



# 运动上调 GPR48 – RANKL 通路影响 2 型糖尿病小鼠破骨细胞分化

## Effects of Exercise on Osteoclast Differentiation through the Up – regulation GPR48 – RANKL Pathway in Type 2 Diabetic Mice

注意：本论文模板适用于在文章确定录用后，通过 E-mail 返回的最终修改稿，在排版时使用。

陈祥和<sup>1</sup>，孙朋<sup>2</sup>，杨念恩<sup>3</sup>，李世昌<sup>2</sup>，徐会金<sup>2</sup>，张娜娜<sup>4</sup>

CHEN Xianghe<sup>1</sup>，SUN Peng<sup>2</sup>，YANG Nianen<sup>3</sup>，XU Huijin<sup>2</sup>，ZHANG Nana<sup>2</sup>

**摘要：**目的：探究 T2DM 小鼠 OC 分化变化及不同力学刺激通过 GPR48 – RANKL 通路对 T2DM 小鼠 OC 分化的分子调控作用。方法：40 只 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠，适应性喂养 1 周后随机分为 T2DM 造模组(30 只)和正常对照组(ZC, 10 只)。T2DM 造模组小鼠 6 周高脂膳食结束空腹 12h 后注射 STZ, 2 周后检测小鼠血糖，有 27 只造模成功并将其随机分为 T2DM 对照组(TC, 9 只)、T2DM 游泳组(TS, 9 只)和 T2DM 游泳组(TD, 9 只)，TS 和 TD 组小鼠分别进行 8 周游泳和下坡跑训练。结束后，取右侧股骨并利用 RT – PCR 法检测相关因子 mRNA 表达；取左侧胫骨并利用 West – blotting 法检测相关因子蛋白表达；取小鼠 BMM 并诱导其向 OC 分化，利用 TRAP 染液对 OC 染色；取右侧胫骨并利用游标卡尺检测其大小。结果：与 ZC 组相比，TC 组 GPR48、OPG、RANKL、RANK、NFATc2、CTSK 的 mRNA 和 GPR48、RANKL、RANK 蛋白表达均显著变化( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，OC 数量显著增多，远端冠状面宽度和近端冠状面宽度显著变小( $P < 0.05$ )。与 TC 组相比，TS 组 GPR48、OPG、RANKL、NFATc2、CTSKmRNA 和 GPR48、RANKL 蛋白表达均显著变化( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，OC 数量显著减少；TD 组 GPR48、OPG、RANKL、RANK、NFATc2、CTSKmRNA 和 GPR48、RANKL、RANK 蛋白表达均显著上调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，OC 数量显著减少，胫骨长度和中间矢状轴宽度显著减少( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 TS 组相比，TD 组 OPG 和 CTSKmRNA 及 GPR48、RANK、RANKL 蛋白表达均显著变化( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，OC 数量显著减少。结论：T2DM 小鼠 OC 分化显著增强；直接作用力激活 T2DM 小鼠骨中 GPR48 – RANKL 通路，进而抑制 RANK 及其下游靶基因表达，抑制 OC 分化，且其作用效果优于间接作用力。  
**关键词：**G 蛋白偶联受体 48；核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体；不同力学刺激；II 型糖尿病；破骨细胞

摘要：宋体五号，行距固定值18磅

正文：宋体五号，行距固定值18磅。正文控制字数在5000~8000字之间。

如基金资助项目或科研项目需注明项目编号及项目名称。

中图分类号：G804.2 文献标志码：A 文章编号：1001 – 9154(2017)03 – 0090 – 06

**基金项目：**江苏省教育科学“十三五”规划课题“跳跃运动对小学生体质与骨健康的影响及其相关性分析研究”(T – b/2016/08)；中国博士后科学基金第 8 批特别资助课题“运动强度调控肥胖青少年生理血压的自主神经机制的研究”(2015T80412)。

**第一作者简介：**陈祥和，博士，讲师，研究方向：运动与骨代谢的机制研究，E – mail：huashixh@163.com。

**作者单位：**1. 扬州大学体育学院，江苏扬州 225127；2. 华东师范大学体育与健康学院，上海 200241；3. 安庆师范大学体育学院，安徽安庆 246000；4. 海口经济学院 拳星时代体育学院，海南海口 571127

1. College of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou Zhejiang 225127; 2. College of Physical Education and Health, East China Normal University, Shanghai 200241; 3. College of Physical Education, Anqing Normal University, Anqing Anhui 246000; 4. QUANXING College of Physical, Haikou College of Economics, Haikou Hainan 571127

收稿日期：2017 – 01 – 19 修回日期：2017 – 03 – 31

II 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 作为一内分泌代谢疾病，其破骨细胞 (Osteoclast, OC) 分化异常升高，骨吸收增强，导致骨质疏松并发症发生<sup>[1]</sup>。而 G 蛋白偶联受体 48 (G protein coupled – receptor 48, GPR48) 作为膜上一个 7 次跨膜受体，其在骨代谢中扮演关键角色<sup>[2]</sup>。研究证实，GPR48 可负向调控 RANKL，进而通过 OPG – RANKL – RANK 分子轴上调其靶基因 NFATc2、CTSK 等表达，促进小鼠骨髓巨噬细胞 (Bone marrow – derived macrophage, BMM) 向 OC 分化<sup>[3]</sup>。运动作为调控骨吸收的重要手段，其通过 OPG – RANKL – RANK 分子轴失活进而抑制 OC 分化<sup>[4]</sup>。并且研究发现，因运动方式不同对骨产生的力学刺激方式

(分为直接和间接力学刺激)存在较大差异,且直接力学刺激抑制骨吸收的作用效果优于间接力学刺激<sup>[5]</sup>。然而,目前有关运动影响 T2DM 小鼠 OC 分化及其分子调控机制的相关研究尚鲜有报道。基于以上,本研究进行 T2DM 小鼠造模,并利用游泳和下坡跑分别模拟间接和直接力学刺激对其进行干预。通过检测相关因子的 mRNA 和蛋白表达、OC 分化等指标,探究不同力学刺激对 T2DM 小鼠 OC 分化的影响及其分子调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 40 只[生产证号: SYXX(沪)2015-0011],适应性喂养 1 周后随机选取 30 只进行 T2DM 造模(前 6 周高脂膳食,结束空腹 12h 后按 80mg/Kg 体重标准一次性注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ),2 周后检测血糖,血糖  $\geq 8\text{mmol/L}$  为 T2DM 小鼠<sup>[6]</sup>,27 只造模成功),剩余 10

只作为正常对照组(ZC)。将 T2DM 小鼠随机分为 T2DM 对照组(TC,  $n=9$ )、T2DM 游泳组(TS,  $n=9$ )和 T2DM 下坡跑组(TD,  $n=9$ )。T2DM 小鼠继续进行高脂膳食,ZC 小鼠喂以普通饲料,自由饮水,每天光照时间 12h。(动物伦理编号:M20150311)。

### 1.2 运动方案

利用游泳和下坡跑分别对 TS 组和 TD 组小鼠进行运动干预。具体方案如下:游泳:水温( $32 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、50min/次、1 次/天、6 天/周、共 8 周;下坡跑:50min/次、坡度  $-9^{\circ}$ 、1 次/天、6 天/周、共 8 周。

### 1.3 指标检测

1.3.1 骨中相关因子 mRNA 表达检测 最后 1 次训练结束 24h 后,断颈椎处死小鼠。取小鼠右侧股骨,Omni 匀浆机研磨后,按标准步骤提取 RNA 并将其反转录为 cDNA,再按定量试剂盒步骤对相关靶基因 mRNA 表达进行检测。利用 Primer premier 软件设计相关引物序列(表 1)并由上海生工生物工程有限公司进行合成

表 1 引物序列一览表

Table 1 Primer sequence list

Primer 名称	序列(5' 到 3')	Primer 名称	序列(5' 到 3')
GPR48 - Forward	5' - CTGGGTCTCTGGCAGTCTTC - 3'	RANK - Reverse	5' - CCCGTCACCTGGCATGAGTA - 3'
GPR48 - Reverse	5' - TATTGCCCTCCGTGAAAAAG - 3'	NFATc2 - Forward	5' - CAACGCCCTGACCACCGATAG - 3'
OPG - Forward	5' - TACAGACTAGAGGAGCTCTACAGG - 3'	NFATc2 - Reverse	5' - GGCTGCCTTCCGCTCATAGT - 3'
OPG - Reverse	5' - TAAAAGTGGTTATTCAGTCAGTAGC - 3'	CTSK - Forward	5' - CAGCTTCCCAAGATGTGAT - 3'
RANKL - Forward	5' - GATGCCCCAGCAGGCTTT - 3'	CTSK - Reverse	5' - AAGCACCAACGAGAGGAGAA - 3'
RANKL - Reverse	5' - GAAACTGTTGTGGAGGGGCT - 3'	$\beta$ - actin - Forward	5' - ACCCAGAAGACTGTGGATGG - 3'
RANK - Forward	5' - GTGAGGTTCCCTTCCCGCC - 3'	$\beta$ - actin - Reverse	5' - TTCAGCTCAGGGATGACCTT - 3'

图题和表头: 必须附有英文翻译。

表 2 运动对 T2DM 小鼠骨中相关因子 mRNA 表达影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effects of exercise on mRNA expression of bone related factors in T2DM mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

检测指标	ZC 组	TC 组	TS 组	TD 组
GPR48	3.49 $\pm$ 0.49	1.04 $\pm$ 0.17 <sup>**</sup>	1.84 $\pm$ 0.29 <sup>**</sup>	1.84 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>
OPG	6.65 $\pm$ 0.55	2.72 $\pm$ 0.27 <sup>**</sup>	3.78 $\pm$ 0.63 <sup>**</sup>	4.67 $\pm$ 0.65 <sup>**●●</sup>
RANKL	4.87 $\pm$ 1.49	3.13 $\pm$ 0.46 <sup>*</sup>	3.79 $\pm$ 0.39 <sup>*</sup>	4.63 $\pm$ 1.08 <sup>**</sup>
RANK	0.98 $\pm$ 0.21	1.68 $\pm$ 0.25 <sup>**</sup>	1.37 $\pm$ 0.40	1.24 $\pm$ 0.22 <sup>**</sup>
NFATc2	0.89 $\pm$ 0.11	2.01 $\pm$ 0.37 <sup>**</sup>	1.55 $\pm$ 0.28 <sup>*</sup>	1.37 $\pm$ 0.29 <sup>*</sup>
CTSK	0.72 $\pm$ 0.09	1.42 $\pm$ 0.23 <sup>**</sup>	1.16 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	0.99 $\pm$ 0.11 <sup>**●</sup>

注:与 ZC 组相比,\*表示  $P < 0.05$ ,\*\*表示  $P < 0.01$ ;与 TC 组相比,\*表示  $P < 0.05$ ,\*\*表示  $P < 0.01$ ;与 TS 组相比,●表示  $P < 0.05$ ,●●表示  $P < 0.01$ ,下同。

1.3.2 骨中相关因子蛋白表达检测 右侧胫骨研磨后,提取蛋白并用 BCA 法测其浓度。利用 PBS 将蛋白调到统一浓度后,加等量 Loading buffer 并于  $95^{\circ}\text{C}$  进行 5min 变性(同时配制分离胶和浓缩胶)。结束后,12 000g  $\times$  2min 离心,混匀,再重复 1 次。加样并进行电泳。结束后,PVDF 膜甲醇浸泡后,进行转膜。将膜于 0.2% 丽春红中 50s 后,ddH<sub>2</sub>O 洗膜,随后 5% 脱脂奶粉封闭 1-2h。然后,孵 I 抗(稀释

1000 倍)且  $4^{\circ}\text{C}$  过夜。TBST 洗膜,10min/次,共 4 次。孵 II 抗 2h, TBST 洗膜 4 次,10min/次。将 PVDF 膜置于显影液中并用 Alpha 凝胶成像系统进行显影拍照并用自带软件进行数据分析。

1.3.3 BMM 分化产生 OC 检测 断颈椎处死小鼠,按标准步骤取 BMM 并诱导其向 OC 分化<sup>[3]</sup>。于分化的第 5 天,利用 4% PFA 固定 OC 后,进行 TRAP 染色<sup>[7]</sup>,利用 Canon 相机和 Leica 显微镜进行

拍照并利用 Blindness 法进行计数。

1.3.4 胫骨形态大小检测 取小鼠右侧胫骨并利用游标卡尺对其形态大小指标进行测量。

### 1.4 数据分析

利用 Excel、GraphPad Prism 5 和 SPSS18.0 对实验检测的数据进行分析(ZC 组和 TC 组进行独立样本 T 检验,TC 组、TS 组和 TD 组进行单因素方差分析), $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  分别表示差异具有显著性和差异具有非常显著性。

## 2 研究结果

### 2.1 不同力学刺激对 T2DM 小鼠骨中相关因子 mRNA 表达的影响

分析表 2 可知,与 ZC 组相比,TC 组 GPR48、OPG、RANKL、RANK、NFATc2 和 CTSK 的 mRNA 表达均显著变化( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 TC 组相比,TS 组 GPR48、OPG、RANKL、NFATc2 和 CTSK 的 mRNA 表达均显著变化( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );TD

组 GPR48、OPG、RANKL、RANK、NFATc2 和 CTSK 的 mRNA 表达均显著变化( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 TS 组相比,TD 组 OPG 和 CTSK 的 mRNA 表达显著变化( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同力学刺激对 T2DM 小鼠骨中相关因子蛋白表达的影响

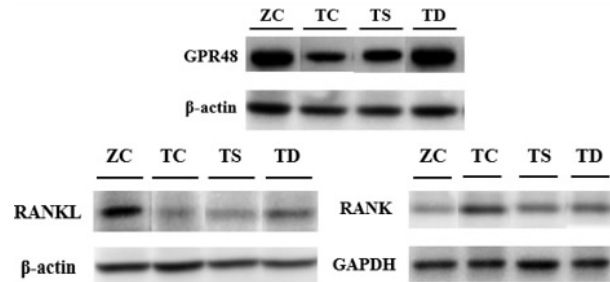


图 1 不同运动组 T2DM 小鼠相关因子蛋白表达示意图  
Graph 1 Expression of related factors in T2DM mice with different exercise

表 3 不同力学刺激对 T2DM 小鼠骨中相关因子蛋白表达影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effects of mechanical stimulation on the expression of related factors in T2DM mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

检测指标	ZC 组	TC 组	TS 组	TD 组
GPR48	1.59 ± 0.14	0.71 ± 0.22**	1.04 ± 0.28*	1.46 ± 0.25***
RANKL	1.01 ± 0.39	0.61 ± 0.11*	0.84 ± 0.19*	0.85 ± 0.19*
RANK	0.66 ± 0.17	1.25 ± 0.31**	1.14 ± 0.1022	0.89 ± 0.14***

由图 1 和表 3 可知,与 ZC 组相比,TC 组 GPR48 和 RANKL 蛋白表达下调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), RANK 蛋白表达上调( $P < 0.01$ )。与 TC 组相比,TS 组 GPR48 和 RANKL 蛋白表达上调( $P < 0.05$ );TD 组 GPR48 和 RANKL 蛋白表达上调( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),而 RANK 蛋白表达显著下调( $P < 0.05$ )。与 TS 组相比,TD 组 GPR48 蛋白表达上调( $P < 0.05$ ),RANK 蛋白表达下调( $P < 0.01$ )。

### 2.3 不同力学刺激对 T2DM 小鼠 OC 分化的影响

由图 2 所示,与 ZC 组相比,TC 组 OC 数量显著增多。与 TC 组相比,TS 组 OC 数量显著减少,而 TD 组 OC 数量亦出现显著减少。与 TS 组相比,TD

组 OC 数量显著减少。

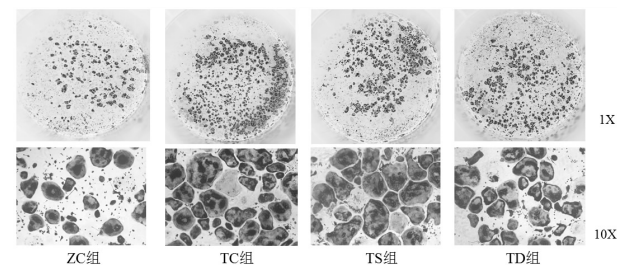


图 2 不同力学刺激对 T2DM 小鼠 OC 分化的影响  
Graph 2 Effect of mechanics stimulation on OC differentiation in T2DM mice

### 2.4 不同力学刺激对 T2DM 小鼠胫骨骨形态大小的影响

表 4 不同力学刺激对 T2DM 小鼠胫骨骨形态大小的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effects of mechanical stimulation tibial morphological size in T2DM mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

变量(mm)	ZC 组	TC 组	TS 组	TD 组
胫骨长度	18.69 ± 0.72	17.14 ± 2.42	17.99 ± 0.65	18.43 ± 0.36*
远端矢状面宽度	1.29 ± 0.31	1.23 ± 0.08	1.22 ± 0.12	1.21 ± 0.13
远端冠状面宽度	2.01 ± 0.32	1.42 ± 0.21*	1.61 ± 0.24	1.64 ± 0.21
中间矢状面宽度	1.55 ± 0.16	1.48 ± 0.34	1.39 ± 0.13	1.34 ± 0.16**
中间冠状面宽度	1.49 ± 0.30	1.39 ± 0.21	1.57 ± 0.18	1.5 ± 0.30
近端矢状面宽度	2.39 ± 0.19	2.59 ± 0.23	2.34 ± 0.19	2.40 ± 0.29
近端冠状面宽度	2.16 ± 0.27	1.83 ± 0.28*	2.13 ± 0.37	2.06 ± 0.39



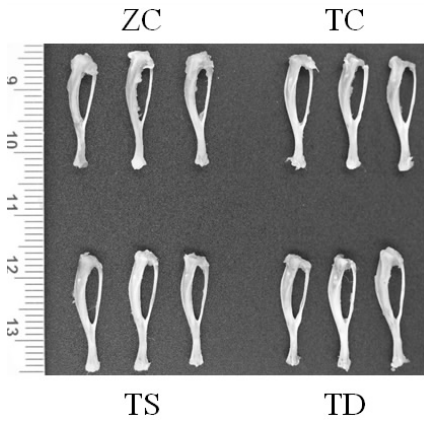


图3 不同力学刺激对 T2DM 小鼠胫骨形态的影响(1×)  
Graph 3 Effect of mechanical stimulation on tibial morphology in T2DM mice (1×)

由图3和表4可知,与ZC组小鼠相比,TC组胫骨远端冠状面宽度和胫骨近端冠状面宽度显著变小( $P < 0.05$ )。与TC组相比,TD组胫骨长度和中间矢状轴宽度显著减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

### 3 讨论分析

T2DM的OC分化异常升高,导致骨吸收增强,骨量和骨形态大小下降<sup>[8-9]</sup>。该过程受众多关键分子或途径调控。GPR48作为膜上7次跨膜受体<sup>[10]</sup>,敲除GPR48或其表达下调后,小鼠OC分化及骨吸收能力增强,使得骨形态大小下降<sup>[2,11]</sup>。而OPG-RANKL-RANK分子轴作为调控OC分化的重要途径,其下游靶基因活化T细胞核因子2(Nuclear factor of activated T cells, NFATc2)、组织蛋白酶K(Cathepsin K, CTSK)、AP-1等表达上调,促进T2DM的OC分化产生<sup>[12]</sup>。最近研究发现,GPR48是RANKL的另一膜上受体,其通过胞外结构域(ECD)同RANKL竞争性同RANK结合,激活Gαq和GSK-3β信号通路及下游靶基因NFATc2、CTSK、抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)等表达,促进OC分化<sup>[3]</sup>。目前有关T2DM小鼠骨中GPR48-RANKL途径被抑制后促进RANK激活,上调其靶基因表达的相关研究较少报道。本研究中,TC组GPR48mRNA和蛋白表达及OPG和RANKLmRNA表达均下调,而RANK、NFATc2和CTSK表达上调,说明T2DM通过GPR48-RANKL途径,上调RANK及下游靶基因表达。这与T2DM小鼠骨中胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors, IGFs)信号途径被抑制有关,研究发现,IGF-1表达下调会抑制GPR48表达<sup>[13]</sup>。

OPG-RANKL-RANK分子轴在运动改善OC分化及骨吸收中起重要介导作用<sup>[14]</sup>。T2DM促进OC分化,而运动可抑制T2DM的OC分化<sup>[15]</sup>。目

前有关运动改善T2DM骨代谢的研究集中在骨表型上,其分子调控机制尚不清晰。探究GPR48-RANKL通路在运动抑制T2DM小鼠OC分化中调控作用的研究较少。本研究中,与TC组相比,TS组GPR48、OPG、RANKL、NFATc2和CTSKmRNA表达上调,但RANK的mRNA和蛋白表达均无变化,表明游泳虽可激活GPR48,但并不能抑制OPG-RANKL-RANK分子轴及其下游靶基因。究其原因,与游泳对T2DM小鼠骨产生的间接作用力抑制OC分化的作用效果不显著,GPR48/RANKL比值低,RANKL仍可激活RANK有关。而TD组GPR48、OPG、RANKL、RANK、NFATc2和CTSK表达均显著变化且与TS组相比,TD组OPG和CTSKmRNA表达下调,而GPR48和RANK蛋白表达均显著变化。表明下坡跑可上调T2DM小鼠骨中GPR48-RANKL通路及下游靶基因表达。分析两种运动结果差异,与T2DM小鼠骨受到的力学刺激方式不同密切相关<sup>[5]</sup>。下坡跑对T2DM小鼠骨产生的直接力学刺激可上调作为GPR48配体的R-Spondin1/2/5表达,通过作用于GPR48胞外肽链N端并将其激活后抑制OPG-RANKL-RANK分子轴及其靶基因NFATc2、CTSK等表达<sup>[16]</sup>。再者与直接力学刺激上调活性转录因子4(Activating transcriptional factor4, ATF4)<sup>[17]</sup>和激活血管内皮细胞生长因子受体2(Vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)-RAS信号通路<sup>[18]</sup>有关,ATF4与GPR48具有联控作用且ATF4表达上调可激活GPR48-RANKL途径<sup>[19]</sup>。而VEGFR2可通过MEK-ERK/JNK通路作用于Ras蛋白而上调T2DM小鼠骨中GPR48-RANKL途径及下游靶基因表达<sup>[20]</sup>。

T2DM小鼠BMM向OC的分化异常升高<sup>[21]</sup>,而有关T2DM促OC分化的研究较多<sup>[22-23]</sup>,在此不多赘述。本研究中,TC组OC数量显著增多,这与前人研究结果相一致。这与T2DM小鼠骨中GPR48-RANKL通路被抑制后,RANK及其下游靶基因表达上调密切相关。运动作为改善骨吸收的有效手段,其对T2DM小鼠OC分化的作用又如何呢?本研究中,与TC组相比,TS和TD组OC数量均显著减少,而TD组OC数量更少。说明,下坡跑抑制T2DM小鼠OC分化的作用效果优于游泳。下坡跑对T2DM小鼠产生的直接力学刺激可激活GPR48-RANKL通路,抑制RANK及其下游靶基因NFATc2和CTSK表达,从而抑制造血祖细胞向TRAP阳性单核前OC分化及单核OC向多核OC融核<sup>[24]</sup>。直接力学刺激促进T2DM小鼠成骨细胞(Osteoblast, OB)分化,OB分化增多上调RANKL表达,下游PI3K/Akt和ERK

信号通路及靶基因 DAPI2 表达失活,抑制 T2DM 小鼠 OC 分化<sup>[25]</sup>。

骨形态是宏观上评价骨代谢的经典指标,T2DM 小鼠骨代谢紊乱使的骨形态显著下降<sup>[26]</sup>。Camerino C 等<sup>[27]</sup>研究发现,T2DM 小鼠胫骨长度和骨形态宽度均显著降低。Burkemper KM 等<sup>[28]</sup>研究亦发现,T2DM 小鼠第 1-5 腰椎的长度显著降低。本研究中,TC 组远/近端冠状面宽度均显著降低,说明 T2DM 小鼠胫骨冠状面宽度显著减少。这与 T2DM 小鼠分化产生的 OC 数量增多,骨吸收增强有关<sup>[29]</sup>。再者与主导 T2DM 小鼠骨变粗的膜内成骨下降,使得骨形态变小亦有关<sup>[30]</sup>。运动可显著改善 T2DM 的 BMD、骨生物力学等指标<sup>[31]</sup>。本研究中,TS 组各指标呈下降趋势但变化不显著,而 TD 组胫骨长度和中间矢状轴宽度显著增加。说明下坡跑可显著增加 T2DM 小鼠骨形态大小,而游泳作用影响不显著。分析原因,下坡跑对骨产生的直接力学刺激可显著抑制 T2DM 小鼠 OC 分化,使得骨吸收降低及骨丢失减少<sup>[32]</sup>。再者与直接力学刺激提高 T2DM 小鼠骨形成,骨中 Col1、OCN、BSP 等有机质增多,利于钙、磷等矿物质沉积,使得骨形态大小增加<sup>[33]</sup>。

#### 4 结论

T2DM 小鼠 OC 分化显著增强;直接力学刺激激活 T2DM 小鼠骨中 GPR48-RANKL 通路,进而抑制 RANK 及其下游靶基因表达,抑制 OC 分化,且其作用效果优于间接作用力。

#### 参 考 文 献

[1] CAO JJ. Effects of obesity on bone metabolism[J]. Res, 2011, 15(6):30-35.

[2] LUO J, ZHOU W, ZHOU X, et al. Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48[J]. Development, 2009, 136(16):2747-2756.

[3] LUO J, YANG Z, MA Y, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption[J]. Nat Med, 2016, 22(5):539-546.

[4] 李世昌,季浏,马涛,等.不同方式跑台运动对去卵巢小鼠破骨细胞分化及相关调节因子的影响[J].中国体育科技,2011,47(5):134-140.

[5] 陈祥和,李世昌,严伟良,等.不同方式运动对生长期雄性小鼠骨形成和骨吸收代谢影响的研究[J].西安体育学院学报,2015,32(2):205-211.

[6] KANAZAWA I, YAMAGUCHI T, YAMAUCHI M, et al. Serum under carboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus[J]. Osteoporos Int, 2011, 22(1):187-194.

[7] 杨正峰. RANKL 新受体 LGR4 负调控破骨细胞分化与功能[D].上海:华东师范大学,2014.

[8] 陈祥和,李世昌,严伟良,等. Hedgehog 信号通路对成骨细胞分化和骨形成的影响及不同方式运动的调控[J].北京体育大学学报,2015,38(11):59-64.

[9] PALERMO A, DONOFRIO L, EASTELL R, et al. Oral anti-diabetic drugs and fracture risk, cut to the bone: safe or dangerous A narrative review[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(8):2073-2089.

[10] LOH E D, BROUSSARD S R, LIU Q, et al. Chromosomal localization of GPR48, a novel glycoprotein hormone receptor like GPCR, in human and mouse with radiation hybrid and interspecific backcross mapping[J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 89(1-2):2-5.

[11] STYRKARSDOTTIR U, THORLEIFSSON G, SULEM P, et al. Nonsense mutation in the LGR4 gene is associated with several human diseases and other traits[J]. Nature, 2013, 497(50):517-520.

[12] WANG J, CHEN T Y, QIN S, et al. Inhibitory effect of metformin on bone metastasis of cancer via OPG/RANKL/RANK system[J]. Med Hypotheses, 2013, 81(5):805-806.

[13] 宋会平.血液成分与骨组织的内在联系及组织工程学评价[D].广州:南方医科大学,2008.

[14] 李世昌,马涛,陈祥和,等.上、下坡跑台运动对去卵巢小鼠骨组织 OPG-RANKL-RANK 系统的影响[C].第九届全国体育科学大会,2011:489.

[15] MARTIN M, KRYSSTOF S, JIRI R, et al. Modulation of energy intake and expenditure due to habitual physical exercise[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(24):3681-3699.

[16] ZHU C, ZHENG X F, YANG Y H, et al. LGR4 acts as a key receptor for R-spondin 2 to promote osteogenesis through Wnt signaling pathway[J]. Cell Signal, 2016, 28(8):989-1000.

[17] Y, KIM J H, JIN Y, et al. Melatonin treatment combined treadmill exercise accelerates muscular adaptation through inhibition of CHOP-mediated autophagy in the gastrocnemius of rats with intra-articular collagenase-induced knee laxity[J]. J Pineal Res, 2014, 56(2):175-188.

[18] A H, BLUMENTHAL J B, LANDERS-RAMOS R Q, et al. Exercise-induced endothelial progenitor cell mobilization is attenuated in impaired glucose tolerance and type 2 diabetes[J]. J Appl Physiol, 2016, 121(1):36-41.

[19] 宋会平,王志强,毕若杰,等.大鼠创伤性股骨头坏死进程中 ATF4 与 GPR48 的表达联控[J].山东大学学报(医学版),2014,52(1):42-46.

[20] 赖力.白花丹醌通过 VEGFR2-RAS 信号通路抑制肿瘤血管新生以及 LGR4 通过调节肿瘤干细胞促进乳腺癌发生发展的机制研究[D].上海:华东师范大学,2013.

[21] DANKBAR B, FENNEN M, BRUNERT D, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice[J]. Nat Med, 2015, 21(9):1085-1090.

[22] 马剑侠,成翕悦,薛鹏,等.2型糖尿病大鼠破骨细胞变化[J].河北医科大学学报,2015,36(6):625-627.

[23] 王燕.2型糖尿病骨质疏松症的基础与临床研究[D].石家庄:河北医科大学,2011.

参考文献:宋体五号,行距固定值18磅。篇数应大于10篇,综述类大于20篇。英文作者姓名的所有字母都要大写,姓写全称,名缩写,文献标题只有首字母大写

- [24] XIE W, LORENZ S, DOLDER S, et al. Extracellular iron is a modulator of the differentiation of osteoclast lineage cells [J]. *Calcif Tissue Int*, 2016, 98(3):275 - 283. .
- [25] KAMEDA Y, TAKAHATA M, KOMATSU M, et al. Siglec - 15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL - induced phosphatidylinositol 3 - kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling adaptor DAP12 [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(12): 2463 - 2475.
- [26] M? LLER - BIERL B, LOUIS O, FIERENS Y, et al. Cylinders or walls: A new computational model to estimate the MR transverse relaxation rate dependence on trabecular bone architecture [J]. *MAGMA*, 2014, 27(4):349 - 361.
- [27] CAMERINO C, ZAYZAFOON M, RYMASZEWSKI M, et al. Central depletion of brain - derived neurotrophic factor in mice results in high bone mass and metabolic phenotype [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(11):5394 - 5405.
- [28] BURKEMPER K M, GARRIS D R. Influences of obese (ob/ob) and diabetes (db/db) genotype mutations on lumbar vertebral radiological and morphometric indices: skeletal deformation associated with dysregulated systemic glucometabolism [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2006, 7 (1):13 - 19.
- [29] WANG ML, MASSIE J, PERRY A, et al. A rat osteoporotic spine model for the evaluation of bioresorbable bone cements [J]. *Spine J*, 2007, 7(4):466 - 474.
- [30] IGNJATOVIC N L, AJDUKOVIC Z R, SAVIC V P, et al. Size effect of calcium phosphate coated with poly - DL - lactide - co - glycolide on healing processes in bone reconstruction [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 94(1):108 - 117.
- [31] VOLPON J B, SILVA A V, FALCAI M J, et al. The osteogenic effects of swimming on bone mass, strength, and microarchitecture in rats with unloading - induced bone loss [J]. *Microsc Res Tech*, 2015, 78(9):784 - 791.
- [32] LERTSINTHAI P, CHAROENPHANDHU J, SUNTORNSARATON P, et al. Voluntary wheel running mitigates the stress - induced bone loss in ovariectomized rats [J]. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33(3):261 - 269.
- [33] MARINHO S M, MAFRA D, PELLETIER S, et al. In hemodialysis patients, intradialytic resistance exercise improves osteoblast function: A pilot study [J]. *J Ren Nutr*, 2016, 21(16): 1051 - 1062.

### Abstract

**Objective:** To investigate the change of OC differentiation in T2DM mice and effect of different mechanical stimulation on OC differentiation by GPR48 - RANKL pathway in T2DM mice. **Methods:** Forty four - week old C57BL/6 male mice were randomly divided into normal control group (ZC) and T2DM group. Use the method of high - fat diet and STZ to build the model of T2DM mice, and the T2DM mice were randomly divided into T2DM control group (TC), T2DM swimming group (TS) and T2DM downhill run group (TD). And use the swimming and downhill running to train the T2DM mice for eight weeks. After this, use the RT - PCR to test the mRNA expression in the left tibia. Use the WB to test the protein expression in right femur. Take the BMM and induced it differentiation into osteoclast, use the TRAP solution to dye the osteoclasts. Use the vernier caliper to test the shape size of right tibia. **Results:** Compared to ZC group, the mRNA expression of GPR48、OPG、RANKL、RANK, NFATc2, CTSK and protein expression of GPR48、RANKL、RANK of TC group were all significantly changed ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), the number of OC was significantly increased, the width of distal coronary surface and the surface of the proximal coronary was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared to TC group, the mRNA expression of GPR48, OPG, RANKL, NFATc2, CTSK and the protein expression of GPR48 and RANKL of TS group were significantly changed ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The number of osteoclast was significantly reduced. The mRNA expression of GPR48, OPG, RANKL, RANK, NFATc2, CTSK and the protein expression of GPR48, RANKL, RANK were all significantly changed ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The number of osteoclast was significantly reduced, the length of tibia and width of the middle sagittal axis were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared to TS group, the mRNA expression of OPG, CTSK and the protein expression of GPR48, RANK, RANKL of TD group were significantly changed ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), OC number were drastically reduced. **Conclusion:** The osteoclast differentiation of type 2 diabetic mice was significantly increased. The direct mechanical stimulation activated the GPR48 - RANKL pathway, which inhibited the RANK and their target gene expression, and then inhibited the osteoclast differentiation of type 2 diabetic mice. The effect of direct mechanical stimulation was better than that of indirect one.

**Key words:** *G Protein Coupled Receptor 48; Receptor Activator for Nuclear Factor -  $\kappa$  B Ligand; Different Mechanical Stimulation; Type 2 Diabetes Mellitus; Osteoclast*

**CLC number:** G804.2      **Document code:** A      **Article ID:** 1001 - 9154(2017)03 - 0090 - 06

(编辑 李新)