

· 论著 ·

Wnt 信号通路中 DKK1、 β -catenin 基因在绝经后女性 2 型糖尿病患者中的表达及与骨代谢关系的研究

胡倩¹ 周琼² 李军^{1*} 李思源³ 胡颖⁴ 李佳佳¹

1. 新疆石河子大学医学院第一附属医院内分泌代谢科, 新疆 石河子 832000

2. 新疆第二师二十九团医院, 新疆 库尔勒 841000

3. 新疆石河子大学医学院, 新疆 石河子 832000

4. 新疆医科大学第四附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830000

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 11-1459-05

摘要: **目的** 探讨绝经后女性 2 型糖尿病(T2DM)患者 Wnt 信号通路中血清 DKK1、 β -catenin 基因的表达及与骨代谢的关系。**方法** 收集新疆石河子社区、医院病人中 2 型糖尿病(T2DM)与糖耐量正常(NGT)受试者各 50 例,记录其年龄、身高、体重等一般临床基线资料,全自动生化分析仪测定空腹血糖(FPG)、血钙(Ca)、血磷(P)等生化指标,高压液相色谱法测定糖化血红蛋白(HbA1c);双能 X 线(DXA)法测定腰椎及股骨骨密度;采用荧光定量反转录聚合酶链式反应法(qRT-PCR)检测 DKK1 基因和 β -catenin 基因表达水平并进行统计分析。**结果** ①对绝经后女性 NGT 组和 T2DM 组年龄以及体质指数(BMI)进行统计分析,组间均无统计学差异($P > 0.05$),说明资料齐,具有可比性。②与 NGT 组相比,T2DM 组糖代谢指标:空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)、果糖胺(fructosamine,FMN)、HbA1c 水平增高($P < 0.01$);骨代谢指标:磷(P)水平增高($P < 0.01$)。③ T2DM 组股骨(femur)骨密度(bone mineral density,BMD)较 NGT 组显著降低($P < 0.05$)。④与 NGT 组相比,T2DM 组外周血白细胞中 DKK1 基因表达水平为 NGT 组的 5.99 倍, β -catenin 基因表达水平为 NGT 组的 0.46 倍。⑤ β -catenin 基因在绝经后女性 T2DM 组中的表达与 P 呈负相关关系且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。⑥以骨代谢指标(Ca、P、ALP)为应变量,以 DKK1 基因和 β -catenin 基因为自变量,进行多元线性回归分析,在 T2DM 组中, β -catenin 基因进入以 P 为应变量的回归方程: $Y = 1.445 - 0.287X$ 。**结论** 绝经后女性 T2DM 患者 Wnt 信号通路表达异常,DKK1 基因的高表达可能抑制了其下游通路的转导,从而导致 β -catenin 基因的低表达,致使该人群 BMD 水平的下降,进而参与骨质疏松(OP)的发生发展。

关键词: 绝经后女性;2 型糖尿病;DKK1; β -catenin;qRT-PCR;骨密度

Expression of DKK1 and β -catenin in Wnt signaling pathway in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus and their relationship with bone metabolism

HU Qian¹, ZHOU Qiong², LI Jun^{1*}, LI Siyuan³, HU Ying⁴, LI Jiajia¹

1. The First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. The 29th Hospital of the Second Division, Kuerle 841000, China

3. Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, China

4. The Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

* Corresponding author: LI Jun, Email: xjljun@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression of DKK1 and β -catenin gene in Wnt signaling pathway and the relationship with bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Fifty patients with type 2 diabetes (T2DM) and fifty patients with normal glucose tolerance (NGT) from the community and inpatient community in Shihezi, Xinjiang, were selected. Their clinical data such as age, height, and body weight were recorded. Fasting plasma glucose (FPG), serum calcium (Ca), phosphorus (P), and other biochemical indicators were measured using an automatic biochemical analyzer.

基金项目: 区域创新引导计划(2018BB040);留学人员科技活动项目择优资助基金(2016LX009);兵团中青年科技创新领军人才专项(2015BC001)。

* 通信作者: 李军,Email:xjljun@163.com

HbA1c were measured with high pressure liquid chromatography. Dual energy X-ray (DEXA) was used for the determination of bone mineral density of the lumbar vertebrae and femur. The expression of Dkk1 and β -catenin gene was detected using qRT-PCR and compared between groups. **Results** ① Compared with NGT group, there was no significant difference in age and BMI between T2DM and postmenopausal women ($P > 0.05$). ② Compared with NGT group, the levels of the glucose metabolism indexes, FPG (5.47 ± 0.73 , 9.26 ± 2.38), FOC (239.74 ± 36.54 , 337.66 ± 87.31), and HbA1c (6.23 ± 0.92 , 8.70 ± 1.76) in T2DM group increased ($P < 0.01$), and bone metabolism indicators, P (1.11 ± 0.12 , 1.24 ± 0.16) also increased ($P < 0.01$). ③ BMD of the femur in T2DM group was significantly lower than that in NGT group ($P < 0.05$). ④ Compared with NGT group, the expression level of Dkk1 gene in peripheral leukocytes in T2DM group was 5.99 times higher and β -catenin gene was 0.46 times of that in NGT group. ⑤ The expression of β -catenin gene in the postmenopausal female T2DM group was negatively correlated with P, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). ⑥ Multivariate linear stepwise regression analysis was performed using bone metabolic markers (Ca, P, and ALP) as dependent variable and DKK1 and β -catenin as independent variables. In the T2DM group, β -catenin gene entry was caused by P and the regression equation for the variable, $Y = 1.445 - 0.287X$. **Conclusion** The expression of Wnt signaling pathway is abnormal in postmenopausal women with T2DM. The high expression of Dkk1 gene may inhibit the transduction of its downstream pathway, leading to the low expression of β -catenin gene, Resulting in the decrease of BMD level in this population, and then participating in the occurrence and development of osteoporosis (OP).

Key words: postmenopausal women; type 2 diabetes; Dkk1; β -catenin; qRT-PCR; bone mineral density

糖尿病是一种易合并多种并发症的慢性代谢性疾病,且 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的发病人数约占全部糖尿病患者的 90% 以上。骨质疏松是 T2DM 的常见并发症,绝经是糖尿病和骨质疏松症的已知危险因素,绝经后女性 T2DM 患者较一般人群更易合并骨量异常,甚至骨质疏松(osteoporosis, OP)^[1]。日前,骨质疏松症(OP)和 2 型糖尿病(T2DM)被认为是两个主要的健康问题,两种疾病在老年人群中都有越来越高的患病率。

Wnt 信号通路为高度保守的信号通路,是调节成骨细胞活性及生成的重要通路,目前研究较为清楚且被广为关注的是 Wnt/ β -catenin 信号通路。DKK1 是一种分泌性糖蛋白,主要通过与其低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/ LRP6) 受体及 Kremen-1/2 结合成复合物而阻断 Wnt 信号传导,是 Wnt 经典信号通路的重要抑制剂^[2]。许多研究表明阻断 DKK1 的功能有利于骨形成和防止系统性骨量丢失^[3]。本研究通过测定绝经后女性 T2DM 患者外周血 Wnt 信号通路中 DKK1、 β -catenin 基因的表达并分析其与骨代谢的关系,从基因水平阐明 T2DM 合并骨代谢异常的发病机制,有利于绝经后女性骨质疏松的防治。

1 材料和方法

1.1 一般资料

选取 2015 年 10 月至 2016 年 10 月石河子地区社区及于我院就诊的绝经后女性为研究对象,根据 OGTT 试验结果,分为 T2DM 组、NGT 组,每组 50

人。该实验已通过石河子大学医学院第一附属医院伦理委员会的批准,纳入对象均签署知情同意书。

1.2 诊断标准

T2DM 的诊断符合 1999 年 WHO 制定的糖尿病诊断准则,OP 的诊断符合 1994 年 WHO 骨质疏松诊断标准。同时排除 1 型糖尿病、特殊类型糖尿病、自身免疫性疾病;影响骨代谢的各种因素;雌激素、降钙素、维生素 K 等影响骨代谢的药物服用史及其他先天性骨质疏松症。

1.3 方法

1.3.1 常规指标的测定:由经过专业培训的工作人员按统一标准对受试者进行常规指标的测量,包括年龄(age)、身高(height)、体重(weight),并计算体质指数(BMI) = 体重(kg)/身高²(m²)。

1.3.2 一般生化指标的测定:全自动生化分析仪(7071 型,日本日立株式会社)测定空腹血糖(FPG)、果糖胺(FMN)、钙(Ca)、磷(P)等生化指标。

1.3.3 骨密度的测定:双能 X 线骨密度检测仪(法国 MEDI LINK 公司)测定腰椎及股骨骨密度。

1.3.4 DKK1, β -catenin 基因的测定:实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad CFX96 Manager © Thermo 公司)测定 DKK1, β -catenin 基因的表达水平。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 20.0 对所得数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若数据符合正态分布,两组间均数比较采用独立样本 t 检验;若数据不符合正态分布,两组间均数比较则使用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间一般资料的比较

对绝经后女性 NGT 组和 T2DM 组年龄以及体质指数(BMI)进行统计分析,组间均无统计学差异($P > 0.05$),说明资料齐,具有可比性(见图 1)。

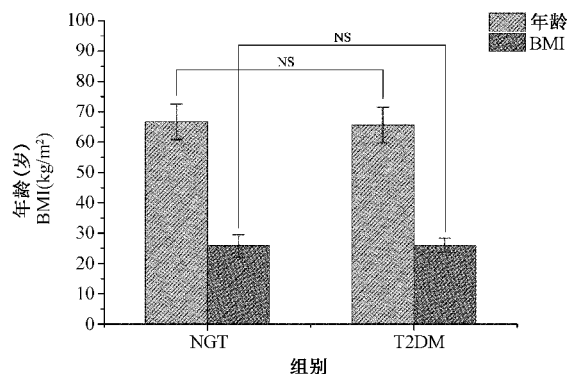


图 1 T2DM 组与 NGT 组年龄及 BMI 比较情况

Fig. 1 Comparison of age and BMI between T2DM group and NGT group

2.2 两组间生化指标的比较

与绝经后女性 NGT 组相比,T2DM 组糖代谢指标:FPG、FMN、HbA1c 水平较高($P < 0.01$);骨代谢指标:P 水平较高($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 NGT 组与 T2DM 组生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of biochemical indexes between NGT and T2DM ($\bar{x} \pm s$)

指标	NGT 组	T2DM 组	P 值
FPG/(mmol/L)	5.47 ± 0.73	9.26 ± 2.38 **	<0.001
FMN/(μmol/L)	239.74 ± 36.54	337.66 ± 87.31 **	<0.001
HbA1c/%	6.23 ± 0.92	8.70 ± 1.76 **	<0.001
Ca/(mmol/L)	2.26 ± 0.08	2.28 ± 0.08	0.277
P/(mmol/L)	1.11 ± 0.12	1.24 ± 0.16 **	<0.001
ALP/(U/L)	76.85 ± 18.05	73.68 ± 24.33	0.541

注:与 NGT 组比较,** $P < 0.01$ 。

2.3 两组间骨密度情况的比较

T2DM 组股骨(femur)BMD 较 NGT 组显著降低($P < 0.05$),余部位无统计学差异。见表 2。

表 2 NGT 组与 T2DM 组不同部位骨密度比较(g/cm^2)

Table 2 Comparison of bone mineral density in different parts between NGT group and T2DM group(g/cm^2)

指标	NGT 组	T2DM 组	P 值
L ₁	0.93(0.81, 1.02)	0.91(0.81, 1.00)	0.673
L ₂	0.99(0.87, 1.12)	0.92(0.86, 1.10)	0.165
L ₃	1.061(0.93, 1.15)	1.00(0.90, 1.16)	0.258
L ₄	1.10(0.95, 1.24)	1.03(0.90, 1.23)	0.432
L ₁ -L ₄	1.00(0.88, 1.12)	0.99(0.87, 1.10)	0.448
Femoral neck	0.99(0.78, 1.23)	1.02(0.92, 1.11)	0.553
Femur	0.87(0.80, 0.95)	0.80(0.61, 0.90) **	0.003

注:与 NGT 组比较,** $P < 0.01$ 。

2.4 两组间 DKK1 基因表达水平的比较

与绝经后女性 NGT 组相比,T2DM 组 DKK1 基因表达水平较高,外周血白细胞 qRT-PCR 数据经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算:(1, 5.99),T2DM 组 DKK1 基因表达水平为 NGT 组的 5.99 倍($P < 0.05$)见图 2。

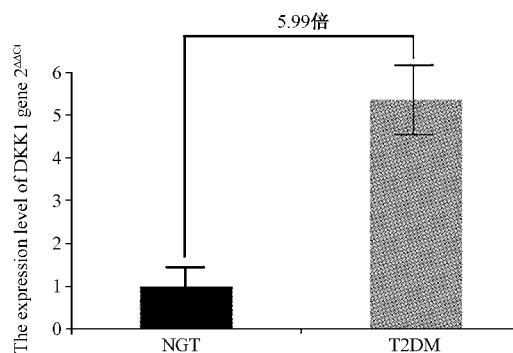


图 2 T2DM 组与 NGT 组白细胞内 DKK1 表达情况

Fig. 2 Dkk1 expression in white blood cells in T2DM and NGT groups

2.5 两组间 β -catenin 基因表达水平比较

与绝经后女性 NGT 组相比,T2DM 组 β -catenin 基因表达水平显著降低,外周血白细胞 qRT-PCR 数据经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算:(1, 0.46),T2DM 组 β -catenin 基因表达水平为 NGT 组的 0.46 倍,见图 3。

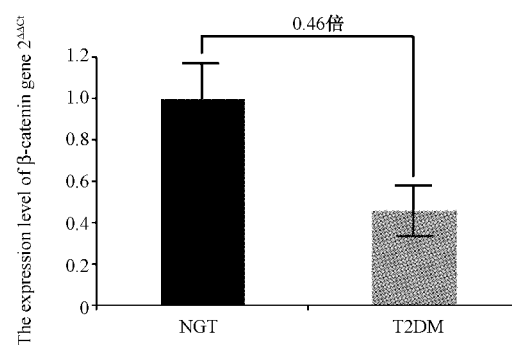


图 3 T2DM 组与 NGT 组白细胞内 β -catenin 表达情况

Fig. 3 Expression of β -catenin in white blood cells of T2DM and NGT groups

2.6 T2DM 组中 β -catenin 基因与骨代谢指标相关性分析

分析绝经后女性 2 型糖尿病患者 β -catenin 基因与骨代谢指标相关性,分析结果显示,在绝经后女性 T2DM 组中, β -catenin 基因与 P 呈负相关关系,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。表 3。

表 3 β -catenin 基因与骨代谢指标相关性分析Table 3 Correlation analysis between β -catenin gene and bone metabolism indexes

指标	Ca	P	ALP
β -catenin	r -0.146	-0.287 *	0.123
gene	P 0.311	0.043	0.396

注: * $P < 0.05$ 。

2.7 以骨代谢指标为应变量进行多元线性回归分析

以骨代谢指标(Ca, P, ALP)为应变量,以 DKK1 基因和 β -catenin 基因为自变量,进行多元线性逐步回归分析,在 T2DM 组中, β -catenin 基因进入以 P 为应变量的回归方程,其他指标未进入回归方程。而在 NGT 组中,所有指标均未进入回归方程。由表 4 可建立以 P 为应变量的回归方程: $Y = 1.445 - 0.287X$ 。

表 4 以骨代谢指标为应变量的多元线性回归分析

Table 4 Multivariate linear regression analysis with bone metabolic indexes as dependent variables

变量	B	标准化系数	t 值	P 值
常量	1.445		14.165	<0.001
β -catenin gene	-0.010	-0.287	-2.078	0.043

3 讨论

众多研究均表明糖尿病患者易合并骨代谢异常^[4]。糖尿病患者由于血糖的升高会抑制胰岛素样生长因子(IGF-I)的生成,从而减弱其成骨作用;胰岛素分泌不足或缺乏会影响成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收,进而对骨质疏松的发生发展产生影响^[5-6]。绝经后女性由于卵巢功能的衰退,雌激素产生及分泌减少,激素水平的异常影响骨代谢,使成骨细胞生成减少,而破骨细胞生成增多,骨的吸收大于骨的形成作用,因此绝经后女性更易发生骨折疏松^[7]。然而,目前绝经后女性 2 型糖尿病患者骨质疏松的发病机制尚不明确。

研究表明,Wnt/ β -catenin 经典信号通路在成骨细胞分化和功能上起着关键作用,Wnt 信号通路激活不仅通过刺激成骨细胞的发生进而增加骨量,同时也抑制着破骨细胞的发生^[8]。DKK1 作为 DKK 家族中最好的特征成员之一,是经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的强有力的抑制剂。Ahmed 等^[9]的研究结果显示血清 DKK1 明显升高的绝经后妇女有更严重的骨质疏松,表明较高水平的 DKK1 可能是骨质疏松发生和严重程度的生物标志物。相关研究^[10-11]表明,外周血 Wnt 通路中 DKK1、 β -catenin 表

达水平对骨组织 Wnt 及骨代谢有重要影响,这与本研究结果相符。

Corrado 等^[12]的研究结果表明,与健康人群相比,骨质疏松患者 DKK1 表达水平增高, β -catenin 表达水平降低,DKK1 的高表达抑制了 β -catenin 信号,使软骨生成和骨生成减少。研究发现在 T2DM 患者体内,胶原组织中骨胶原代谢增高,导致骨吸收增强,血 P 水平较正常人群升高。在本研究中,DKK1 基因表达水平在 T2DM 组升高,而 β -catenin 基因表达水平在 T2DM 组降低,同时 P 在 T2DM 组中表达升高,且股骨骨密度降低,P 与 β -catenin 基因表达($r = -0.287$; $P = 0.043$)呈负相关关系,提示绝经后女性 T2DM 患者体内,血 P 水平随 β -catenin 基因表达水平降低而增高,可进一步说明绝经后女性 T2DM 患者 Wnt 信号通路表达异常,DKK1 基因的高表达可能抑制了其下游通路的转导,从而导致 β -catenin 基因的低表达,进而通过对血 P 水平的影响参与骨代谢异常。该研究结果为绝经后女性 T2DM 患者骨质疏松的发病机制提供线索,并且为该人群骨质疏松的预防及治疗提供依据。

【参 考 文 献】

- [1] Schwartz AV, Vittinghoff E, Bauer DC, et al. Association of BMD and FRAX score with risk of fracture in older adults with type 2 diabetes. JAMA, 2011,305(21): 2184-2192.
- [2] Zhang W, Drake MT. Potential role for therapies targeting DKK1, LRP5, and serotonin in the treatment of osteoporosis. Current Osteoporos Reports, 2012,10(1): 93-100.
- [3] Florio M, Gunasekaran K, Stolina M, et al. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. Nature Commun, 2016,7: 11505.
- [4] Moayeri A, Mohamadpour M, Mousavi SF, et al. Fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus and possible risk factors: a systematic review and meta-analysis. Therapeut Clin Risk Manage, 2017, 13: 455-468.
- [5] Wongdee K, Charoenphandhu N. Charoenphandhu, osteoporosis in diabetes mellitus: possible cellular and molecular mechanisms. World J Diabetes, 2011, 2(3): 41-48.
- [6] Adil C, Aydın T, Kızıltan H, et al. Bone mineral density evaluation of patients with type 2 diabetes mellitus. J Physic Therapy Sci, 2015, 27(1): 179-182.
- [7] Öktem IK, Hekimsoy Z. Tip 2 Diyabetes Mellitus' ta Kemik Mineral Yoğunluğu. 2003.
- [8] Gifre L, Peris P, Ruizgaspáet S, et al. Effect of glucocorticoid treatment on Wnt signalling antagonists (sclerostin and Dkk-1) and their relationship with bone turnover. Bone, 2013, 57(1): 272-276.
- [9] Ahmed SF, Fouda N, Abbas AA, et al. Serum Dickkopf-1 Level

- in Postmenopausal Females; Correlation with Bone Mineral Density and Serum Biochemical Markers. *J Osteoporos*, 2013, 2013, 2013; 460210.
- [10] Chen Y, Whetstone HC, Youn A, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Bio Chem*, 2007, 282(1): 526-533.
- [11] Garner P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N. Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol*, 2008, 35(12): 2313-2315.
- [12] Corrado A, Neve A, Macchiarola A, et al. RANKL/OPG ratio and DKK-1 expression in primary osteoblastic cultures from osteoarthritic and osteoporotic subjects. *J Rheumatol*, 2013, 40(5): 684-694.
- (收稿日期: 2018-03-22; 修回日期: 2018-06-21)

(上接第 1450 页)

- [4] Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885-889.
- [5] Zhang S, Zhang L, Zhang H, et al. Hongjingtian injection attenuates myocardial oxidative damage via promoting autophagy and inhibiting apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017(21): 1-11.
- [6] Mortensen M, Ferguson DJ, Edelmann M, et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(2): 832-837.
- [7] 李军, 王倩, 林小星, 等. 自噬活性改变对骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(6): 675-679.
- [8] Liu X, Wang Y, Cao Z, et al. Staphylococcal lipoteichoic acid promotes osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells by increasing autophagic activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 485(2): 421-426.
- [9] Hu HM, Yang L, Wang Z, et al. Overexpression of integrin $\alpha 2$ promotes osteogenic differentiation of hBMSCs from senile osteoporosis through the ERK pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(5): 841-852.
- [10] 万永鲜, 徐丽丽, 卓乃强, 等. 自噬对骨质疏松症骨代谢的影响研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(4): 552-556.
- [11] Nuschke A, Rodrigues M, Stolz DB, et al. Human mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells consume accumulated autophagosomes early in differentiation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(6): 140.
- [12] Chang KH, Sengupta A, Nayak RC, et al. p62 is required for stem cell/progenitor retention through inhibition of IKK/NF- κ B/Ccl4 signaling at the bone marrow macrophage-osteoblast niche[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(6): 2084-2097.
- [13] Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis[J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 1965-1977.
- [14] Zhang L, Guo YF, Liu YZ, et al. Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of regulation-of-autophagy pathway for ultradistal radius BMD[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(7): 1572-1580.
- [15] Marciano DP, Kuruvilla DS, Boregowda SV, et al. Pharmacological repression of PPAR γ promotes osteogenesis[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7443.
- (收稿日期: 2018-03-24; 修回日期: 2018-05-07)