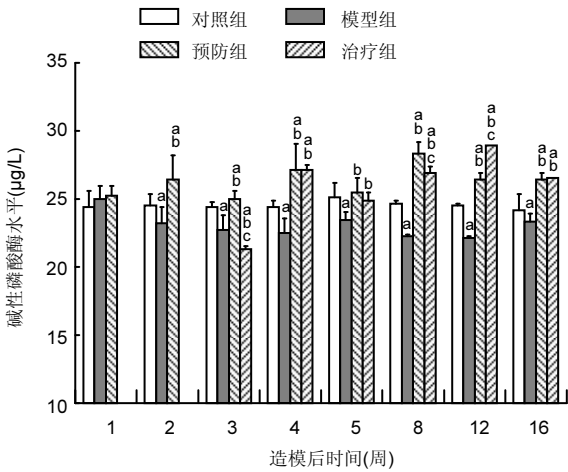


图4 各组大鼠血清碱性磷酸酶水平变化  
Figure 4 Changes of serum alkaline phosphatase levels in rats of each group  
图注: 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与预防组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05。

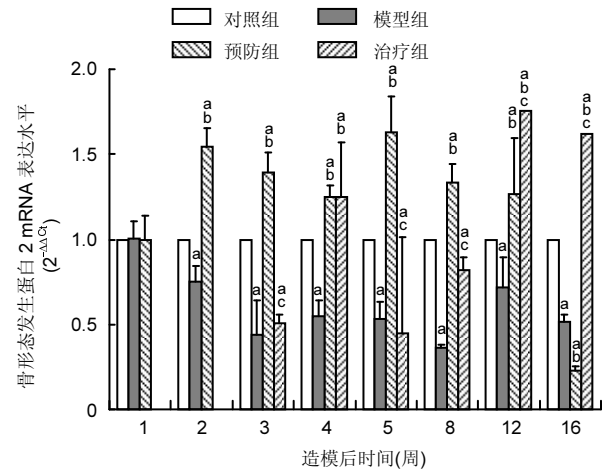


图5 各组大鼠骨形态发生蛋白2 mRNA表达水平变化  
Figure 5 Changes of expression of bone morphogenetic protein 2 mRNA in rats of each group  
图注: 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与预防组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05。

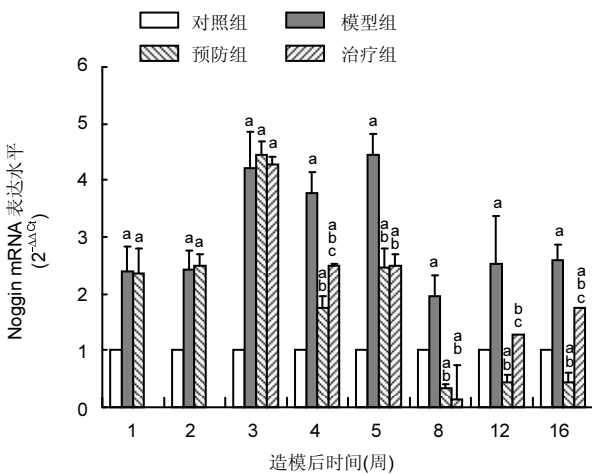


图6 各组大鼠 Noggin mRNA 表达变化  
Figure 6 Changes of expression of Noggin mRNA in rats of each group  
图注: 与对照组相比, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与模型组相比, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与预防组相比, <sup>c</sup>*P* < 0.05。

### 3 讨论 Discussion

1型糖尿病是一种以胰岛素绝对缺乏、能量代谢紊乱为主要特征的自身免疫性疾病。常伴有多个系统器官的并发症, 其中骨代谢紊乱是常见的并发症之一, 可以引起骨组织显微结构改变, 骨量减少, 骨折发生率增高, 进而导致代谢性骨病的发生<sup>[8]</sup>。与原发性骨质疏松主要由破骨细胞引起的骨吸收增加的发病机制不同, 1型糖尿病所引起的继发性骨质疏松导致的骨流失主要是由于成骨细胞活性降低导致的骨形成不足所致的, 因此作者检测的大都是关于骨形成的指标<sup>[9]</sup>。唑来膦酸作为作为第3代双膦酸盐类药物, 主要通过抑制破骨细胞的骨吸收抑制骨流失, 近几年研究表明唑来膦酸除了对破骨细胞的直接作用外, 也可以直接影响着体外成骨细胞功能, 促进体内骨形成<sup>[10-11]</sup>, 本实验进一步证明了唑来膦酸体内促进成骨细胞活性的作用。

动物实验中常用链脲佐菌素诱导制作1型糖尿病模型, 通过破坏胰岛B细胞类似于人类1型糖尿病, 特点是温和、

中度高糖、糖尿、杂食性、低胰岛素血症、高脂血症和体质质量丢失,也呈现人类糖尿病的许多并发症表现,其中就包括骨量丢失<sup>[12]</sup>。本实验通过单次腹腔注射链脲佐菌素建立1型糖尿病模型,造模后血糖一直维持在高水平( $P < 0.01$ )。课题组先前的实验结果显示早在第2周时骨形态发生蛋白2和Noggin mRNA表达就出现变化<sup>[13-14]</sup>,因此预防组和治疗组分别选择在造模当天和2周时进行干预,目的是观察在不同时间点预防性应用唑来膦酸对1型糖尿病大鼠骨代谢的影响。

骨密度是目前诊断骨质疏松、预测骨质疏松性骨折风险、监测自然病程以及评价药物干预疗效的最佳定量指标,通过双能X射线吸收法测量的骨密度值可以准确的估量骨量流失的程度<sup>[15]</sup>。本实验结果显示对照组大鼠随年龄的增长骨密度逐渐增加,而模型组骨密度的增加则受到限制,且从第4周开始即明显低于正常生长大鼠,说明在此时已经出现了明显的骨流失。国内孙明霞等<sup>[16]</sup>关于1型糖尿病人骨密度变化研究的结果显示1型糖尿病人骨密度明显低于正常人,与本实验得出的1型糖尿病大鼠股骨骨密度低于正常大鼠的结果相符。血清骨代谢指标骨碱性磷酸酶由成骨细胞合成,成骨细胞中含有大量的骨碱性磷酸酶,骨碱性磷酸酶是最常见的评价骨形成和骨转换的指标,可反映成骨细胞活性<sup>[17]</sup>。与对照组相比,模型组在第2周时血清骨碱性磷酸酶水平明显降低,反应早于骨密度变化,糖尿病大鼠早期就出现了成骨细胞活性降低,成骨能力下降,此时已出现明显的骨流失。在造模初始阶段就应用唑来膦酸的预防组血清骨碱性磷酸酶水平从第2周开始就明显高于模型组,骨密度也从第4周开始高于模型组,说明唑来膦酸应用后可以通过促进成骨细胞活性来促进骨形成,减少骨流失,平衡骨代谢。实验在第2周这个时间点增加了治疗组,虽然用药之后治疗组骨密度也逐渐升高,但是与同时间点更早应用唑来膦酸的预防组相比还是明显较低,这说明在1型糖尿病早期越早的应用唑来膦酸,能更好的延缓糖尿病对骨的破坏,减少骨流失。

骨形态发生蛋白2属于骨形态发生蛋白中的一种细胞因子,骨形态发生蛋白是转化生长因子 $\beta$ 超家族的成员,具有促进骨形成和维持骨代谢动态平衡的能力,目前已经有超过20种不同的骨形态发生蛋白被发现<sup>[18-19]</sup>。作为骨形态发生蛋白中对成骨细胞分化调节作用最强的细胞因子,骨形态发生蛋白2由正常的成骨细胞表达,被证明在胚胎骨骼发育期具有刺激成骨细胞分化和骨生成以及出生后的体内外的刺激骨生成的能力。Kanakaris等<sup>[20]</sup>在其对骨质疏松相关研究中提出骨质疏松的发病机制与骨形态发生蛋白2的表达有关,并因此认为骨形态发生蛋白2将成为骨质疏松治疗的潜在靶分子。Seeherman等<sup>[21]</sup>在对骨质疏松骨折预防方面的研究中向骨质疏松灵长类动物股骨颈内进行6个月内单次注射重组人骨形态发生蛋白2,发现骨结构和骨力学性能的增强,为临床可能使用重组人骨形态发生蛋白2预防

骨质疏松骨折发生提供理论依据。骨形态发生蛋白2在多种糖尿病并发症的发生中均起着重要作用,例如糖尿病导致的动脉硬化、糖尿病肾病,糖尿病口腔病变等<sup>[22]</sup>,本实验结果显示1型糖尿病大鼠股骨骨形态发生蛋白2 mRNA表达降低,进一步证明了骨形态发生蛋白2可能在糖尿病导致的骨流失中发挥着重要的作用。

Noggin作为骨形态发生蛋白2的特异性拮抗剂,可与骨形态发生蛋白2结合并遮蔽了骨形态发生蛋白2上的受体结合位点,从而抑制骨形态发生蛋白2与其它受体结合<sup>[23]</sup>。有研究显示Noggin通过抑制骨形态发生蛋白2的表达在骨形成作用中发挥着重要的作用<sup>[24]</sup>。一项关于Noggin基因的动物实验结果显示,Noggin基因超表达的转基因小鼠出现骨形成降低及骨密度降低<sup>[25]</sup>,但最近又有研究表明Noggin基因的失活可以导致骨质减少<sup>[26]</sup>,因此Noggin基因的过量和缺失都可能会引起骨代谢的变化,当其维持的一定时才可以保证骨代谢的稳定。以上关于Noggin的研究多集中于骨形成、骨重建方面<sup>[27]</sup>,在糖尿病致骨流失方面的研究却很少。而在Noggin和骨形态发生蛋白2表达平衡方面的研究,尚没有关于糖尿病骨质疏松的报道。但是关于骨折方面已有相关报道,Debeer等<sup>[28]</sup>在其研究中发现Noggin与骨形态发生蛋白2的表达失衡可以影响骨折的愈合,甚至可以引起骨折的不愈合。本实验结果显示1型糖尿病大鼠在第1周时就出现了股骨Noggin mRNA表达的升高,并且随着病程的进展一直存在,而同时第2周后骨形态发生蛋白2 mRNA表达和血清骨碱性磷酸酶水平则显著降低,随之出现了骨密度的下降,出现了明显骨流失,说明了糖尿病骨流失的发生可能和Noggin与骨形态发生蛋白2表达失调有关,这种变化导致成骨细胞活性降低,成骨能力减弱,进而引起骨流失,Noggin和骨形态发生蛋白2均参与了糖尿病骨流失的发生发展。在应用唑来膦酸后骨形态发生蛋白2 mRNA表达升高,Noggin mRNA表达降低,随后骨密度也逐渐增加,这表明唑来膦酸可以通过影响这两种成骨因子的基因表达来促进骨形成,抑制1型糖尿病导致的骨流失。

总之,实验结果证明1型糖尿病大鼠股骨骨形态发生蛋白2和Noggin mRNA表达发生了变化,这种变化可能在1型糖尿病导致的骨流失中发挥着重要作用。此外,在1型糖尿病早期预防性应用唑来膦酸可以通过降低Noggin mRNA表达,升高骨形态发生蛋白2 mRNA表达来促进成骨细胞活性,保护1型糖尿病导致的骨破坏,提高骨密度,而且越早应用效果会越好。

**致谢:** 感谢山东大学附属济南市中心医院疼痛科、齐鲁医院基础实验室各位老师给予的帮助。

**作者贡献:** 实验设计为曹鲁宁、崔敏,实验实施为曹鲁宁、崔敏、张娜、赵旭,实验评估为曹鲁宁、崔敏,资料搜集为曹鲁宁、张娜,通讯作者审核。

**利益冲突:** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

**伦理问题:** 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 唑来膦酸-是一种特异性地作用于骨的二膦酸化合物, 能抑制因破骨活性增加而导致的骨吸收。二膦酸化合物对骨组织选择性作用依赖于其对矿化骨的高亲和性作用的分子机制还不清楚。长期动物研究表明, 唑来膦酸可抑制骨吸收, 但对骨的形成、骨的矿化及力学特性没有不良影响

**作者声明:** 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

#### 4 参考文献 References

- [1] Janghorbani M, Hu FB, Willett WC, et al. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. *Diabetes Care*. 2007;30(7):1730-1735.
- [2] Neumann T, Sämann A, Lodes S, et al. Glycaemic control is positively associated with prevalent fractures but not with bone mineral density in patients with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011;28(7):872-875.
- [3] Cosman F. Treatment of osteoporosis and prevention of new fractures: role of intravenously administered bisphosphonates. *Endocr Pract*. 2009;15(5):483-493.
- [4] Diab DL, Watts NB. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(3):487-506.
- [5] Huang S, Lin H, Zhu X, et al. Zoledronic acid increases bone mineral density and improves health-related quality of life over two years of treatment in Chinese women with postmenopausal osteoporosis. *Endokrynol Pol*. 2014;65(2):96-104.
- [6] Terpos E, Dimopoulos MA, Berenson J. Established role of bisphosphonate therapy for prevention of skeletal complications from myeloma bone disease. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;77 Suppl 1:S13-23.
- [7] Kamiya N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(2):153-163.
- [8] Liu EY, Wactawski-Wende J, Donahue RP, et al. Does low bone mineral density start in post-teenage years in women with type 1 diabetes? *Diabetes Care*. 2003;26(8):2365-2369.
- [9] Heap J, Murray MA, Miller SC, et al. Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr*. 2004;144(1):56-62.
- [10] Ebeling PR, Burr DB. Positive effects of intravenous zoledronic acid on bone remodeling and structure: are different effects on osteoblast activity to other oral bisphosphonates responsible? *J Bone Miner Res*. 2008;23(1):2-5.
- [11] Debais F. Biomarkers of bone remodelling. *Bull Cancer*. 2013;100(11):1093-1100.
- [12] Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, et al. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol*. 2014;222(3):G13-25.
- [13] Cui M, Yu L Z, Zhang N, et al. Zoledronic acid improves bone quality in the streptozotocin-induced diabetes rat through upregulating the expression of osteogenic genes. *Osteoporos Int*. 2013;24:S635-S636.
- [14] Yu LZ, Cui M, Sun J. Bone quality changes in the streptozotocin-induced diabetes rat and the effect of zoledronic acid through upregulating the expression of the osteogenic genes. *J Bone Miner Res*. 2014;29(9):s405.
- [15] Silva MJ, Touhey DC. Bone formation after damaging in vivo fatigue loading results in recovery of whole-bone monotonic strength and increased fatigue life. *J Orthop Res*. 2007;25(2):252-261.
- [16] 孙明霞, 韩琳, 王国明, 等. 1型糖尿病病人骨密度的变化及其影响因素[J]. 青岛大学医学院学报, 2014, 50(4):432-434.
- [17] Massé PG, Pacifique MB, Tranchant CC, et al. Bone metabolic abnormalities associated with well-controlled type 1 diabetes (IDDM) in young adult women: a disease complication often ignored or neglected. *J Am Coll Nutr*. 2010;29(4):419-429.
- [18] Mace PD, Cutfield JF, Cutfield SM. High resolution structures of the bone morphogenetic protein type II receptor in two crystal forms: implications for ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(4):831-838.
- [19] Cao X, Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*. 2005;357(1):1-8.
- [20] Kanakaris NK, Petsatodis G, Tagil M, et al. Is there a role for bone morphogenetic proteins in osteoporotic fractures? *Injury*. 2009;40 Suppl 3:S21-26.
- [21] Seeherman HJ, Li XJ, Smith E, et al. Intraosseous injection of rhBMP-2/calcium phosphate matrix improves bone structure and strength in the proximal aspect of the femur in chronic ovariectomized nonhuman primates. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(1):36-47.
- [22] Wang Y, Shan J, Yang W, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) mediates high-glucose-induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins. *Inflammation*. 2013;36(6):1592-1604.
- [23] Zehentner BK, Haussmann A, Burtscher H. The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation. *Dev Growth Differ*. 2002;44(1):1-9.
- [24] Moffett SP, Dillon KA, Yerges LM, et al. Identification and association analysis of single nucleotide polymorphisms in the human noggin (NOG) gene and osteoporosis phenotypes. *Bone*. 2009;44(5):999-1002.
- [25] Wu XB, Li Y, Schneider A, et al. Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J Clin Invest*. 2003;112(6):924-934.
- [26] Baud'huin M, Solban N, Cornwall-Brady M, et al. A soluble bone morphogenetic protein type IA receptor increases bone mass and bone strength. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(30):12207-12212.
- [27] Debeer P, Huysmans C, Van de Ven WJ, et al. Carpal and tarsal synostoses and transverse reduction defects of the toes in two brothers heterozygous for a double de novo NOGGIN mutation. *Am J Med Genet A*. 2005;134(3):318-320.
- [28] Debeer P, Huysmans C, Van de Ven WJ, et al. Carpal and tarsal synostoses and transverse reduction defects of the toes in two brothers heterozygous for a double de novo NOGGIN mutation. *Am J Med Genet A*. 2005;134(3):318-320.