

2 型糖尿病雌性大鼠骨代谢的特点

刘亚平 季虹 荣海钦 张丽萍 赵新波 邱占军

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)01-0035-04

摘要:目的 研究 2 型糖尿病雌性大鼠骨密度和骨生物力学等指标的变化及各指标间的相互关系。方法 采用高糖高脂饮食加腹腔注射小剂量链脲佐菌素诱导建立 2 型糖尿病大鼠模型。20 周后处死大鼠,测定股骨和腰椎骨密度(BMD)、骨灰干重比、骨生物力学以及骨代谢相关指标[血清 Ca、骨钙素(BGP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、尿 Ca/肌酐比值、尿羟脯氨酸/肌酐比值],此外还观察了空腹血糖(FPG)、GHbA_{1c}、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、血清胰岛素(FINS)、胰岛素样生长因子(IGF)-I 等变化。结果 与正常组相比(1)糖尿病大鼠腰椎和股骨 BMD、灰干重比、生物力学指标显著降低(2)FPG、FINS 及 HOMA-IR 均显著升高,说明存在胰岛素抵抗(3)血清 TRAP、TG、TC、LDL-C、GHbA_{1c} 升高,血清 BGP、IGF-I、HDL-C 降低,差异均有显著性(4)BGP 与股骨 BMD 成显著正相关。结论 高糖高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素注射,可成功建立 2 型糖尿病雌性大鼠模型。该模型大鼠具有高血糖、脂质代谢紊乱和胰岛素抵抗特点。2 型糖尿病大鼠骨吸收加快而骨形成不足,导致其骨量下降和骨生物力学特性改变。

关键词: 2 型糖尿病;大鼠;骨组织;骨密度;生物力学

Changes of bone mineral density and bone biomechanics in type 2 diabetic model of female rats LIU

Yaping, JI Hong, RONG Haiqin, et al. Shandong Endocrine and Diabetes Institute, Jinan 250062, China

Abstract: **Objective** To study the changes on bone metabolic characteristics, bone mineral density (BMD) and bone biomechanics in type 2 diabetic model of female rats, and investigate the relationships between these indexes.

Methods Type 2 diabetic model of rats was set up by feeding high-glucose-high-fat diet and by injecting intraperitoneally with a low-dose streptozotocin (STZ). All rats were sacrificed after 20 weeks. The BMD of femora and lumbar vertebra, the ratio of ash weight to dry weight, the biomechanical parameters and the bone metabolic related indexes, such as serum Ca, BGP, TRAP, urinary calcium/creatinine (Ca/Cr), urinary hydroxyproline/creatinine (HYP/Cr), and fasting blood glucose, GHbA_{1c}, TG, TC, HDL-C, LDL-C, fasting serum insulin, IGF-I were measured. **Results** Compared with normal control group, the BMD of femora and lumbar vertebra, the ratio of ash weight to dry weight and the bone biomechanical indexes of type 2 diabetic rats decreased rapidly. Insulin resistance was induced in rats of type 2 diabetes mellitus as the level of FPG, FINS, HOMA-IR markedly increased. Serum concentrations of TRAP, TG, TC, LDL-C, GHbA_{1c} markedly increased, and BGP, IGF-I, HDL-C decreased. There were even significant differences. BMD of femora showed a positive correlation with BGP strongly. **Conclusions** The rat model of type 2 diabetes mellitus which is similar to human type 2 diabetes mellitus is induced by feeding high-glucose-high-fat diet and by intraperitoneal injection with a low-dose STZ. This rat model is characterized by moderate hyperglycemia, lipid disorder and insulin resistance. The Bone resorption was accelerated and the formation decreased in this type 2 diabetic model rats, which consequently resulted in the descending bone mass and the changes of the bone biomechanical properties.

Key words: Type 2 diabetes mellitus; Rats; Bones; Bone density; Biomechanics

作者单位: 250062 济南, 山东省医学科学院在读硕士研究生
(刘亚平), 山东省内分泌与代谢病研究所(季虹、荣海钦、张丽萍、赵新波、邱占军)

通讯作者: 荣海钦, Email: haiqinrong@126.com

2 型糖尿病是多基因和环境因素共同作用引起, 可导致骨代谢紊乱甚至骨质疏松。观察者大多研究雄性糖尿病大鼠和去卵巢大鼠的骨代谢情况, 而关于雌性糖尿病大鼠的报道偏少。本实验采用高糖高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素腹腔注射建立雌

性大鼠 2 型糖尿病模型 ,从骨密度和生物力学两方面观察其骨代谢紊乱程度。

1 材料和方法

1.1 材料

3 月龄健康雌性 Wistar 大鼠 30 只(山东大学实验动物中心提供 ,合格证号 :SCXR(鲁)20030004) ,平均体重(279.61 ± 9.56) g。普通饲料和高糖高脂饲料(普通饲料中添加 10% 猪油、10% 蛋黄粉和 20% 蔗糖)^[1]均由山东大学实验动物中心提供。链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司 ,临用前以 0.1 mmol/L ,pH4.2 的柠檬酸盐缓冲液溶解 ,新鲜配成 2% STZ 溶液 ,经滤菌器除菌。

1.2 方法

1.2.1 造模 :实验前大鼠适应性喂养 1 周 ,按体重编号 ,随机取 6 只作正常对照组 ,喂以普通饲料。余 24 只大鼠作糖尿病造模组 ,高糖高脂饲料喂养 8 周(不限每日热量) ,禁食 12 h 后左下腹腔注射 STZ(30 mg/kg ,隔两周 1 次 ,共两次) ,正常对照组注射等量柠檬酸盐缓冲液。末次 STZ 注射 1 周后糖尿病造模组尾静脉行腹腔内葡萄糖耐量试验^[2]。以空腹血糖(FPG) ≥ 7.0 mmol/L ,或糖负荷后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L 者为糖尿病造模成功鼠^[3]。

1.2.2 观察指标 :成模后所有大鼠每周固定时间测随机血糖和体重 ,共观察 20 周。实验结束时 ,大鼠空腹 8 h 后颈动脉穿刺取血处死。分离血清以检测 Ca、FPG、甘油三脂(TG)、总胆固醇(TC)、HDL-C、LDL-C 以及尿 Ca(比色法 ,日立 7180 全自动生化分析仪) ;血清胰岛素、骨钙素(BGP)、胰岛素样生长因子(IGF)-I(放免法 ,天津九鼎) ;血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、抗凝血糖化血红蛋白(GHb)A1c、尿肌酐、尿羟脯氨酸(比色法 ,南京建成生物工程研究所) ,完整离断腰椎(L₁ ~ L₆)和左侧股骨 ,仔细剥离

软组织 ,用生理盐水浸湿的纱布包裹 , - 20 ℃ 保存 ,备做 BMD 测量、腰椎压缩和股骨三点弯曲试验。折断后的股骨 ,用生理盐水冲去骨髓 ,置于箱式恒温干燥箱 80 ℃ 干烤 2 h ,称重为骨干重。称重后再次将股骨置于箱式电阻炉 600 ℃ 灰化 6 h ,测定骨灰重。计算灰干重比。

1.2.3 仪器设备 :BMD 的测量选用美国 Norland 公司产 pDEXA 型 BMD 仪(附带小动物扫描软件) ,仪器测定质控体模的长期变异系数(CV)在 0.29% ~ 0.35% 之间 ,扫描速度 10 mm/s ,扫描宽度 6 cm ,扫描间 0.5 mm × 0.5 mm ,测 3 次 ,取平均值。腰椎压缩和股骨三点弯曲试验采用 AG-1S 日本岛津万能材料试验机 ,试验仪载荷测量精度 0.01 N ,位移测量精度 0.001 mm ,加载速度 2 mm/min ,跨距 20 mm。

1.3 统计学处理

计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。灰干重比、BMD、骨生物力学、BGP 进行相关分析。所有数据应用 SPSS 13.0 统计软件进行处理分析。差异显著性水平为双尾 0.05。

2 结果

2.1 大鼠体重和随机血糖的变化

剔出因感染死亡和造模未成功的大鼠 ,入选糖尿病组大鼠为 12 只。与普通饲料喂养的正常组大鼠比较 ,糖尿病组大鼠高脂饮食 8 周后体重明显增加(*P* < 0.01) ,增重 8%。注射 STZ 后 ,糖尿病组体重迅速下降 ,第 4 周降到最低点 ,此后体重渐回升 ,最终在一定范围内稳定 ,但至实验结束时 ,体重仍未达到 STZ 注射前的水平 ,单纯高脂饮食 8 周 ,两组大鼠血糖没有显著性差异 ,注射两次 STZ 1 周后糖尿病组大鼠血糖明显升高并且高血糖症持续存在 ,见表 1。

表 1 STZ 注射前后两组大鼠随机血糖的变化 (mmol/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数 (只)	注射 STZ 前		注射 STZ 后		
		0 周	8 周	1 周	10 周	20 周
正常组	6	4.92 ± 0.40	4.63 ± 0.41	4.60 ± 0.36	5.50 ± 0.46	5.21 ± 0.31
糖尿病组	12	5.08 ± 0.61	5.23 ± 0.47	15.17 ± 3.07**	16.23 ± 6.04**	17.78 ± 7.98**

注 :与正常对照组比较 * *P* < 0.05 ,** *P* < 0.01

2.2 大鼠胰岛素及胰岛素抵抗的变化

两组大鼠空腹血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)见表 2。公式计算如下 :HOMA - IR = FPG × FINS/22.5。与正常组比较 ,糖尿病组大鼠 FPG、FINS 及 HOMA-IR 均升高 ,差异有显著性(*P* < 0.01) ,说明存在胰岛素抵抗。

表 2 两组大鼠空腹血糖、血清胰岛素和 HOMA-IR 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数(只)	FPG (mmol/L)	FINS (μIU/ml)	HOMA-IR
正常组	6	5.27 ± 0.29	9.12 ± 0.96	2.56 ± 0.53
糖尿病组	12	8.63 ± 0.81**	13.01 ± 1.54**	6.10 ± 2.41**

注 :与正常对照组比较 * *P* < 0.05 ,** *P* < 0.01

2.3 两组大鼠骨灰干重比、腰椎(L₁ ~ L₆)和股骨 BMD 的变化

糖尿病组骨灰干重比、腰椎和股骨 BMD 均较正常组降低 ,尤其灰干重比、腰椎(L₃、L₅)和股骨 BMD 降低明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,见表 3。

表 3 两组大鼠骨灰重/干重、腰椎(L₁ ~ L₆)和股骨 BMD 的变化(g/cm² $\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数 (只)	灰干重比	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	股骨
正常组	6	0.521 ± 0.021	0.156 ± 0.020	0.155 ± 0.015	0.156 ± 0.010	0.139 ± 0.016	0.135 ± 0.015	0.128 ± 0.012	0.206 ± 0.027
糖尿病组	12	0.489 ± 0.018**	0.142 ± 0.021	0.142 ± 0.019	0.136 ± 0.017*	0.127 ± 0.016	0.116 ± 0.013*	0.113 ± 0.017	0.173 ± 0.019**

注 :与正常对照组比较 * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 4 两组大鼠腰椎(L₅)压缩和股骨三点弯曲试验的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数 (只)	股骨三点弯曲试验					腰椎压缩试验	
		最大载荷 (N)	弹性载荷 (N)	截面惯性矩 (mm ⁴)	弹性模量 (Gpa)	最大弯曲应力 (MPa)	最大载荷 (N)	弹性模量 (MPa)
正常组	6	182.41 ± 33.61	148.35 ± 11.13	7.77 ± 1.88	10.64 ± 1.85	218.23 ± 26.34	203.37 ± 17.65	82.64 ± 8.25
糖尿病组	12	126.78 ± 20.32**	99.09 ± 19.66**	5.66 ± 1.39*	8.13 ± 1.75*	192.52 ± 23.03*	149.10 ± 47.20**	61.96 ± 16.75*

注 :与正常对照组比较 * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.5 两组大鼠血尿生化指标及有关细胞因子的测定结果

糖尿病组大鼠血清 Ca 低于正常组 ,尿 Ca/肌酐、尿 HYP/肌酐高于正常组 ,但没有统计学意义 ,而血清 TRAP、TG、TC、GHbA1c、LDL-C 高于正常组 ,血清 BGP、IGF-Ⅰ、HDL-C 低于正常组 ,差异均有显著性($P < 0.01$) ,见表 5。

表 5 两组大鼠骨代谢相关生化指标和细胞因子的变化($\bar{x} \pm s$)

观察指标	糖尿病组	正常组
血清 Ca(mmol/L)	2.54 ± 0.13	2.56 ± 0.12
TRAP(g)	15.87 ± 3.59*	8.64 ± 2.83
TG(mmol/L)	1.33 ± 0.24*	0.91 ± 0.16
TC(mmol/L)	1.78 ± 0.20*	1.42 ± 0.15
HDL-C(mmol/L)	0.87 ± 0.10*	1.11 ± 0.17
LDL-C(mmol/L)	0.12 ± 0.04*	0.04 ± 0.02
GHbA1c(每 10gHb 吸光度)	92.46 ± 13.66*	57.13 ± 4.44
尿 Ca/肌酐	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001
尿 HYP/肌酐	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.003
BGP(μ g/L)	5.43 ± 0.75*	7.14 ± 0.70
IGF-Ⅰ(ng/ml)	361.90 ± 46.17*	441.44 ± 36.48

注 :与正常对照组比较 * $P < 0.01$

2.6 大鼠骨灰干重比、骨 BMD、骨生物力学指标和 BGP 间的相关关系

灰干重比与 L₅ BMD、股骨弹性模量、腰椎最大载荷成显著正相关(r 分别为 0.494、0.535、0.554 , $P < 0.05$) ,而与股骨 BMD 无显著相关性($r = 0.315$, $P < 0.05$)。股骨最大弯曲应力和股骨弹性模量成显著正相关($r = 0.788$, $P < 0.001$)。股骨 BMD 与股骨弹性模量、腰椎最大载荷成显著正相关(r 分别为

2.4 两组大鼠骨生物力学指标的变化

糖尿病组大鼠股骨最大载荷、弹性载荷、截面惯性矩、弹性模量、最大弯曲应力、腰椎最大载荷、弹性模量均低于正常组 ,有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ,见表 4。

0.492、0.494 , $P < 0.05$)。BGP 与股骨 BMD 成正相关($r = 0.597$, $P < 0.01$)。

3 讨论

本实验对以往的研究方法改良^[1 3 4] ,采用高糖高脂饲料喂养结合腹腔两次小剂量 STZ 注射的方法诱导建立雌性大鼠 2 型糖尿病模型 ,结果该模型大鼠的血糖、GHbA1c 升高 ,血清空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数升高 ,并具有脂代谢紊乱的特点 ,比较接近人类 2 型糖尿病的发病特征 ,是研究人类 2 型糖尿病较理想的动物模型。该模型糖尿病组大鼠 STZ 注射后体重较正常组降低 ,直至实验结束 ,仍未达到 STZ 注射前的水平 ,这是因为长期高糖高脂饮食诱导产生胰岛素抵抗 ,STZ 注射后部分破坏大鼠胰腺 β 细胞 ,导致迅速出现高血糖、多尿等代谢紊乱症状 ,致使体重下降。

糖尿病不论 1 型还是 2 型都可以发生程度不同的骨量减少甚至骨质疏松^[5]。1 型糖尿病引起 BMD 下降已较为肯定^[6] ,2 型糖尿病 BMD 的变化仍存在争议 ,可下降^[7]、不变^[8]或增加^[9]。本实验研究结果显示 ,与正常组相比 ,糖尿病组大鼠腰椎和股骨 BMD 显著降低 ,表明本实验中糖尿病大鼠存在明显骨量低下。骨骼经干燥、煅烧后 ,有机质被去除 ,灰重中仅含无机质成分 ,因此灰干重比反映骨组织中无机质含量。本实验糖尿病组骨无机质含量相对较少 ,与 BMD 的变化相一致 ,也说明该糖尿病大鼠存在骨量减少。

骨生物力学特征是反映骨质量的重要指标,力学性能降低常导致骨折发生率升高^[10]。腰椎最大载荷直接反映松质骨的骨质、结构连续性和皮质骨的强度,是对骨质量的综合反映^[11]。弹性模量用以测量骨组织的内在硬度,主要反映了骨组织的材料特性。股骨最大弯曲应力反映骨组织的抗压缩能力。本实验糖尿病组腰椎最大载荷、股骨弹性模量、最大弯曲应力显著低于正常组,说明骨组织强度、硬度、抗压缩能力降低,与 BMD 的变化一致。从相关分析看,股骨 BMD 与股骨弹性模量、腰椎最大载荷成显著正相关,说明 BMD 下降不仅代表骨量的减少,同时对骨的抗压缩性和硬度有着良好的预测能力。但是 BMD 未将骨的结构和生物力学特性纳入其内,不能全面地从骨的大小、外形、质地等方面反映骨组织抵抗骨折的能力,其精确性和全面性受到限制。骨质量从骨的微结构、基质矿化、骨转换等骨力学特性方面弥补 BMD 单纯衡量骨量的不足^[12],因此可以从骨量和骨质量两方面综合评价骨质疏松。但关于骨密度与力学指标之间的相关性,国内外报道不一致,尚需进一步研究^[13]。本实验可进一步行四环素标记观察骨小梁表面的激活频率,通过骨组织形态计量学从微观角度来验证骨密度及生物力学得到的结论。

BCP 完全来自成骨细胞,是反映骨代谢情况的生化指标,能够反映整体的骨丢失情况,因而其血清水平能反映全部骨形成和骨转换情况,特异性较高。与正常组相比,本实验糖尿病组 BCP 显著降低,与股骨 BMD 呈显著正相关,说明糖尿病组骨形成低下。并且糖尿病组血清 TRAP、尿 Ca/肌酐、尿 HYP/肌酐高于对照组,提示骨吸收代谢活跃。IGF-Ⅰ可由成骨细胞产生并以自分泌的方式刺激成骨细胞的复制和骨基质的合成,是骨生成的强刺激因子。本实验 IGF-Ⅰ在糖尿病组显著低于正常组,提示骨基质成熟和转换下降,骨基质分解,钙盐丢失,导致骨代谢紊乱。

【参 考 文 献】

- [1] 李爱卿,王志慧,赵跃斌. 高糖高脂饲料诱导 2 型糖尿病大鼠模型. 临床医药实践杂志, 2005, 14(2): 130-131.
- [2] Vital P, Larrieta E, Hiriart M. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. Journal of Endocrinology, 2006, 190: 425-432.
- [3] 司晓晨,尚文斌,卞慧敏,等. 链脲佐菌素加高脂膳食诱导 2 型糖尿病大鼠模型. 安徽中医临床杂志, 2003, 15(5): 383-385.
- [4] 赵宝珍,白秀平,荣青峰. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的研究. 中国药物与临床, 2002, 12(2): 383-385.
- [5] 刘忠厚. 骨质疏松症. 北京: 化学工业出版社, 1992. 295-305.
- [6] Valerio G, del Puente A, Esposito-del Puente A, et al. The lumbar bone mineral density is affected by long-term poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. J Horm Res, 2002, 58: 266-272.
- [7] Theresa HM, Ann V, Douglas C, et al. Effect of Alendronate on Bone Mineral Density and Biochemical Markers of Bone Turn over in Type 2 Diabetic Women. J Diabetes Care, 2004, 27: 1547-1553.
- [8] Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, et al. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. Diabetes Care, 1999, 22: 1196-1200.
- [9] Hanley DA, Brown JP, Tenenhouse A, et al. Associations among disease conditions, bone mineral density, and prevalent vertebral deformities in men and women 50 years of age and older: cross-sectional results from the Canadian Multicentre Osteoporosis study. J Bone Miner Res, 2003, 18: 784-790.
- [10] Dai RG, Liao EY, Yang C, et al. Microcracks: an alternative index for evaluating bone biomechanical quality. J Bone Miner Metab, 2004, 3: 215-223.
- [11] Bikle DD, Sakata T, Leary C, et al. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. J Bone Miner Res, 2002, 17(9): 1570-1578.
- [12] Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. J Bone, 2006, 39: 1173-1181.
- [13] Jarvinen TL, Kannus P, Pajamaki I, et al. Estrogen deposits extra mineral into bones of female rats in puberty, but simultaneously seems to suppress the responsiveness of female skeleton to mechanical loading. J Bone, 2003, 6: 642-651.

(收稿日期 2007-08-13)