

高糖环境对小鼠成骨细胞功能及骨质量的作用及其机制

郭志康¹, 李雪¹, 王睿¹, 谢喜秀², 冯韬锦³, 李毅³, 尹鹏滨³, 许莉军¹, 张丽侠^{1*}¹郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南郑州 450052; ²中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190; ³解放军总医院第四医学中心骨科医学部, 北京 100048

[中图分类号] R587.2 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1910.2025.0509

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 郭志康, 李雪, 王睿, 等. 高糖环境对小鼠成骨细胞功能及骨质量的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(10): 1306-1314.

[收稿日期] 2024-11-28

[录用日期] 2025-04-10

[上线日期] 2025-05-09

[摘要] **目的** 观察不同浓度葡萄糖对小鼠成骨细胞合成及分泌骨胶原蛋白的影响, 分析糖尿病对小鼠骨质量的影响。**方法** (1)采用胶原蛋白酶消化乳鼠的颅骨以提取小鼠原代成骨细胞, 在不同葡萄糖浓度条件下, 将实验分为4组, 分别在标准糖(5.5 mmol/L)、中糖(11.5 mmol/L)、中高糖(16.5 mmol/L)和高糖(25 mmol/L)环境进行细胞培养。采用EdU染色观察细胞增殖能力, Transwell实验评估细胞迁移能力。采用细胞免疫荧光法及Western blotting检测并定量分析I型胶原蛋白(Col-1)的含量。采用茜素红S(ARS)染色、碱性磷酸酶(ALP)染色评估不同浓度葡萄糖环境对成骨分化能力的影响。(2)将6周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组与模型组, 每组5只。模型组给予高脂饮食4周后注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病小鼠模型, 对两组小鼠原代成骨细胞进行成骨分化能力评估。(3)使用微型计算机断层扫描(Micro-CT)分析股骨的骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)和骨小梁分离度(Tb.Sp), 三点弯曲测试评估最大载荷、杨氏模量、断裂能、刚度力学参数。采用RT-qPCR检测成骨分化基因 Alp 、 Opn 、 $Col1a1$ 及 Lox 基因的表达, 并采用Masson和Mallory染色法评估骨小梁上Col-1的含量。**结果** (1)EdU及Transwell实验结果显示, 随着葡萄糖浓度的逐渐升高, 成骨细胞的增殖及迁移能力明显下降($P<0.001$), 且成骨细胞Col-1及赖氨酸氧化酶(LOX)的蛋白表达水平明显降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。ARS及ALP染色实验结果显示, 随着糖浓度的升高, 成骨细胞钙盐沉积量及ALP活性明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。(2)与对照组比较, 模型组小鼠表现出糖尿病相关的“三多一少”症状, ARS及ALP染色显示成骨细胞均明显减少($P<0.001$)。(3)Micro-CT及三点弯曲测试结果显示, 与对照组比较, 模型组出现骨微结构改变, Tb.N减少, Tb.Sp增加, 最大载荷、杨氏模量、断裂能、刚度明显降低($P<0.05$)。RT-qPCR实验结果显示, 与对照组比较, 模型组成骨分化基因 Alp 、 Opn 、 $Col1a1$ 及 Lox 的mRNA相对表达量均降低($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。Masson和Mallory染色结果显示, 与对照组比较, 模型组胶原蛋白含量明显减少($P<0.01$)。**结论** 高糖环境可抑制小鼠成骨细胞的增殖分化及迁移能力; 糖尿病小鼠的骨质量下降、脆性增加, 赖氨酸氧化酶及胶原蛋白含量的减少可能参与该过程。

[关键词] 糖尿病; 高糖环境; 成骨细胞; 骨胶原蛋白; 骨质量

Effect and mechanism of high-glucose environment on osteoblast function and bone quality in mice

Guo Zhi-Kang¹, Li Xue¹, Wang Rui¹, Xie Xi-Xiu², Feng Tao-Jin³, Li Yi³, Yin Peng-Bin³, Xu Li-Jun¹, Zhang Li-Xia^{1*}¹Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China²State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China³Department of Orthopedic Medicine, the Fourth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China

*Corresponding author, E-mail: zhlx321@126.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82000843)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of different glucose concentrations on the synthesis and secretion of bone collagen in osteoblasts and the impact of diabetes on bone quality in mice. **Methods** (1) Primary osteoblasts were extracted from

[基金项目] 国家自然科学基金(82000843)

[作者简介] 郭志康, 硕士研究生, 主要从事糖尿病骨质量下降机制方面的研究

[通信作者] 张丽侠, E-mail: zhlx321@126.com

the skulls of neonatal mice *via* collagenase digestion and cultured in four groups under different glucose concentrations: normal glucose (5.5 mmol/L), moderate glucose (11.5 mmol/L), moderate-high glucose (16.5 mmol/L), and high glucose (25 mmol/L). EdU staining was performed to evaluate cell proliferation, while the Transwell assay was used to assess cell migration. Immunofluorescence and Western blotting were performed to detect and quantitatively analyze the content of type I collagen (Col-1). Alizarin red S (ARS) staining and alkaline phosphatase (ALP) staining were applied to assess the effects of different glucose concentrations on osteogenic differentiation. (2) Six-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into control group and model group (5 in each group). The model group was fed a high-fat diet for 4 weeks followed by streptozotocin (STZ) injection to establish a diabetic mouse model. The osteogenic differentiation capacity of primary osteoblasts from both groups was assessed. (3) Micro-computed tomography (Micro-CT) was employed to analyze femoral bone mineral density (BMD), bone volume/tissue volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N), and trabecular separation (Tb.Sp). Three-point bending test was conducted to evaluate mechanical parameters including maximum load, Young's modulus, fracture energy, and stiffness. RT-qPCR was employed to assess the expression of osteogenic differentiation genes (*Alp*, *Opn*, *Col1a1*, and *Lox*). Masson staining and Mallory staining were used to evaluate Col-1 content in trabecular bone. **Results** (1) EdU and Transwell assay results demonstrated that with the gradual increase in glucose concentration, the proliferation and migration abilities of osteoblasts were significantly decreased ($P<0.001$), and the protein expression levels of Col-1 and lysyl oxidase (LOX) were significantly reduced ($P<0.01$ or $P<0.001$). ARS and ALP staining revealed that calcium salt deposition and ALP activity in osteoblasts were significantly decreased with increasing glucose concentration ($P<0.05$ or $P<0.001$). (2) Compared with control group, mice in model group exhibited typical "three polies and one weight loss" symptoms (polyuria, polydipsia, polyphagia, and weight loss) of diabetes, and ARS and ALP staining showed a significant reduction in osteoblasts ($P<0.001$). (3) Micro-CT and three-point bending test results indicated that, compared with control group, mice in model group showed microarchitectural deterioration of bone, decreased Tb.N, increased Tb.Sp, and significantly reduced maximum load, Young's modulus, fracture energy, and stiffness ($P<0.05$). RT-qPCR results showed that the relative mRNA expression levels of osteogenic differentiation genes (*Alp*, *Opn*, *Col1a1*, and *Lox*) were significantly decreased in model group compared with control group ($P<0.01$ or $P<0.001$). Masson and Mallory staining indicated a significant reduction in collagen content in model group compared with control group ($P<0.01$). **Conclusions** High-glucose environment inhibits osteoblast proliferation, differentiation, and migration. Diabetic mice exhibit reduced bone quality and increased bone fragility, potentially mediated by decreased lysyl oxidase and collagen levels.

[Key words] diabetes mellitus; high-glucose environment; osteoblasts; bone collagen; bone quality

2型糖尿病(T2DM)的发病率和患病率在全球范围内持续增高^[1]。脆性骨折是糖尿病常见且严重的并发症,尤其在老年人群中,跌倒和骨折的多种危险因素同时存在,骨强度下降是其中的重要原因,但其机制尚未完全阐明^[2-3]。有研究报道,骨质量是骨强度的重要影响因素,包含骨骼的材料特性和微结构,骨骼的材料包括以胶原纤维为代表的有机成分和羟基磷灰石为代表的矿物质成分,其中胶原纤维提供拉伸强度、延性和韧度^[4],羟基磷灰石沉积矿化可增加硬度,胶原纤维的结构及排列直接影响骨骼微结构,胶原分子之间的交联方式决定了胶原纤维的结构和排列^[5-8]。研究发现,过高的葡萄糖浓度可抑制成骨细胞的分化及矿化^[9-10],同时伴随胶原蛋白酶促交联的减少,而胶原蛋白酶促交联的形成过程严格受赖氨酸氧化酶(LOX)的调节,且LOX减少或缺失可抑制成骨细胞的矿化^[11-13]。但是,糖尿病骨质量下降是否与成骨细胞LOX表达异常相关尚不清楚。因此,本研究拟进一步探讨葡萄糖浓度对成骨细胞增殖及分化能力的影响,以及对骨胶原蛋白及LOX的作用,旨在明确糖尿病患者骨折风险增加的机制,为预防和治疗糖尿病相关骨折提供新的

思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器 最低必需培养基 α (α -MEM)、胎牛血清、0.25% Trypsin-EDTA酶、PBS缓冲液、青霉素-链霉素混合溶液(美国Gibco公司); Dispase II (德国Merck公司); 链脲佐菌素(STZ)(美国Sigma公司)。结晶紫染色液、EdU细胞增殖染色试剂盒、成骨细胞矿化结节染色试剂盒、5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐/四唑硝基蓝(BCIP/NBT)碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)显色试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司); D-葡萄糖、HE染色试剂盒、Masson三色染色试剂盒、Mallory三色染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、HiScript III All-in-one RT Super Mix Perfect for qPCR、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); I型胶原蛋白抗体(Col-1, 美国Santa Cruz公司); LOX抗体、 β -actin抗体(英国Abcam公司)。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)仪(美国Bio-Rad公司),激光共聚焦显微镜(德国Leica公司)。光学显微镜、激光共聚焦显微

镜(日本 Nikon 公司), 微型计算机断层扫描(Micro-CT)仪器(美国 Siemens 公司), Univert 生物力学测试分析仪(加拿大 Cell Scale 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代成骨细胞的提取及诱导分化 脱颈法处死 C57BL/6 乳鼠(出生 3 d 内), 75% 乙醇消毒, 在无菌环境下使用无菌器械分离小鼠颅骨置于 PBS 缓冲液中, 清理多余血管组织后, 以 0.25% Trypsin-EDTA 酶消化 10 min, 随后转移至 6 孔板中。配置含 0.2% II 型胶原酶的 α -MEM 溶液, 每孔加入 2 ml, 37 °C 消化 30 min, 更换消化液, 并将颅骨充分剪碎, 37 °C 消化 1 h, 收集消化液并用滤网过滤, 以 300 \times g 离心 5 min 后弃上清, 重悬细胞培养。成骨诱导分化培养基为含 5 mmol/L β -甘油磷酸钠及 50 μ g/ml 抗坏血酸的 α -MEM 完全培养基。将成骨细胞分为 4 组: 标准糖浓度 (normal glucose, NG) 组、中度糖浓度 (medium glucose, MG) 组、中-高度糖浓度 (medium-high glucose, MHG) 组、高糖浓度 (high glucose, HG) 组, 分别使用浓度 5.5 mmol/L、11.5 mmol/L、16.5 mmol/L、25.0 mmol/L 的 D-葡萄糖进行干预。诱导 14 d 后, 使用茜素红 (alizarin red S, ARS) 和 ALP 染色并分析。

1.2.2 EdU 实验检测细胞增殖 将 1×10^5 数量的成骨细胞接种于 12 孔板中, 4 组不同糖浓度干预 48 h。每个孔中加入 500 μ l EdU (10 μ mol/L) 试剂, 37 °C 孵育 2 h 以标记细胞。用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 0.3% Triton X-100 作用 15 min 后, 在室温黑暗环境中与反应试剂孵育 30 min。1 \times Hoechst 试剂对细胞核进行复染。使用荧光共聚焦显微镜观察染色结果, 并采用 ImageJ、GraphPad Prism 9 软件分析数据。

1.2.3 Transwell 实验评估细胞迁移能力 使用 24 孔细胞培养小室进行细胞迁移和侵袭检测。通过聚碳酸酯过滤器 (8 μ m 孔) 将 Transwell 装置分为上部和下部隔室。将 4 组不同糖浓度干预的原代成骨细胞悬浮在上部腔室的 200 μ l 无血清培养基中。下腔室含 10% FBS 的 750 μ l 完全培养基。在 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后, 用棉签擦拭去除小室上部表面的细胞。然后将小室浸泡在 4% 多聚甲醛中, 用 0.1% 结晶紫染色。在显微镜下对迁移到下滤光片表面的所有细胞进行计数。

1.2.4 免疫荧光染色评估 COL-1、LOX 蛋白表达水平 将 4 组不同糖浓度干预的成骨细胞接种在玻璃培养皿中培养 72 h, 用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.3% Triton 处理 5 min, 免疫荧光封闭液封闭 30 min, 最后用 COL-1 抗体 (sc-59772; 鼠单克隆抗体, 稀释度 1:200) 和 LOX 抗体 (ab31238; 兔多克隆抗体, 稀释

度 1:200) 在 4 °C 孵育过夜。次日, 用 PBS 洗 3 次, 加入抗小鼠 IgG (CST; Alexa Fluor 555, 稀释度 1:400) 和抗兔 IgG (CST; Alexa Fluor 647, 稀释度 1:400), 室温避光孵育 60 min。然后用 DAPI 溶液对细胞核进行染色, 荧光显微镜下观察。

1.2.5 Western blotting 检测 COL-1、LOX 蛋白表达水平 4 组不同糖浓度的成骨细胞干预 72 h 后, 每孔加入 100 μ l RIPA 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂混合液, 充分裂解细胞。使用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 95 °C 持续加热 10 min 用于 Western blotting 检测。取 30 μ g 蛋白加入预制胶孔内, 80 V 电泳 30 min, 120 V 电泳 1 h。甲醇激活 PVDF 膜, 按照 400 mA、30 min 的条件下转膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST 洗 5 min \times 3 次, 然后加入抗体 (LOX、COL-1、 β -actin), 于 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 洗 5 min \times 3 次, 然后分别用 1:5000 稀释度的山羊抗小鼠 IgG-HRP 或山羊抗兔 IgG-HRP 室温孵育 1 h。继续用 TBST 洗 5 min \times 3 次, 滴加化学发光液, 显色上机拍照。

1.2.6 糖尿病小鼠模型的构建 6 周雄性 C57BL/6 小鼠 10 只, 体重 15~16 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 (110324241104079917)。对小鼠进行 12 h 的光照/黑暗循环, 随意进食、进水。本研究获郑州大学第一附属医院动物伦理委员会审批 (2021-KY-0713-003)。STZ 溶于柠檬酸缓冲液中, 0.22 μ m 滤器具除菌, 现用现配, 并置于冰盒中避光保存。为观察高糖环境对糖尿病小鼠骨质量的影响, 将 10 只小鼠随机分为对照组 ($n=5$) 与模型组 ($n=5$), 模型组高脂饲料喂养 4 周, 腹腔内注射 100 mg/kg STZ 以构建糖尿病小鼠模型。对照组小鼠注射相同体积的柠檬酸缓冲液。3 d 后经鼠尾采血测定小鼠的血糖水平, 随机血糖 >16.7 mmol/L 定义为造模成功。规律喂养小鼠, 每周检测小鼠血糖及体重, 10 周后脱颈处死, 取股骨行 Micro-CT、三点弯曲实验及胶原蛋白病理染色 (Masson/Mallory 染色)。

1.2.7 Micro-CT 及生物力学测试骨微结构及骨质量变化 造模 10 周后, 解剖小鼠的股骨, 并去除软组织, 采用西门子 Inveon 多模态系统进行扫描。样品在电压 80 kV、电流 450 μ A、每圈曝光时间 40 min 的条件下进行扫描。应用 Inveon Research Workplace (西门子) 进行体积分析。对于股骨远端, 选择分析的区域为生长板下 0.5 mm 处股骨长度的 5%, 以确定骨小梁参数。将小鼠股骨置于 Univert 生物力学测试分析仪的跨距为 10 mm 的两个支撑点上, 标本的宽面朝上水平放置。操纵工作站使探头缓缓下降, 探头的加载速度为 2 mm/min, 标本断裂后继续运行 2 mm 停止, 测定股骨的最大载荷 (N)、杨氏模量 (MPa)、

刚度(N/mm)及断裂能(J/m²),以量化全骨结构力学性能参数。

1.2.8 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 检测 *Lox*、*Coll1a1*、*Alp*、*Opn* 基因的表达 取 50 mg 新鲜骨组织加入 1 ml 总 RNA 提取试剂,低温匀浆,使用氯仿、异丙醇及无水乙醇提取 RNA 并测定浓度,根据反转录试剂盒说明书的步骤进行反转录。根据 RT-qPCR 试剂盒说明书进行检测,反应体系的配制如下: 0.2 μl cDNA、0.8 μl 正反向引物、9 μl 无菌无酶水和 10 μl SYBR qPCR Master Mix 试剂,总体积为 20 μl。在 CFX96™ Real-Time 系统上运行,反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 延伸 15 s, 共 40 个循环。数据采用 2^{-ΔΔCt} 法计算,并分析目的基因 mRNA 的表达水平。实验中所用引物序列见表 1。

1.2.9 骨组织 HE、Masson 及 Mallory 胶原染色 取小鼠胰腺组织固定后行石蜡切片进行 HE 染色。去除股骨表面软组织后,用 10% EDTA 脱钙 1 个月,进行石蜡包埋后切片、HE 染色后评价骨小梁形态,Masson 及 Mallory 染色后使用光学显微镜扫描镜拍摄图像,采用 ImageJ 软件对骨胶原蛋白进行定量分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行绘图及统计分析。本研究所有数据均为计量资料,符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey 法检验;不符合正态分布或方差不齐者以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,进一步两两

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences of RT-qPCR

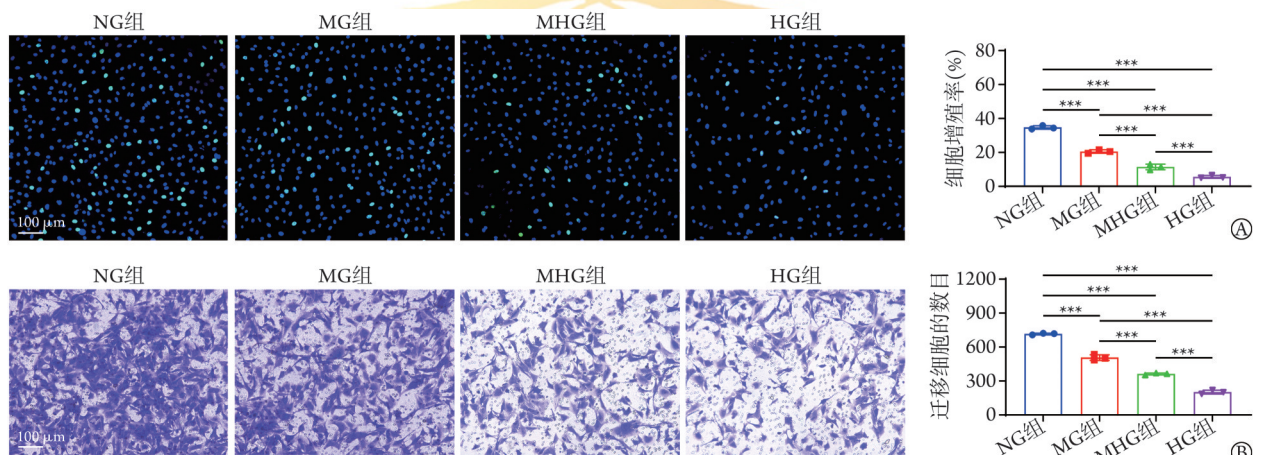
基因名称	引物序列(5'-3')
<i>Lox</i>	正义: TCTTCTGCTGCGTGACAACC
	反义: GAGAAACCAGCTTGAACCAG
<i>Coll1a1</i>	正义: GCTCCTCTTAGGGGCCACT
	反义: CCACGTCTCACCATTGGGG
<i>Alp</i>	正义: CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA
	反义: GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
<i>Opn</i>	正义: GCTTGGCTTATGGACTGA
	反义: TAGACTCACCGCTCTTCA
<i>GAPDH</i>	正义: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	反义: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

Lox. 赖氨酸氧化酶; *Coll1a1*. I 型胶原 α1 链; *Alp*. 碱性磷酸酶; *Opn*. 骨桥蛋白; *GAPDH*. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同糖浓度对小鼠成骨细胞增殖及迁移能力的影响 成骨细胞在不同糖浓度环境下培养 48 h。与标准糖组比较,随着糖浓度的增加,EdU 阳性细胞率明显降低,差异均有统计学意义(P<0.001,图 1A)。Transwell 实验检测结果显示,随着糖浓度的增加,不同糖浓度组的迁移细胞的数量明显减少,差异有统计学意义(P<0.001,图 1B)。



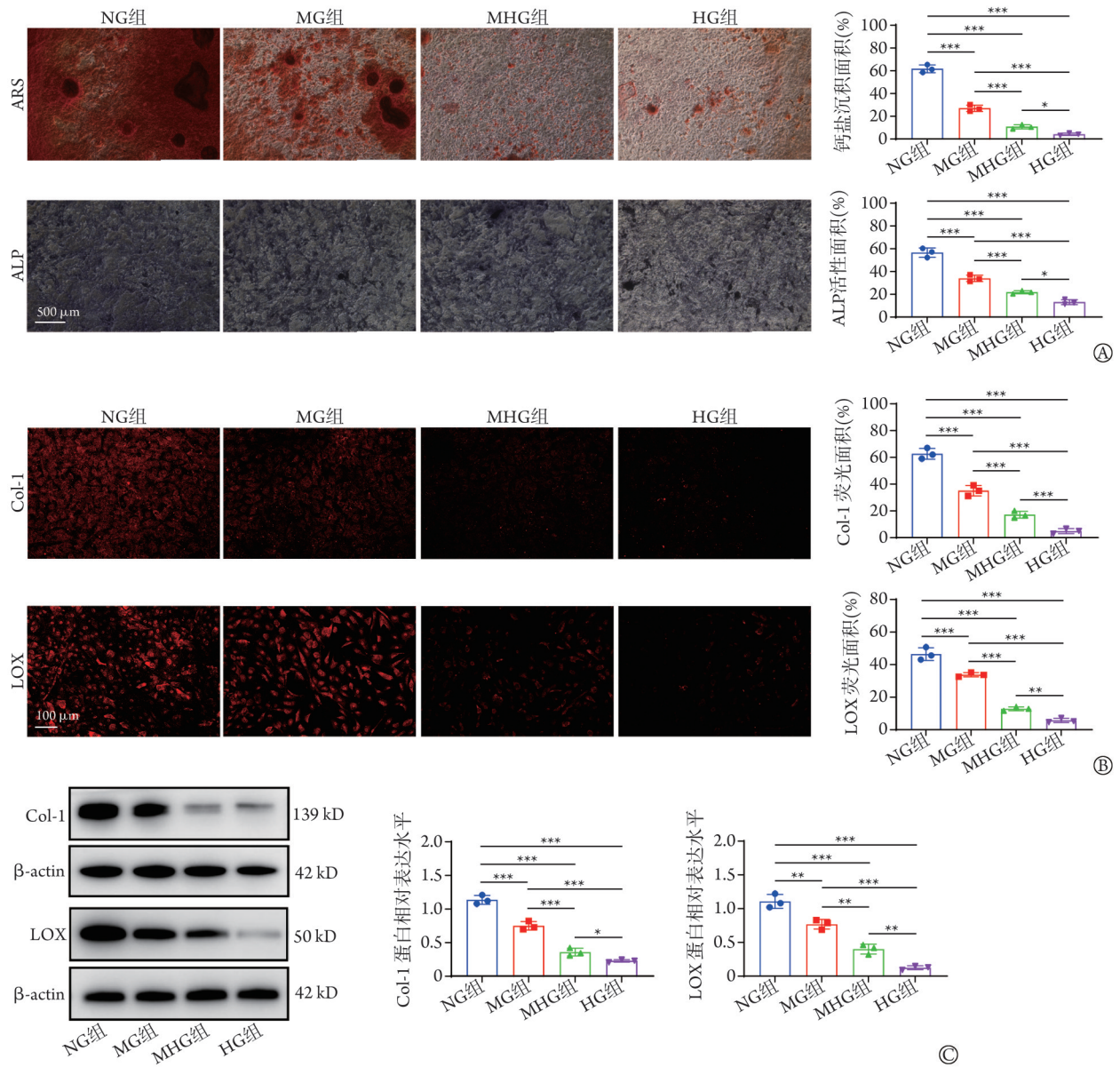
NG. 标准糖; MG. 中糖; MHG. 中高糖; HG. 高糖; A. 各组细胞增殖情况(免疫荧光染色); B. 各组细胞迁移情况(结晶紫染色); *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

图 1 不同糖浓度对小鼠成骨细胞增殖及迁移的影响(n=3)

Fig.1 Effects of different glucose concentrations on the proliferation and migration of mouse osteoblasts (n=3)

2.2 不同糖浓度对小鼠成骨细胞成骨分化及功能的影响 在不同糖浓度环境下诱导培养 14 d 后,与 NG 组比较,随着糖浓度的增加,原代成骨细胞 ARS、ALP 染色的着色程度均减弱,钙盐沉积量降低,差

异有统计学意义(P<0.05 或 P<0.001,图 2A)。免疫荧光染色和 Western blotting 检测结果显示,随着糖浓度的增加, COL-1 及 LOX 蛋白表达水平逐渐降低(P<0.05、P<0.01 或 P<0.001,图 2B、C)。



NG. 标准糖; MG. 中糖; MHG. 中高糖; HG. 高糖; ARS. 茜素红S; ALP. 碱性磷酸酶; Col-1. I型胶原蛋白; LOX. 赖氨酸氧化酶; A. 各组ARS及ALP染色情况; B. 各组Col-1及LOX蛋白表达情况(免疫荧光染色); C. Western blotting检测Col-1及LOX蛋白表达情况; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 不同糖浓度对小鼠成骨细胞成骨分化及骨胶原蛋白的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different glucose concentrations on osteogenic differentiation and collagen of mouse osteoblasts ($n=3$)

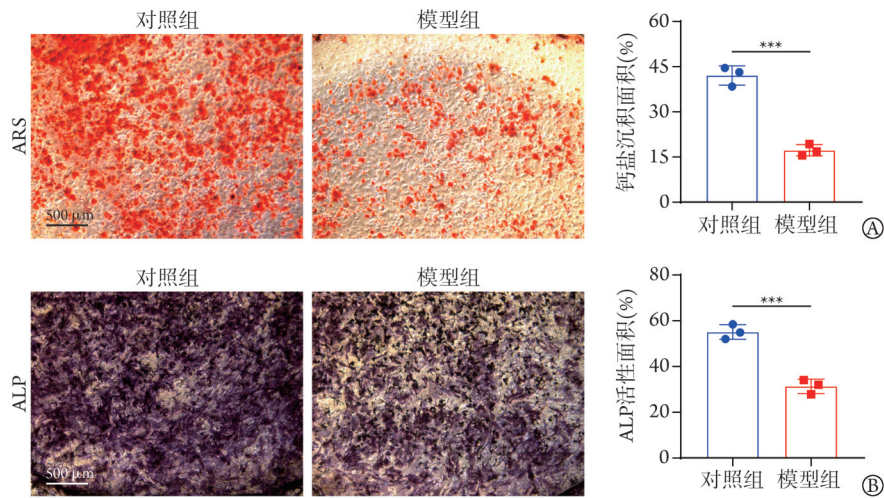
2.3 糖尿病小鼠对成骨细胞分化能力影响

2.3.1 糖尿病小鼠模型的构建与表征 与对照组比较,模型组小鼠STZ注射后体重下降。胰腺HE染色显示模型组胰岛形态不规则及数目减少。在STZ注射3 d后,检测随机血糖 >16.7 mmol/L,随后监测10周随机血糖 >16.7 mmol/L。与对照组相比,模型组小鼠出现糖尿病典型的“三多一少”症状,表现为多饮、多食、多尿、体重下降(附图S1)(<https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.1910.2025.0509FJ>)。

2.3.2 糖尿病对小鼠成骨分化的影响 分离模型组小鼠颅骨,提取骨组织细胞并进行成骨诱导分化。

ARS、ALP染色检测结果显示,与对照组比较,模型组的钙盐沉积面积及ALP活性面积减小($P < 0.001$,图3A、B)。

2.4 糖尿病对小鼠骨质量的影响 Micro-CT图像(图4A)显示,与对照组相比,模型组小鼠骨量和骨组织微结构发生改变,骨密度及骨体积分数不变或轻度增加,但骨小梁数量降低,骨小梁分离度增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4B)。为验证模型组体内高糖环境对骨生物力学影响,对离体股骨进行三点弯曲实验(图4C)。与对照组相比,模型组小鼠的最大载荷、杨氏模量、断裂能、刚度明显降低,



ARS. 茜素红 S; ALP. 碱性磷酸酶; A. ARS 染色结果; B. ALP 染色结果; *** $P < 0.001$

图3 糖尿病对小鼠成骨分化的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of diabetes on mouse osteogenic differentiation ($n=3$)

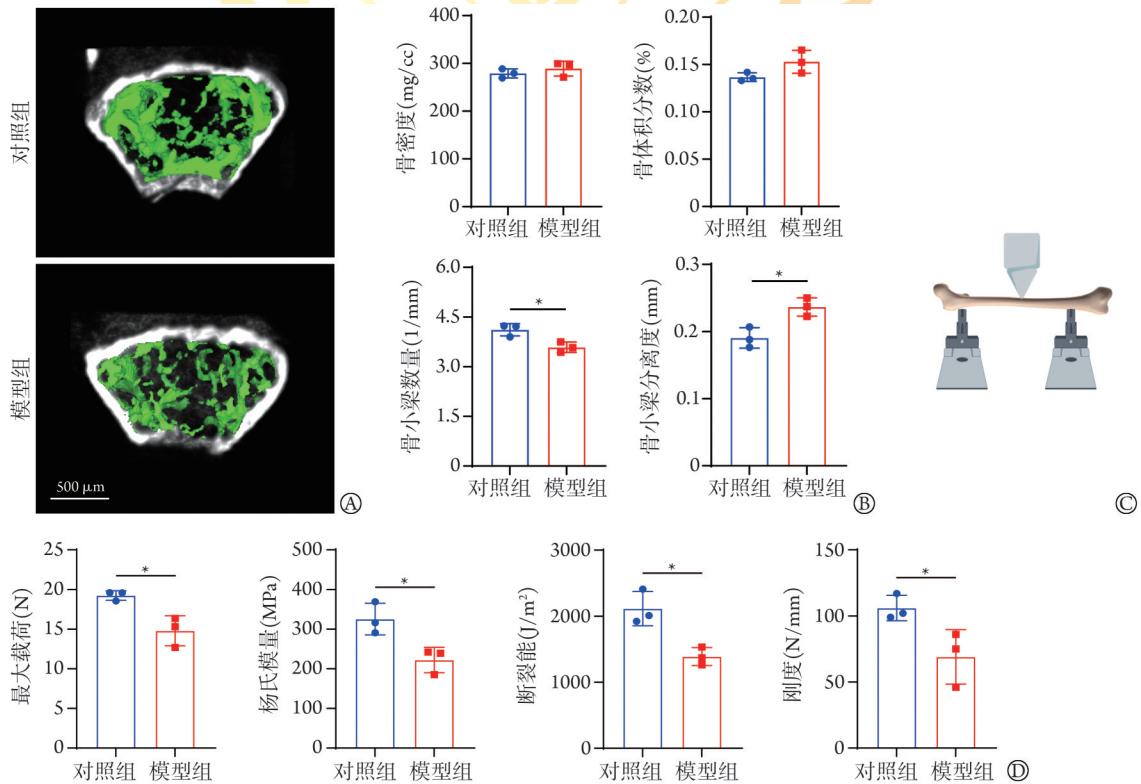
差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图 4D)。

2.5 糖尿病对小鼠体内成骨细胞相关基因表达及骨胶原蛋白含量的影响 RT-qPCR 检测结果显示, 模型组 *Lox*、*Coll1a1*、*Alp*、*Opn* 的 mRNA 相对表达量均明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图 5A)。HE 染色结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠的骨小梁出现明显断裂, 破坏严重、数量减少, 髓腔空

隙间隔增大(图 5B)。Masson 及 Mallory 染色结果显示, 模型组小鼠骨小梁的骨胶原蛋白含量均明显低于对照组($P < 0.01$, 图 5C、D)。

3 讨论

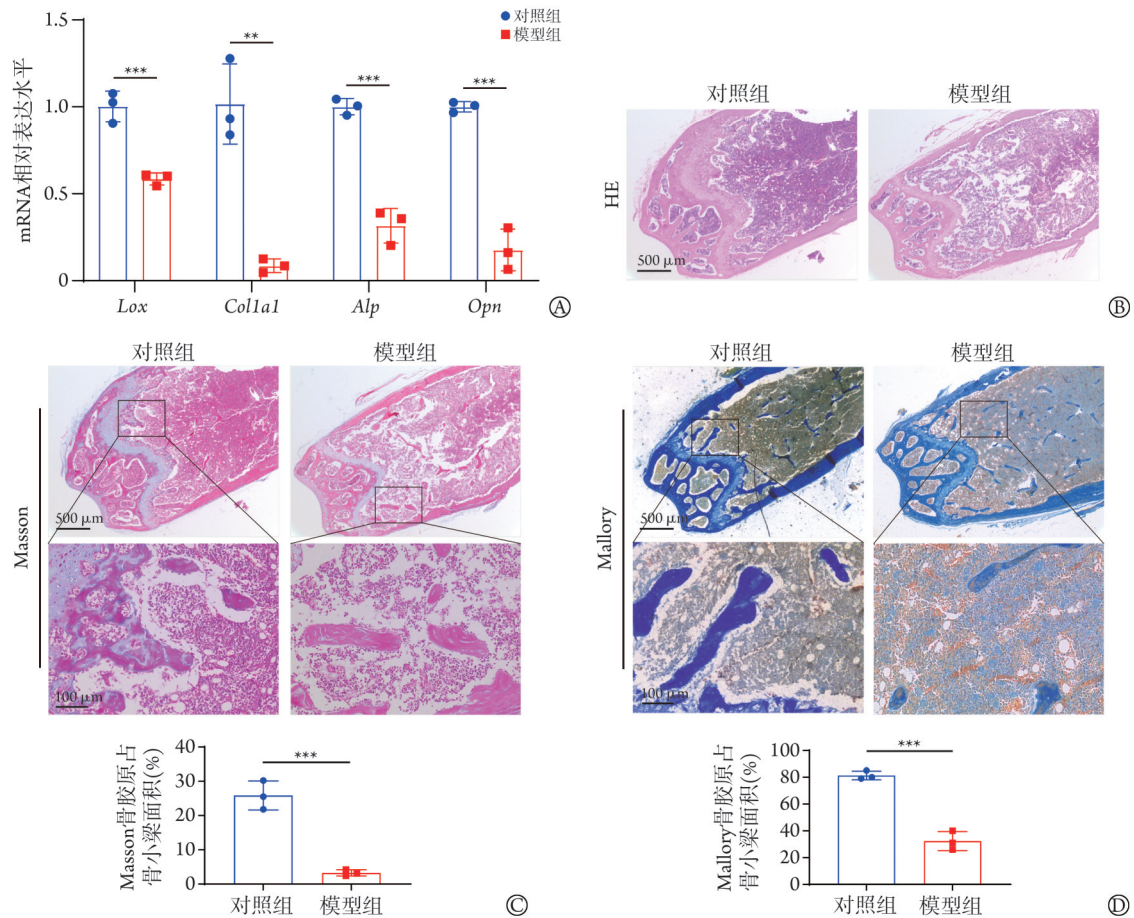
糖尿病骨悖论是指在 BMD 正常或增高的情况下, 糖尿病患者发生骨折和骨质疏松的风险仍然增



A. 两组股骨远端的 Micro-CT 三维图像; B. 两组骨参数的定量分析($n=3$); C. 三点弯曲实验模式图; D. 两组股骨生物力学指标的定量分析; * $P < 0.05$

图4 糖尿病对小鼠骨质量的影响($n=3$)

Fig.4 Effect of diabetes mellitus on mouse bone quality ($n=3$)



Lox. 赖氨酸氧化酶; *Col1a1*. I 型胶原 $\alpha 1$ 链; *Alp*. 碱性磷酸酶; *Opn*. 骨桥蛋白; A. 两组股骨组织的 RT-qPCR 检测; B-D. 两组股骨组织的 HE 染色、Masson 染色、Mallory 染色结果(胶原蛋白染色为蓝色); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 5 糖尿病对小鼠体内成骨细胞相关基因表达及骨胶原蛋白含量的影响($n=3$)

Fig.5 Effect of diabetes mellitus on osteoblast-related gene expression and bone collagen content *in vivo* ($n=3$)

加^[14]。因此, 糖尿病患者的骨折风险评估变得更加复杂, 长期以来一直是临床关注的焦点^[15-16]。Sieverts 等^[17]发现, 在探讨糖尿病骨折时应多关注胶原蛋白的损伤。矿化胶原蛋白是骨骼的重要组成部分, 成骨细胞分泌胶原蛋白基质后, 无机碳酸盐在胶原内外沉积并促进矿化^[18]。然而, 胶原如何指导羟基磷灰石的形成仍然存在争议^[19], 其交联方式被认为是骨质量的关键因素, 但相关研究尚无定论。

Col-1 是骨组织细胞外基质中最丰富的纤维蛋白, 由两条 $\alpha 1$ 链和一条 $\alpha 2$ 链组成, 并在骨组织形成过程中发生矿化, I 型胶原 $\alpha 2$ 链(COL1A2)与 COL1A1 在骨骼、皮肤和肌腱等组织中共同发挥作用。尽管 COL1A2 的表达较为普遍, 但其数量通常少于 COL1A1, 对胶原蛋白的总体结构仅发挥间接影响^[20-22]。胶原蛋白的含量、结构完整性及其排列方式对骨矿化至关重要^[23-25]。本研究结果表明, 随着葡萄糖浓度的升高, 成骨细胞 Col-1 的表达明显降低, LOX 水平也相应下降; 同时, 糖尿病小鼠表现出骨微结构破坏和骨质量下降, 伴随骨组织中成骨

分化相关基因及 *Lox* 表达的减少, 提示糖尿病诱发的脆性骨折可能与胶原的酶促交联受损密切相关。

本研究通过构建不同浓度的葡萄糖环境, 证实随着葡萄糖浓度的增加, 成骨细胞的功能下降, 以及 Col-1 的合成减少。成骨细胞对葡萄糖的摄取是其分化和骨形成的核心调控因素之一。在这一过程中, Col-1 的合成作为成骨细胞分化的早期事件[早于 Runt 转录因子 2(RUNX2)的表达], 可能通过提供矿化基质框架直接参与骨质量的初始形成。尽管 RUNX2 被广泛认为是成骨细胞分化的核心调控枢纽^[26], 但本研究聚焦于骨矿化终末阶段的关键分子 *Alp* 和 *Opn* 基因的表达, 不同于传统 RUNX2 的研究范式, 聚焦终末效应环节更能揭示代谢性骨病的本质病理环节, 即在高糖环境下, Col-1 减少可能会干扰成骨细胞分化及骨形成。目前, 糖尿病骨骼功能障碍的确切机制尚不清楚, 主要原因在于缺乏合适的动物模型, 而已有研究通过高脂饮食诱导胰岛素抵抗联合一次性药物(STZ)干预构建了符合成人糖尿病标志性特征的模型^[27], 因此, 本研究也采用了该

模型。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠骨质量发生改变(包括骨微结构受损、生物力学强度降低),这些改变与在人体观察到的情况相似。模型组小鼠股骨中,成骨分化相关基因 *Alp*、*Opn*、*Colla1* 的 mRNA 相对表达量均降低,其中 *Colla1* 为新生骨组织提供了必要的结构框架和机械强度^[28-29]。此外,本研究对股骨的 Masson 和 Mallory 染色显示,模型组小鼠的胶原蛋白含量下降,体现了胶原蛋白对骨质量的影响。同样,ALP 和骨桥蛋白(OPN)在骨基质的构建和骨矿化过程的精确调控中扮演着至关重要的角色,二者共同促进骨骼的成熟和强度的增强^[30]。传统观点认为糖尿病患者骨质量下降是由于晚期糖基化终末产物(AGE)相关的非酶促交联增加所致。然而,近期研究表明,LOX 介导的酶促交联减少对糖尿病骨质量下降也发挥着重要作用。在生理条件下,LOX 介导的酶促交联普遍存在^[31-32]。这种交联形成的胶原纤维在诱导矿化时具有适当的弹性,从而使骨骼具有柔韧性和强度。胶原的酶促交联可在类骨质矿化之前形成骨胶原平台以供羟基磷灰石沉积矿化^[12-13]。然而,其具体机制尚不明确^[11]。

综上所述,小鼠成骨细胞的功能与葡萄糖浓度密切相关。本研究的体外及体内实验均表明,糖尿病导致的骨脆性增加与胶原蛋白的酶促交联紧密相关,为理解糖尿病中成骨细胞分化和胶原交联方式的重要影响因素提供了新的依据和思路。然而,本研究仍存在局限性:研究仅在细胞及动物层面观察到高糖环境中胶原蛋白含量降低与 LOX 密切相关的现象,但高糖环境如何调控 LOX 催化的酶促交联的具体机制仍需进一步探索。未来研究亟须结合临床,系统收集糖尿病脆性骨折患者的骨组织及相关样本,可应用单细胞转录组测序技术,深入解析糖尿病脆性骨折的关键细胞类型、信号通路及分子机制,为阐明糖尿病脆性骨折的病理机制提供新的科学依据,并为后续靶向干预策略的开发奠定理论基础。

【参考文献】

- [1] Zimmet PZ. Diabetes and its drivers: the largest epidemic in human history? [J]. *Clin Diabetes Endocrinol*, 2017, 3: 1.
- [2] Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(4): 208-219.
- [3] Weber DR, Haynes K, Leonard MB, et al. Type 1 diabetes is associated with an increased risk of fracture across the life span: a population-based cohort study using The Health Improvement Network (THIN) [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(10): 1913-1920.
- [4] 王亚红,侯智权,张紫洋,等.基于腺苷酸活化蛋白激酶/沉默信息调节因子2同源蛋白1/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 α 通路探究力竭运动对大鼠骨骼肌损伤影响[J]. *临床军医杂志*, 2024, 52(12): 1245-1248, 1253.
- [5] Wang J, Wu Y, Li G, et al. Engineering large-scale self-mineralizing bone organoids with bone matrix-inspired hydroxyapatite hybrid bioinks [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(30): 2309875.
- [6] Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone mechanical properties in healthy and diseased states [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2018, 20: 119-143.
- [7] Seeman E, Delmas PD. Bone quality: the material and structural basis of bone strength and fragility [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(21): 2250-2261.
- [8] Chen Y, Yang S, Lovisa S, et al. Type-I collagen produced by distinct fibroblast lineages reveals specific function during embryogenesis and Osteogenesis Imperfecta [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 7199.
- [9] Wei JW, Shimazu J, Makinistoglu MP, et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2015, 161(7): 1576-1591.
- [10] Takeno A, Kanazawa I, Tanaka KI, et al. High glucose promotes mineralization via bone morphogenetic protein 4-Smad signals in early stage of osteoblast differentiation [J]. *Diabetol Int*, 2020, 12(2): 171-180.
- [11] Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus [J]. *Osteoporos Int*, 2010, 21(2): 195-214.
- [12] Pischon N, Mäki JM, Weisshaupt P, et al. Lysyl oxidase (lox) gene deficiency affects osteoblastic phenotype [J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 85(2): 119-126.
- [13] Sharma-Bhandari A, Park SH, Kim JY, et al. Lysyl oxidase modulates the osteoblast differentiation of primary mouse calvaria cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(6): 1664-1670.
- [14] Hofbauer LC, Busse B, Eastell R, et al. Bone fragility in diabetes: novel concepts and clinical implications [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2022, 10(3): 207-220.
- [15] Guan Z, Li H, Liu R, et al. Artificial intelligence in diabetes management: advancements, opportunities, and challenges [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(10): 101213.
- [16] Wang S, Li M, Lin H, et al. Amino acids, microbiota-related metabolites, and the risk of incident diabetes among normoglycemic Chinese adults: Findings from the 4C study [J]. *Cell Rep Med*, 2022, 3(9): 100727.
- [17] Sieverts M, Obata Y, Rosenberg JL, et al. Unraveling the effect of collagen damage on bone fracture using *in situ* synchrotron microtomography with deep learning [J]. *Commun Mater*, 2022, 3: 78.
- [18] Oosterlaken BM, Vena MP, de With G. *In vitro* mineralization of collagen [J]. *Adv Mater*, 2021, 33(16): e2004418.
- [19] Khosla S, Samakkarnthai P, Monroe DG, et al. Update on the pathogenesis and treatment of skeletal fragility in type 2 diabetes mellitus [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(11): 685-697.
- [20] Milazzo M, Jung GS, Danti S, et al. Mechanics of mineralized collagen fibrils upon transient loads [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(7): 8307-8316.
- [21] Bou-Gharios G, Abraham D, de Crombrughe B. Type I collagen structure, synthesis, and regulation [M]//Principles of Bone Biology. Amsterdam: Elsevier, 2020: 295-337.
- [22] Sorushanova A, Delgado LM, Wu ZN, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial

- development[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(1): e1801651.
- [23] Jalan AA, Sammon D, Hartgerink JD, *et al*. Chain alignment of collagen I deciphered using computationally designed heterotrimers[J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(4): 423-429.
- [24] Ito S, Nagata K. Quality control of procollagen in cells[J]. *Annu Rev Biochem*, 2021, 90: 631-658.
- [25] Xu Y, Nudelman F, Deniz Eren E, *et al*. Intermolecular channels direct crystal orientation in mineralized collagen[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5068.
- [26] Zhang S, Jiang W, Ma L, *et al*. Nrf2 transfection enhances the efficacy of human amniotic mesenchymal stem cells to repair lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1627-1636.
- [27] Eckhardt BA, Rowsey JL, Thicke BS, *et al*. Accelerated osteocyte senescence and skeletal fragility in mice with type 2 diabetes[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(9): e135236.
- [28] Vimalraj S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization[J]. *Gene*, 2020, 754: 144855.
- [29] 张璇, 王辰, 杨琳, 等. 炎症微环境下过表达Wnt5a对人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2023, 44(9): 993-1000, 1009.
- [30] 陈瑞婧, 冯韬锦, 程实, 等. 3D培养人脐带间充质干细胞来源的外泌体对成骨细胞分化的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(4): 411-419.
- [31] Gao Q, Jiang Y, Zhou D, *et al*. Advanced glycation end products mediate biomineralization disorder in diabetic bone disease[J]. *Cell Rep Med*, 2024, 5(9): 101694.
- [32] Hunt HB, Torres AM, Palomino PM, *et al*. Altered tissue composition, microarchitecture, and mechanical performance in cancellous bone from men with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(7): 1191-1206.

(责任编辑: 张小利)

