

2 型糖尿病大鼠模型建立及骨密度特点研究

王亮 马远征 曾晓 杨帆 邢清 吕波 柳璐 李平生 廖京辉

中图分类号: R587.1;R-332;R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)05-0331-03

摘要: 目的 探讨 2 型糖尿病与骨质疏松的关系, 为糖尿病并发骨质疏松的发病机理研究提供基础资料。方法 采用高糖高脂饲料结合低剂量链脲佐菌素 (STZ) 成功制备 2 型糖尿病大鼠模型, 同时设立正常对照组, 对两组大鼠行血糖、血清胰岛素、血脂等检测, 同时采用双光能 X 线骨密度仪 (美国 NORLAND) 测定大鼠骨密度, 原子吸收法测定骨钙含量等。结果 与对照组相比, 2 型糖尿病大鼠模型组血糖明显升高, 糖尿病组空腹血糖 (16.81 ± 5.39) mmol/L, 正常组 (4.33 ± 0.17) mmol/L, 糖尿病组对胰岛素的敏感性下降, 具有显著统计学意义, 糖尿病组骨密度为 1.12 ± 0.10 , 正常组 1.71 ± 0.10 , 采用两组间 t 检验, 糖尿病组骨密度较正常对照明显下降, 具有显著统计学意义 ($P < 0.05$); 骨钙、骨密度、骨重明显低于对照组, 差别具有统计学意义, 而且其下降程度与血糖的升高程度呈高度相关性。结论 高血糖导致骨代谢异常, 2 型糖尿病的发生过程中也存在着骨代谢和骨转化的异常, 因此, 早期预防高血糖对于防治骨质疏松具有重要意义。

关键词: 2 型糖尿病; 大鼠模型; 骨密度

Establishing type-2 diabetic rat model and characters of bone mineral density WANG Liang, MA Yuanzheng, ZENG Xiao, et al. Department of Orthopedics, the 309 hospital of PLA, 100091, China

Corresponding author: MA Yuanzheng, Email: myzzxq@sina.com

Abstract: Objective To study the relationship between type 2 diabetes and occurrence of osteoporosis.

Methods Type 2 diabetic rats model was established by the injection of small-dose streptozotocin (STZ) combined with high-energy feeding. Blood glucose, insulin, lipids were detected, and the indexes related to osteoporosis such as bone mineral density, bone weights, and the contents of bone calcium were detected.

Results The blood glucose level of model rats was significantly higher than that of normal control rats, the FBG of diabetic rats is (16.81 ± 5.39) mmol/L, and the FBG of normal control rats is (4.33 ± 0.17) mmol/L, the sensitivity to insulin was decreased, which showed significant statistics meaning. The levels of bone calcium, bone density and bone weights of the diabetic model rats were remarkably decreased compared with those of the control rats. The results also showed that there was strong negative correlation between the level of blood glucose and level of bone calcium, bone density and bone weights. **Conclusion** The disorders in bone metabolism existed in type 2 diabetic model rats and its mechanism may due to the high level of blood glucose. It is significant to control the level of blood glucose to prevent osteoporosis.

Key words: Type-2 diabetic mellitus; Rat model; Bone mineral density

在动物及临床试验中, 糖尿病对骨和矿盐代谢的改变有诸多不同的结果, 糖尿病是否容易并发骨量减少、骨质疏松和骨折等亦有争议。迄今, 公认 1 型糖尿病易发生骨量减少或骨质疏松; 而 2 型糖尿病病人有骨密度正常、增高和降低 3 种不同的报道;

本研究旨在观察高糖高脂饲料加低剂量链脲佐菌素建立的 2 型糖尿病模型骨密度改变, 探讨血糖与骨代谢关系, 为 2 型糖尿病并发骨质疏松的机理研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及造模

取清洁级雌性 SD 大鼠 40 只, 鼠龄 6 个月, 体重 (210 ± 20) g, 由 309 医院动物实验中心提供

作者单位: 100091 北京, 解放军第 309 医院骨内科 (王亮、马远征、曾晓、杨帆、邢清、吕波、柳璐、李平生); 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 (廖京辉)

通讯作者: 马远征, Email: myzzxq@sina.com

SYXK(军)2007-2012,动物单笼喂养。将 40 只大鼠随机分为 2 组,正常对照组 12 只,给予普通饲料喂养,其热量比例为碳水化合物热卡占 60%,脂肪热卡占 10%,蛋白质热卡占 30%。糖尿病组 28 只,给予高糖高脂饲料喂养,其热量及营养成分比例为:碳水化合物热卡占 40%,脂肪热卡占 42%,蛋白热卡占 18%。所有大鼠在 24~28℃,通风良好,湿度 60%~80% 的环境下饲养,自由摄食、饮水。在实验过程中每天观察大鼠进食、饮水、活动等情况并做记录,1 周称体质量 1 次,和测随机血糖 1 次。

1.2 试剂

链脲佐菌素(STZ)美国 SIGMA 公司生产,总胆固醇试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒、甘油三酯试剂盒购于北京中生生物技术股份有限公司,Surestep Life scan 血糖仪及试纸购于美国强生公司。

1.3 指标测定

实验大鼠饲养 2 月后进行血糖、血脂、血清胰岛素测定,由专人用全自动生化仪日立 7600 进行测定,按酶法测定血糖(GLU)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)等。TC、TG 用氧化酶-过氧化酶法测定;HDL-C 采用磷钨沉淀法测定;当 TG 浓度低于 4.5 mmol/L 时,即用 Friedewald 公式 $LDL-C = TC - HDL-C - TG/2.2$ 计算 LDL-C。糖耐量试验:动物禁食 12 h 后,先测定空腹血糖,然后灌胃给予 5 g/kg 体重的葡萄糖溶液,其后 0.5、1 和 2 h 分别采尾静脉血测快速血糖。血清胰岛素水平测定采用放射免疫分析法(中国原子能科学研究院生产的胰岛素放射免疫分析药盒)。

1.4 股骨近端骨密度检测

用 Norland 双光能 X 线骨密度仪检测右侧股骨近端骨密度。

1.5 骨钙测定

将烘干至恒重的右侧股骨,置于三角瓶中进行

消化,采用原子吸收法测定骨钙含量。

1.6 统计学处理

数据采用 SPSS 11.5 软件,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病组 28 只大鼠中有 16 只 1 次性腹腔注射链脲佐菌素 30 mg/kg 后达到成模标准,其中 1 只大鼠在造模 3 周内血糖恢复正常,死亡 5 只,其余造模未成功者淘汰出实验。造模后糖尿病组大鼠出现精神萎靡、皮毛松乱无光泽和多尿、多饮、多食、体质量减轻的“三多一少”表现。两组共进入结果分析 28 只。

2.2 2 型糖尿病大鼠模型糖耐量试验结果

模型动物的空腹血糖值明显高于正常组 ($P < 0.05$),在给予葡萄糖 0.5、1 和 2 h 时的血糖水平模型动物组也显著高于正常对照组。正常对照组和模型组在 1 h 达到高峰,但正常对照组在 2 h 开始下降并接近空腹血糖值,而模型组在 2 h 时仍维持在较高水平,下降缓慢,导致其曲线下面积高于正常对照组 ($P < 0.05$,表 1)。

2.3 2 型糖尿病大鼠模型胰岛素及胰岛素敏感指数的变化

模型组与对照组血清胰岛素水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但胰岛素敏感指数显著低于对照组 (-4.92 ± 0.16 , -6.42 ± 0.45 , $P < 0.05$),差异有统计学意义。

2.4 两组大鼠体重、血糖、血脂的比较

与对照组比较,糖尿病大鼠体重、血糖、甘油三酯增高, $P < 0.05$,差异有统计学意义,高密度脂蛋白胆固醇低于对照组, $P < 0.05$,差异具有显著统计学意义,见表 2。

2.5 两组大鼠骨重、骨密度、骨钙比较;和对照组比较,模型组均显著下降, $P < 0.05$,差异有统计学意

表 1 两组大鼠糖耐量结果 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	空腹 (0 h)	0.5 h	1 h	2 h	曲线下面积
对照组	12	4.33 $\pm$ 0.17	6.15 $\pm$ 0.53	7.24 $\pm$ 0.51	5.83 $\pm$ 0.65	12.50 $\pm$ 0.24
模型组	16	16.81 $\pm$ 5.39*	25.31 $\pm$ 6.99*	27.88 $\pm$ 6.72*	25.79 $\pm$ 6.17*	50.67 $\pm$ 12.09*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$

表 2 两组大鼠体重、血糖和血脂的变化 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

分组	大鼠数	体重 (g)	血糖	TC	TG	HDL-C
对照组	12	271.4 $\pm$ 29.3	5.1 $\pm$ 0.3	1.29 $\pm$ 0.22	0.50 $\pm$ 0.12	0.87 $\pm$ 0.14
模型组	16	223.3 $\pm$ 27.1*	23.4 $\pm$ 5.1*	1.24 $\pm$ 0.30	0.98 $\pm$ 0.62*	0.42 $\pm$ 0.21*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$

表 3 糖尿病模型大鼠与正常大鼠骨质疏松相关指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	大鼠数	骨重(g)	BMD(g/cm ²)	骨长(cm)	骨钙(mg/g)
对照组	12	0.76 ± 0.06	1.71 ± 0.10	3.58 ± 0.07	270.59 ± 6.05
模型组	16	0.65 ± 0.05*	1.12 ± 0.10*	3.55 ± 0.08	248.81 ± 7.32*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$

义,骨长也有下降趋,但差异无统计学意义,见表 3。

2.6 2 型糖尿病大鼠模型血糖、血胰岛素水平与骨质疏松指标相关关系

表 4 显示血糖与骨重,骨密度,骨长,骨钙呈负相关;胰岛素与上述指标无明显相关性。

表 4 模型组血糖和血清胰岛素水平与骨质疏松指标的相关关系

项目	骨重	骨密度	骨长	骨钙
血糖	-0.72	-0.71	-0.61	-0.88
血清胰岛素	0.32	0.39	0.29	0.18

3 讨论

研究显示 2 型糖尿病患者髋骨骨折的危险性增加了 2.1 ~ 2.8 倍^[1-2],这种危险性的增加可归因于骨量减少引起的骨强度降低。

2 型糖尿病是否发生骨质疏松取决于多种因素综合作用的结果。高血糖时,大量葡萄糖从尿液排出,渗透性利尿作用将大量的钙、磷、镁离子排除体外,使其血中浓度降低,引起继发性的甲状旁腺功能亢进,将骨钙动员至血液中,引起骨质疏松症。胰岛素与成骨细胞膜表面的胰岛素受体相结合,促进骨细胞内氨基酸的蓄积,有利于骨胶原合成和核苷酸的形成,糖尿病患者胰岛素缺乏或功能受损,影响骨代谢,进而影响骨的形成和转换。慢性高血糖引起肾功能损害时,影响到 12A 羟化酶的活性,使 1,25 二羟维生素 D₃ 合成减少,影响钙的吸收。糖尿病微血管病变影响骨的血管分布,进而影响骨的重建。有研究认为高糖环境可能导致成骨细胞中肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体和护骨素配体表达增多,护骨素的表达减少,使破骨细胞的活性增加,骨吸收增强,骨量丢失;长期高血糖致糖基化终末产物增加^[3-4],促进白细胞介素 1、白细胞介素 6 等细胞因子的形成,而这些细胞因子已被证实可提高破骨细胞活性,加速骨的吸收,导致骨质疏松症的发生。

早期的动物试验证实 2 型糖尿病大鼠的股骨远端和脊椎骨骨密度明显低于对照组。国内临床研究发现^[5],老年男性 2 型糖尿病患者骨密度显著下降,其骨代谢特点是骨吸收增加,骨形成降低。随着 2 型糖尿病病程延长及大血管、微血管并发症的出现,其骨密度进一步下降。Nicodemus 等^[6]报告绝经后

妇女与非糖尿病者相比较,2 型糖尿病者增加 1.7 倍,骨折发生率随糖尿病的病程延长而升高。美国有关糖尿病心脏研究发现,冠状动脉、颈动脉、腹主动脉粥样斑块与骨密度呈负相关。以上证据均提示 2 型糖尿病可导致骨量减少及骨质疏松发生。

本研究采用高糖高脂饲料结合小剂量链脲佐菌素(STZ)的方法建立 2 型糖尿病大鼠动物模型,并观察骨质疏松相关指标的变化情况,结果显示糖尿病组血糖增高,而胰岛素敏感指数低于对照组,说明模型组动物出现了糖代谢紊乱和胰岛素抵抗,符合 2 型糖尿病的病理生理改变,2 型糖尿病大鼠模型建立成功。对 2 型糖尿病大鼠模型组和正常组的骨密度测量结果显示,模型组骨密度显著低于正常对照组,同时骨重下降显著,模型组骨钙显著低于对照组。进一步对血糖和血清胰岛素与骨质疏松相关指标之间的相关关系进行了分析,结果显示,血糖水平的升高与骨钙和骨密度的下降呈明显的负相关,表明高血糖可以通过降低骨钙水平,进而影响到骨矿化,降低骨密度,从而导致骨量减低。

总之,2 型糖尿病与骨质疏松关系较复杂,有多种因素参与骨质疏松的发生,本研究提示高血糖影响骨代谢,早期控制血糖具有重要意义,而二者之间的发病机制还需要做进一步深入的研究探讨。

【参 考 文 献】

- [1] 饶子亮,赵士海,刘盛来,等. 2 型糖尿病伴随高脂血症大鼠模型的建立及二甲双胍的干预. 实验动物科学, 2009, 26 (1): 15-17.
- [2] 燕娟,郭巍伟,梁执群,等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证. 临床和实验医学杂志, 2009, 8 (4): 5-6.
- [3] Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. Am J Epidemiol, 2007, 166 (5): 495-505.
- [4] Cutrim DM, Pereira FA, de Paula FJ, et al. Lack of relationship between glycemic control and bone mineral density in type 2 diabetes mellitus. Braz J Med Biol Res, 2007, 40 (2): 221-227.
- [5] 刘忠厚. 骨质疏松学. 北京: 中国科学技术出版社, 1998: 199-209.
- [6] Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. Diabetes Care, 2001, 24: 1192-1197.

(收稿日期: 2009-01-14)