

校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 24520131153511

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于骨细胞自噬探讨雷帕霉素对于老年性  
骨质疏松症的作用及机制研究

Investigation of the Role and Mechanism of Rapamycin on  
Senile Osteoporosis via Osteocyte Autophagy

罗德庆

指导教师姓名: 练克俭 教授

专业名称: 外科学(骨科方向)

论文提交日期: 2016年 月

论文答辩时间: 2016年 月

学位授予日期: 2016年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016年 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
ATG	autophagy-related gene	自噬相关基因
BMD	bone mineral density	骨密度
BV/TV	bone volume/total volume	骨体积分数
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲亚砜
DXA	dual energy x-ray absorptiometry	双能 X 线吸收法
LC3	microtubule associated protein 1 light chain 3	微管相关蛋白 1 轻链 3
MAR	mineral apposition rate	骨矿化沉积率
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
OCN	osteocalcin	骨钙素
OP	osteoporosis	骨质疏松症
OPG	osteoprotegerin	骨保护素
RANKL	receptor activator of NF $\kappa$ B ligand	核因子 $\kappa$ B 受体活化素的配体
Tb.N	trabecular number	骨小梁数量
Tb.Sp	trabecular separation	骨小梁分离度
Tb.Th	trabecular thickness	骨小梁厚度
Tracp	tartrate resistant acid phosphatase	抗酒石酸酸性磷酸酶

## 目 录

摘 要.....	1
Abstract.....	3
第一章 前言.....	5
1.1 老年性骨质疏松症临床研究概况.....	5
1.1.1 骨质疏松症分类、流行病学及诊断.....	5
1.1.2 骨质疏松性骨折的流行病学.....	6
1.1.3 骨质疏松症治疗进展.....	6
1.2 老年性骨质疏松症研究进展.....	7
1.2.1 骨重建.....	7
1.2.2 骨细胞功能.....	9
1.2.3 自噬在骨质疏松症中的研究进展.....	10
1.3 雷帕霉素研究进展.....	11
1.4 本项目研究内容及科学意义.....	13
1.4.1 研究内容.....	13
1.4.2 科学意义.....	13
第二章 材料与方法.....	14
2.1 实验材料.....	14
2.1.1 实验动物.....	14
2.1.2 动物分组及药物处理.....	14
2.1.3 标本制备.....	14
2.1.4 主要试剂.....	16
2.1.5 主要试剂配制.....	17
2.1.6 主要仪器.....	18
2.2 实验方法.....	19
2.2.1 Micro-CT 检测.....	19
2.2.2 骨组织双荧光标记.....	19

2.2.3 抗酒石酸酸性磷酸酶染色.....	19
2.2.4 血液检测.....	20
2.2.5 实时荧光定量 PCR.....	20
2.2.6 Western blot 法.....	21
2.2.7 免疫组织化学法.....	22
2.2.8 TUNEL.....	22
2.2.9 统计分析.....	23
<b>第三章 结果与分析.....</b>	<b>24</b>
3.1 雷帕霉素抑制增龄性骨丢失.....	24
3.2 雷帕霉素调节骨代谢.....	26
3.3 雷帕霉素抑制骨细胞凋亡.....	29
3.4 雷帕霉素促进骨细胞自噬.....	31
<b>第四章 讨论.....</b>	<b>33</b>
4.1 老年性骨质疏松症动物模型.....	33
4.2 Micro-CT 在骨质疏松症中的应用.....	33
4.3 雷帕霉素抑制老年性骨质流失.....	34
4.4 雷帕霉素具有调节骨代谢作用.....	36
4.5 雷帕霉素具有抑制骨细胞凋亡作用.....	38
4.6 雷帕霉素具有促进骨细胞自噬作用.....	39
4.7 总结.....	41
<b>全文小结.....</b>	<b>42</b>
<b>创新点.....</b>	<b>43</b>
<b>展 望.....</b>	<b>43</b>
<b>参 考 文 献.....</b>	<b>44</b>
<b>硕士期间参与发表的文章.....</b>	<b>51</b>
<b>致 谢.....</b>	<b>52</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	3
<b>Chapter One Introduction</b> .....	5
<b>1.1 General clinical research introduction of senile osteoporosis</b> .....	5
1.1.1 Classification, epidemiology and diagnosis of osteoporosis .....	5
1.1.2 Epidemiology of osteoporotic fracture .....	6
1.1.3 Advances in Clinical treatment of osteoporosis.....	6
<b>1.2 Developments in senile osteoporosis research</b> .....	7
1.2.1 Bone remodeling.....	7
1.2.2 Function of osteocyte.....	9
1.2.3 Progress of autophagy in research of osteoporosis .....	10
<b>1.3 Progress in research of rapamycin</b> .....	11
<b>1.4 Content and meaning of the study</b> .....	13
1.4.1 Research content .....	13
1.4.2 Science meaning .....	13
<b>Chapter Two Materials and Methods</b> .....	14
<b>2.1 Materials</b> .....	14
2.1.1 Animals in the study.....	14
2.1.2 Grouping and drug intervention.....	14
2.1.3 Specimen preparation.....	14
2.1.4 The main reagent.....	16
2.1.5 The main reagent configuration .....	17
2.1.6 Primary instrument.....	18
<b>2.2 Methods</b> .....	19
2.2.1 Micro-CT measurement .....	19
2.2.2 Fluorochrome double labelin .....	19

2.2.3 TRAP staining .....	19
2.2.4 Blood measure .....	20
2.2.5 Real time PCR.....	20
2.2.6 Western blot .....	21
2.2.7 Immunohistochemistry .....	22
2.2.8 TUNEL .....	22
2.2.9 Statistical analysis .....	23
<b>Chapter Three Results and analysis .....</b>	<b>24</b>
3.1 Rapamycin inhibits age-related bone loss.....	24
3.2 Rapamycin modulates bone remodeling.....	26
3.3 Rapamycin reduces the prevalence of osteocyte apoptosis .....	29
3.4 Rapamycin induces osteocyte autophagy.....	31
<b>Chapter Four Discussion .....</b>	<b>33</b>
4.1 Animal model of senile osteoporosis .....	33
4.2 The appliance of Micro-CT in osteoporosis.....	33
4.3 Rapamycin have a protective effect on age-related bone loss .....	34
4.4 Rapamycin have an effect on regulating bone remodeling .....	36
4.5 The effect of rapamycin on reducing osteocyte apoptosis .....	38
4.6 The effect of rapamycin on inducing osteocyte autophagy .....	39
4.7 Summary.....	41
<b>Conclusions .....</b>	<b>42</b>
<b>Innovation points .....</b>	<b>43</b>
<b>Lookings .....</b>	<b>43</b>
<b>References.....</b>	<b>44</b>
<b>Publications.....</b>	<b>51</b>
<b>Acknowledgements.....</b>	<b>52</b>



## 摘要

**背景：**老年性骨质疏松症患者人数逐年攀升，已成为严重的公共卫生问题。最新研究表明：骨细胞通过调节成骨细胞和破骨细胞的功能，从而主导骨重建。随着年龄增长，骨细胞凋亡增加，数目减少，导致骨代谢紊乱。细胞自噬是一种重要的生理机制，可以协助维持骨细胞活性。研究表明，因年龄增加而导致的骨细胞自噬功能障碍与老年性骨质疏松症的发病密切相关。因此，本课题以骨细胞自噬为切入点，选取经典的自噬诱导剂雷帕霉素，探究其对于老年性骨质疏松症的作用及可能机制。

**方法：**将 52 只 24 月龄 SD 大鼠随机分为雷帕霉素组和对照组，分别给予雷帕霉素（1 mg/kg weight/day）和等量 DMSO 腹腔注射 12 周后处死大鼠。采用 Micro-CT 检测大鼠腰椎和胫骨近端骨密度和骨微结构，骨组织双荧光标记检测 MAR，TRAP 染色检测破骨细胞。利用 ELISA 检测血清中骨钙素和 Tracp 5b 水平用来评价骨代谢。采用 TUNEL 染色评价骨细胞凋亡。通过免疫组织化学法、Western blot、q-PCR 等方法检测骨细胞自噬标记物表达水平。

**结果：**Micro-CT 结果显示：雷帕霉素组大鼠腰椎和胫骨近端 BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N 均明显高于对照组大鼠，而 Tb.Sp 则低于对照组大鼠。结果表明雷帕霉素能够增加老年大鼠骨密度，改善其骨微结构。除此之外，雷帕霉素能够增加 MAR，减少破骨细胞数量，并且雷帕霉素组大鼠血清中骨钙素水平高于对照组，而 Tracp 5b 水平则低于对照组。结果表明雷帕霉素能够促进骨形成、抑制骨吸收。TUNEL 染色结果显示：雷帕霉素组大鼠凋亡骨细胞数目明显少于对照组，同时 q-PCR 和 Western blot 检测结果显示：雷帕霉素可以上调老年大鼠中抗凋亡基因和蛋白的表达水平，下调凋亡标记基因和蛋白的表达水平；以上结果表明雷帕霉素对于骨细胞凋亡具有抑制作用。进一步研究发现雷帕霉素干预 12 周后可以上调老年大鼠骨细胞中 LC3、ULK1 和 Beclin-1 的基因和蛋白表达水平，并且能够使骨细胞中 LC3-II/LC3-I 蛋白比值增加，SQSTM1/p62 蛋白表达减少。结果表明雷帕霉素能够促进骨细胞自噬水平。

**结论：**本课题研究发现雷帕霉素能够减少老年大鼠的骨质流失，同时可以改

善骨代谢。而其作用机制可能是通过促进骨细胞自噬，维持其细胞活性，进而使骨细胞发挥正常的调节骨代谢作用。

**关键词：**雷帕霉素；老年性骨质疏松症；自噬

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

**Introduction:** Senile osteoporosis is a serious public health issue since its association with high prevalence. Recent studies have showed that osteocyte is the orchestrator of bone remodeling through coordinating the functions of osteoblasts and osteoclasts. There is a marked decline in osteocyte number accompanied by an increase in osteocyte apoptosis with age, which cause bone metabolism disorder. Autophagy is an important physical process that is essential for osteocyte homeostasis. Recent studies have showed that compromised autophagy function in osteocyte with age might contribute to the development of senile osteoporosis. In this study, as the breakthrough point with osteocyte autophagy, we study the effect and mechanism of rapamycin, one activator of autophagy, on senile osteoporosis.

**Methods:** The fifty-two 24-month-old male SD rats were randomly divided into two groups. Rapamycin (1 mg/kg weight/day) or DMSO vehicle control was administered intraperitoneally for 12 weeks. BMD and bone microstructure were determined by Micro-CT. Fluorochrome labeling of the bones was performed to measure the mineral apposition rate (MAR). TRAP staining was performed to evaluate osteoclast number. The serum levels of osteocalcin and Tracp 5b were also analyzed by ELISA to evaluate bone turnover. TUNEL was used to determine the prevalence of osteocyte apoptosis. The effects of rapamycin on osteocyte autophagy were determined by immunohistochemistry, Western blot, and q-PCR.

**Results:** Micro-CT evaluation demonstrated that rapamycin-treated rats had higher BMD, BV/TV, Tb.Th, Tb.N and lower Tb.Sp compared with the control group. The Micro-CT results showed rapamycin was able to increase the BMD and improve the bone microstructure of elder rats. Besides, rapamycin resulted in an obvious increase of MAR and a decrease of osteoclast number in contrast to the control group. A significantly higher level of serum osteocalcin and lower level of Tracp 5b were observed in the rapamycin-treated rats. The results demonstrated that rapamycin has

the ability of stimulating bone formation and inhibiting bone resorption. Rats treated with rapamycin exhibited decreased apoptosis of osteocyte determined by TUNEL. We also found that rapamycin can upregulate the expression of antiapoptotic gene and protein accompanying with downregulating the expression of bio-markers of apoptosis mRNA and protein. All the results revealed that rapamycin had a protective effect on age-related osteocyte apoptosis. The expression of LC3、ULK1、Beclin-1 mRNA and protein in the rapamycin-treated rats were also higher than control group. Moreover, rapamycin also stimulated the ratio of LC3-II to LC3-I and reduced the expression of the SQSTM1/p62, confirmed by Western blot. These results suggested that rapamycin was able to activate osteocyte autophagy.

**Conclusion:** In the current study, we found that rapamycin not only had a protective effect on age-related bone loss but also improve bone metabolism. The functions of rapamycin were exhibited by reserving osteocyte viability through inducing osteocyte autophagy, thereby regulating bone remodeling.

**Keywords:** Rapamycin; senile osteoporosis; autophagy.

## 第一章 前言

### 1.1 老年性骨质疏松症临床研究概况

#### 1.1.1 骨质疏松症分类、流行病学及诊断

骨质疏松症（Osteoporosis, OP）是一种以骨量低下，骨微结构破坏，导致骨脆性增加，易发生骨折为特征的全身性骨病。骨质疏松起病隐匿，无明显症状，目前确诊主要靠骨密度检测。骨质疏松主要分为原发性骨质疏松和继发性骨质疏松两大类。其中原发性骨质疏松又分为特发性骨质疏松、绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松。其中，随着全球老龄化进程的加速，老年性骨质疏松患病人数与日俱增。

2013 年统计，骨质疏松症在欧盟的患病人数为 2750 万，其中 50 岁以上的女性骨质疏松患病率为 22.1%，男性为 5.5%，而 80 岁以上的老年男性骨质疏松患病率则增为 16.6%<sup>[1]</sup>。在美国，50 岁以上的骨质疏松患者有 100 万<sup>[2]</sup>。而我国，作为世界上人口最多的国家，50 岁以上的骨质疏松患者有将近 7000 万<sup>[3]</sup>，且随着我国人口老龄化进程的加速，骨质疏松患病人数仍在不断提高。

骨质疏松症起病隐匿，无明显症状，临床上缺乏较为理想的针对骨骼的评价标准。对于骨骼全面的评价包括骨强度和骨结构两个方面。其中骨密度（bone mineral density, BMD）是反应骨强度的一个重要指标，也是目前临床上用于骨质疏松诊断、药物效果评价、病程监测最重要的指标<sup>[4]</sup>。BMD 是指单位体积上的骨质量，单位为  $\text{g}/\text{cm}^3$ 。目前，BMD 检测方法众多，最常用也是结果被公认的是双能 X 线吸收测定法（dual energy x-ray absorptiometry, DXA）。原理是基于 X 线对于钙组织的高敏感性，而骨骼又是体内最主要的钙源。临床上对于骨质疏松症的诊断也是基于 DXA 测量的骨密度结果判定的。骨密度结果最常使用 T 值表示，其中 T 值是指所测定个体的骨密度值和测定个体所属同种人群的平均值的差值结果与正常成人骨密度标准差的比值。而世界卫生组织对于骨质疏松症的诊断标准为  $T \text{ 值} \leq -2.5$ ，当  $-2.5 < T \text{ 值} \leq -1.0$  则定义为骨量减少<sup>[5]</sup>。

### 1.1.2 骨质疏松性骨折的流行病学

骨质疏松症早期无明显症状，后期可出现疼痛、脊柱畸形和骨折。骨质疏松相关的脆性骨折是其最严重的并发症，即在受到轻微创伤或日常活动中发生的骨折。骨折多发于髋关节、腰椎和腕关节。在美国，50 岁以上人群中骨质疏松性骨折的发病率为 15.7%，这一数据在欧洲为 34.8%。全球每年因骨质疏松导致的脆性骨折有 89 万人，平均每小时就会有 1000 人发生脆性骨折<sup>[6]</sup>。而在中国，骨质疏松性骨折在女性一生当中的发病风险高达 40%，高于乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌的发病风险总和，而男性这一数字为 13%，高于前列腺癌的发病风险，且随着年龄增加，骨折发生风险也随之增加<sup>[3]</sup>。其中髋部骨折在骨质疏松性骨折中最常见，据世界卫生组织预测，到 2050 年，50 岁以上的老年人髋部骨折的患病人数将达到 70 万人<sup>[2]</sup>。除此之外，髋部骨折也是危害最严重的骨质疏松性骨折，患者 1 年内死亡率高达 20%。在美国，每年用于骨质疏松的直接费用多达 200 亿美元<sup>[7]</sup>，而与骨质疏松性骨折相关的治疗费用则更多。在欧洲，每例髋部骨折患者的治疗费用约为 9000 欧元，在新加坡为 7500 美元，在我国则约为 27000 元人民币<sup>[8-10]</sup>。尽管医疗花费巨大，在欧洲每年仍有 43000 人死于骨质疏松性骨折<sup>[1]</sup>。

随着我国逐步进入老龄化社会，老年性骨质疏松的患病人数不断增加，同时骨质疏松性骨折具有医疗花费巨大、致残率和致死率高等特点，给患者及其家庭造成了严重的经济负担。同时对于社会健康保障体系也是一个巨大的负担。

### 1.1.3 骨质疏松症治疗进展

目前临床上治疗骨质疏松的药物主要分为两类，分别为抑制骨吸收类和促进骨形成类。尽管作用机制不同，但是理想的抗骨质疏松药物应当服用安全，并且能够降低骨质疏松患者骨折发生率。临床上应用的抑制骨吸收类抗骨质疏松药物主要有雌激素、选择性雌激素受体调节剂、双磷酸盐和降钙素等药物。而促进骨形成的药物则相对较少，包括甲状旁腺激素、活性维生素 D、锶剂。随着骨质疏松症患者人数的增加及危害的严重性，抗骨质疏松药物的研发工作获得了极大的关注，并取得了一系列研究成果。狄诺塞麦（Denosumab）是一种对核因子  $\kappa$ B 受体活化素的配体（Receptor activator of NF $\kappa$ B ligand, RANKL）具有高敏感性和高特异性的单克隆抗体。RANKL 是破骨细胞形成过程中重要的细胞因子，

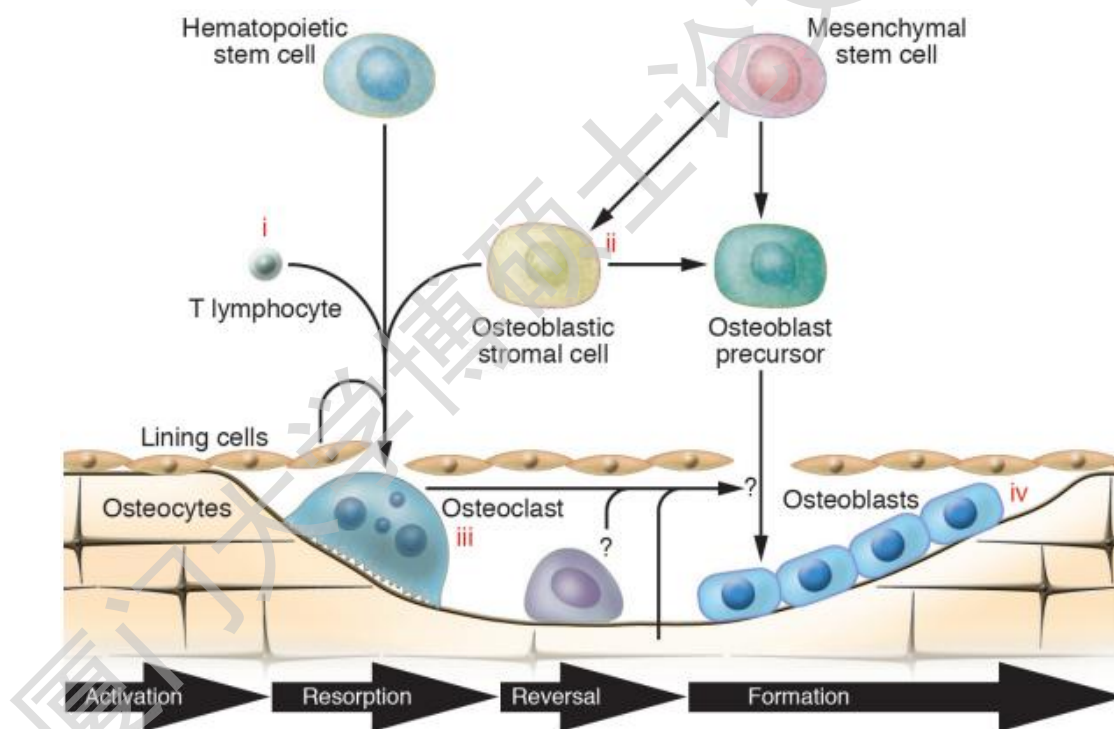
狄诺塞麦通过特异性与 RANKL 结合，从而抑制破骨细胞生成，进而达到抑制骨吸收，减少骨质流失的药理作用。在一项 3 期临床随机对照研究中发现，给予狄诺塞麦治疗 3 年后，可使骨质疏松患者腰椎骨折发生率减少 68%，髌部骨折发生率减少 40%<sup>[11]</sup>。而狄诺塞麦也已经被美国和欧盟批准用于骨质疏松症的临床治疗。组织蛋白酶 K (cathepsin K) 在骨降解过程中发挥着重要的作用，因此，cathepsin K 抑制剂为骨质疏松症的治疗提供了另一个思路。奥当卡替 (Odanacatib) 是目前正在进行临床试验的高特异性的 cathepsin K 抑制剂。1 期临床试验结果表明，奥当卡替可以使骨吸收标记物 I 型胶原羧基末端肽 (C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX) 减少 82%。而进一步的 2 期临床试验则表明奥当卡替治疗 24 个月后可以使腰椎和髌部骨密度分别增加 5.7% 和 4.1%<sup>[12]</sup>。而奥当卡替对于骨折风险的影响则尚需进一步的临床研究。Wnt 信号通路对于成骨细胞的分化和成熟至关重要，而硬骨素 (sclerostin) 是机体内生成的抑制 Wnt 信号通路的物质，能够抑制成骨细胞的骨形成作用。2 期临床试验结果表明，皮下注射硬骨素的特异性抗体 1 年，可以使绝经后骨质疏松患者腰椎骨密度增加 17.7%，使髌部骨密度增加 6.2%<sup>[13]</sup>。

## 1.2 老年性骨质疏松症研究进展

### 1.2.1 骨重建

骨骼是一个动态器官，一生之中都在不停的进行着自我更新，即骨重建。骨重建是由负责去除旧骨的破骨细胞和形成新骨的成骨细胞在骨重建单元 (BMUs) 上协同完成的 (图 1)<sup>[14]</sup>。破骨细胞是起源于造血干细胞的多核巨细胞，通过其特殊的皱褶缘结构附着在需要去除的骨表面，形成一个相对密闭的环境，通过向其中释放一些 cathepsin K 等物质使局部骨质酸化、去矿化，最终达到降解骨质作用<sup>[15]</sup>。成骨细胞起源骨髓间充质干细胞，具有形成新的类骨质和促进骨矿化的作用<sup>[16]</sup>。骨重建是一个序贯的、动态的整体过程，主要包括：1、破骨细胞去除旧骨；2、成骨细胞生成类骨质；3、骨质矿化。研究表明：30 岁之前骨吸收和骨形成是一个动态平衡的代谢过程，保持骨骼正常的新陈代谢。随着年龄增加，骨吸收强度相对于骨形成逐渐增强，最终引起骨质流失<sup>[17]</sup>。针对老年性骨质疏松的发病机制研究众多，性激素水平下降、钙离子和维生素 D 水

平不足、甲状旁腺激素水平升高、运动减少等因素均被证明与老年性骨质疏松有关。研究表明在老年人中，雌激素水平下降引起 RANKL 水平增高，从而促进破骨细胞生成，导致骨吸收相对骨形成作用增强，最终引起骨质流失<sup>[18]</sup>。众所周知，由于日照不足、机体自身合成维生素 D 减少等原因，老年人中普遍患有维生素 D 不足，而维生素 D 不足会继发引起甲状旁腺激素水平升高，而这会进一步加强破骨细胞活动，导致骨吸收强度加大，引起骨量减少<sup>[19]</sup>。尽管运动与骨骼之间的关系尚未研究明确，但是流行病学研究表明，加强运动确实能够减少骨质流失的发生率<sup>[20]</sup>。随着分子生物细胞学的发展，老年性骨质疏松的发病机制研究也在不断深入，其中骨组织，尤其是骨细胞自身随着年龄变化对于骨质流失的作用研究逐渐成为焦点。

图 1 骨重建<sup>[14]</sup>Fig. 1 Bone remodeling on the BMU<sup>[14]</sup>



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.