

· 论 著 ·

二甲双胍和辛伐他汀联用药对糖尿病大鼠骨密度变化的实验研究

张彬* 黄碧坤 王旭明 王付涛 孟菲 朱连鹏

(河北联合大学口腔医学院正畸科, 唐山 063000)

中图分类号: R783.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)07-0661-04

摘要: 目的 建立糖尿病大鼠动物模型, 观察使用二甲双胍和辛伐他汀对胫骨骨密度的影响, 为临床糖尿病患者种植体修复、正畸治疗提供理论依据。方法 采用空腹一次性注射 STZ 溶液 (40 mg/kg), 注射 STZ 3 天后, 大鼠空腹血糖高于 16.7 mmol, 尿糖 (+++), 视为糖尿病大鼠模型建立成功。建模后, 分正常组, 模型组, 二甲双胍组, 二甲双胍和辛伐他汀联用组, 检测胫骨骨密度。结果 糖尿病大鼠胫骨骨密度低于二甲双胍组低于二甲双胍和辛伐他汀联用组低于正常组 ($P < 0.01$)。结论 糖尿病状态下胫骨骨密度低于正常, 经过治疗后骨密度改善明显, 联用组优于单独使用二甲双胍组。

关键词: 糖尿病; 大鼠; 胫骨; 骨密度 (BMD)

Experimental study of the effect of metformin combined with simvastatin on the change of bone mineral density in diabetic rats

ZHANG Bin, HUANG Bikun, WANG Xuming, WANG Futao, MENG Fei, ZHU Lianpeng

(Department of Orthodontics, School of Stomatology, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

Corresponding author: ZHANG Bin, Email: zhangbin3065@163.com

Abstract: Objective To establish diabetic rat model, to observe the effect of metformin combined with simvastatin on the change of bone mineral density (BMD) of the tibia, in order to provide a theoretical basis for implant treatment and orthodontic treatment for patients with diabetes. **Methods** Fasting rats were given a single injection of STZ solution (40 mg/kg). Three days after the injection, the fasting blood sugar of rats was higher than 16.7 mmol, and urine sugar presented as (+++), indicating that diabetic rat model had been successfully established. After the successful establishment of rat model, rats were divided into normal group, model group, metformin, and metformin combined with simvastatin groups. BMD of the lower tibia was detected. **Results** BMD of the tibia of diabetic rats was lower than that in metformin group, while BMD in metformin group was also lower than that in metformin and simvastatin group, and BMD in normal group was the highest ($P < 0.01$). **Conclusion** BMD of the tibia under diabetic status is lower than that in normal state. BMD is improved significantly after the treatment, and the effect of metformin and simvastatin is superior to that of metformin.

Key words: Diabetes; Rats; Tibia; Bone mineral density (BMD)

糖尿病是常见的内分泌疾病, 高血糖可抑制造骨细胞分化, 使骨基质合成减少, 并改变甲状旁腺激素对钙、磷代谢的调节, 可引起钙的吸收障碍, 使骨钙含量降低。血糖控制不良是糖尿病骨量减少的因素之一, 临床上有多种药可以控制血糖, 但既可以控

制高血糖又可以增强骨密度 (Bone Mineral Density, BMD) 的药物, 目前国内外报道比较少见。本课题建立糖尿病大鼠动物模型, 探讨二甲双胍和辛伐他汀联合用药对其血糖、血脂和骨密度的影响, 为糖尿病患者临床种植修复、正畸治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

基金项目: 2012 唐山市科学技术研究与发展项目 (12150220B-8)

* 通讯作者: 张彬, Email: zhangbin3065@163.com

健康成年 Wistar 大鼠 40 只均为雄性,体重 200 ~ 220 g,SPF 级(北京维通利华实验动物技术有限公司提供)动物许可证号:SCXK(京)2007-0001。

1.2 实验药物

盐酸二甲双胍(中美上海施贵宝制药有限公司)。辛伐他汀片(杭州默沙东制药有限公司)。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)由 Sigma 公司提供,用 0.1 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液冰浴下配制成 0.5% (10 g/L)的 STZ 溶液,现配现用。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病大鼠模型的建立:40 只大鼠普通饲料适应性饲养 1 周。随机抽取 10 只作为正常组,其余 30 只均喂以高脂饲料。4 周后正常组以外的 30 只大鼠禁食 12 h,按 40 mg/kg 体重剂量一次空腹注射 STZ。在注射 STZ 3 d 和 7 d 后分别测空腹血糖,其中血糖值高于 16.7 mmol,尿糖(+++)视为建模成功^[1]。

1.3.2 分组与给药:将糖尿病模型大鼠按随机表分为 3 组,即模型组,二甲双胍组,二甲双胍和辛伐他汀联用组,每组 10 只。二甲双胍和辛伐他汀用 2 ml 煮沸的蒸馏水溶解后,每天分别按 0.2 g·kg⁻¹·d⁻¹、5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的剂量给相应组的大鼠灌胃。正常组和模型组则每天灌胃 2 ml 生理盐水,连续用药 12 周,将大鼠处死。

1.4 检查项目

1.4.1 体重测量:分别在灌药前和灌药 12 周后测各组大鼠体重。

1.4.2 空腹血糖、血脂的测定:分别在灌药前和灌药 12 周后,禁食 6 h,采用尾静脉血测血糖、血脂。

1.4.3 荧光标记:大鼠于处死前第 14 天、第 13 天皮下注射盐酸四环素 30 mg/kg(0.1 ml/100 g)各 1 次,共 2 次;处死前第 4 天、第 3 天皮下注射钙黄绿素 6 mg/kg(0.1 ml/100 g)各 1 次,共 2 次,2 次荧光标记间隔时间为 10 天。

1.4.4 骨密度测定:将大鼠处死取双侧胫骨,用 70% 酒精固定,利用双能 X 线骨密度仪扫描测骨密度值。

2 统计学分析

采用 spss17.0 统计软件,输入各组数据计算出各组的血糖、血脂、胫骨密度均值和标准差,结果用均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验分别进行各组两两间比较,*P* > 0.05 为无统计学意义,*P* < 0.05 为有统计学意义。

万方数据

3 结果

3.1 一般情况观察

适应性喂养大鼠期间其精神状态良好,高脂高糖饮食喂养 4 周后,大鼠体重较前明显增加。实验过程中食量、进水量、尿量增加明显,体型消瘦,毛色暗淡,无光泽。模型组有 2 只大鼠并发白内障但未完全失明,有光感。二甲双胍组与二甲双胍、辛伐他汀联用组治疗后糖尿病症状大有改善,大鼠体重下降不明显,较之前活跃,没有出现不良反应。

3.2 用药前后大鼠空腹血糖测定结果的比较

二甲双胍组与二甲双胍、辛伐他汀联用组都能显著降低糖尿病大鼠的血糖,但联用组效果优于单独使用二甲双胍组。见表 1。

表 1 大鼠空腹血糖值 (mmol/L)

Table 1 The value of fasting blood glucose in rats (mmol/L)

组别	正常组	模型组	二甲双胍组	二甲双胍和辛伐他汀组
血糖	5.32 ± 0.57	19.10 ± 3.71	10.50 ± 1.60	4.90 ± 1.03

注:二甲双胍组、联合用药组分别与模型组比较 * *P* < 0.05;二甲双胍组与联合用药组比较 * *P* < 0.05

3.3 用药对糖尿病大鼠血脂的影响

大鼠空腹血脂值测定结果见表 2, TG、TC、LDL 联合用药组低于二甲双胍组,低于模型组 (*P* < 0.05); HDL 联合用药组高于二甲双胍组,高于模型组 (*P* < 0.05)。

表 2 大鼠空腹血脂值 (mmol/L)

Table 2 The value of fasting blood lipids in rats (mmol/L)

组别	TG	TC	LDL	HDL
正常组	0.23 ± 0.12	0.86 ± 0.31	0.30 ± 0.22	0.93 ± 0.23
对照组	0.63 ± 0.15	2.12 ± 0.57	1.04 ± 0.27	0.39 ± 0.15
二甲双胍组	0.42 ± 0.09	1.56 ± 0.38	0.67 ± 0.34	0.58 ± 0.16
二甲双胍联合辛伐他汀组	0.27 ± 0.11	0.89 ± 0.12	0.32 ± 0.29	0.88 ± 0.16

注:二甲双胍组、联合用药组分别与模型组四项比较 * *P* < 0.05;二甲双胍组与联合用药组四项比较 * *P* < 0.05

3.4 骨密度测定

右侧胫骨骨密度测定结果(g/cm²)见表 3,四组大鼠胫骨骨密度存在统计学差异 (*P* < 0.05),胫骨骨密度联用组高于二甲双胍组,高于模型组,低于正常组。

3.5 荧光组织学观察(镜下 100 倍)

模型组荧光标记较弱,标记带间距离较窄且连续性差(图 1),二甲双胍组荧光标记双标记带间距离增宽(图 2),二甲双胍、辛伐他汀联用组荧光标记

较强,双标记带间距离明显宽于模型组和二甲双胍
组且连续性好(图 3)。以上标记都主要集中在骨小

表 3 大鼠胫骨骨密度测定值(g/cm^2)

Table 3 Measurement of bone mineral density of the tibia in rats (g/cm^2)

组别	正常组	模型组	二甲双胍组	二甲双胍和辛伐他汀组
胫骨	0.253 ± 0.0005	0.18827 ± 0.0002	0.1968 ± 0.0006	0.2004 ± 0.0007

注:二甲双胍组、联合用药组分别与模型组比较 * $P < 0.05$;二甲双胍组与联合用药组比较 * $P < 0.05$

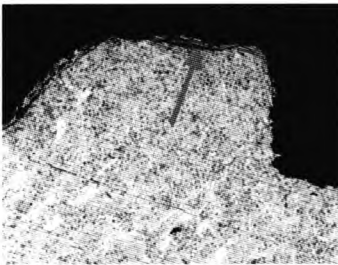


图 1 荧光组织学观察(镜下 100 倍)

Fig.1 Fluorescent histological observation ($\times 100$)
箭头示荧光双标记带呈线状
反应成骨细胞、骨细胞较少
Thin fluorescent double labels
indicating less osteoblasts
and bone cells (arrow)

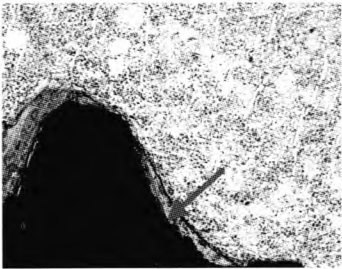


图 2 二甲双胍组

Fig.2 Metformin group
箭头示荧光双标记带较宽
反应成骨细胞、骨细胞较多
Wide fluorescent double labels
indicating more osteoblasts
and bone cells (arrow)

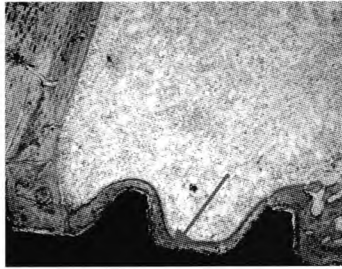


图 3 二甲双胍 辛伐他汀组

Fig.3 Metformin Simvastatin group
箭头示荧光双标记带宽
反应成骨细胞、骨细胞多
Wide fluorescent double labels
indicating a lot of osteoblasts
and bone cells (arrow)

4 讨论

高血糖时,渗透性利尿作用使钙、磷、镁大量从尿中丢失,高血糖又阻滞了肾小管对钙、磷、镁的重吸收,加重骨盐丢失;血清低钙、低磷、低镁刺激甲状旁腺,继发甲状旁腺机能亢进,使甲状旁腺激素分泌增多引起破骨细胞增加,促进骨钙、磷动员以维持正常的血钙、磷水平,造成骨吸收增加骨量减少,骨密度下降。

盐酸二甲双胍(MF)无致癌、致突变作用,是目前唯一被美国食品与药品管理局(FDA)批准可用于儿童 2 型糖尿病口服降糖药物,在临床上应用广泛。Vestergard 的一项研究结果表明 MF 能减少 1 型和 2 型糖尿病患者骨折的发生率^[2]。Cortizo 等研究发现二甲双胍能诱导成骨样细胞系(UMR106, MC3T3)的生长和分化,同时具有增加细胞外基质矿化的能力^[3]。还有研究发现,在高糖条件下,二甲双胍可促进成骨细胞的 ALP 活性,Ⅰ型胶原基因表达,但抑制骨钙素的分泌、钙吸收、矿化小结的形成及钙沉积,结果提示在高糖条件下,二甲双胍也能促进成骨细胞的分化但抑制其矿化^[4]。金龙等研究还表明,二甲双胍可显著降血脂^[5]作用。

辛伐他汀能很好地降低血中胆固醇和低密度脂蛋白浓度,降低血清三酰甘油水平和增高高密度脂蛋白水平^[6]。其作用机制是抑制体内胆固醇合成酶 HMG-COA 还原酶,使胆固醇的合成减少,也使低密度脂蛋白受体合成增加,加速血中低密度脂蛋白、极低密度脂蛋白残粒的清除。近年研究表明,他汀类药物能促进啮齿类动物的骨形成功能并提高骨密度^[7]。Pytlík 等^[8]将 3 个月的雌性大鼠分成假手术和双侧卵巢切除术组,分别给予辛伐他汀(每天 3 mg/kg 和 6 mg/kg 两个剂量)或安慰剂胃肠灌注给药,28 d 后取左侧胫、股骨和 L1-4 作为标本进行检测。结果发现经辛伐他汀治疗后皮质骨和松质骨骨量及强度均有增加,其中以 6mg/kg 剂量组增加明显。认为其可以增加成年大鼠的骨量及抗压能力。

本试验通过对 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型为期 12 周的观察,结果显示,糖尿病组胫骨 BMD 明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。二甲双胍治疗组灌服二甲双胍后,大鼠血糖降低、胫骨的骨密度略有升高,提示服用二甲双胍不仅能调节血糖水平,而且能通过影响成骨细胞的增殖和分化过程,改善因糖尿病引起的骨改建失衡。而联用组,通过灌服二甲双胍和辛伐他汀后,大鼠血糖降低、胫骨

的骨密度水平明显提高,说明服药后糖尿病大鼠的骨质破坏得以明显改善,表示辛伐他汀在骨的改建中具有双向调节作用,即不仅对成骨细胞的成熟有刺激诱导作用,还对破骨细胞具有抑制作用。与 Oxlund 等^[9]的实验结果相一致。本实验胫骨骨组织切片荧光组织学观察,模型组荧光标记较弱,二甲双胍组荧光双标记带间距离增宽,二甲双胍、辛伐他汀联用组荧光标记较强,说明给予二甲双胍药物治疗骨量增加好于没用药的模型组,二甲双胍、辛伐他汀联用药物治疗骨量增加更明显,进一步证实两药合用对骨密度有较好的改善。同时也显示血脂 TG、TC、LDL 联合用药组低于二甲双胍组,低于模型组($P < 0.05$),HDL 联合用药组高于二甲双胍组,高于模型组($P < 0.05$),说明二甲双胍有降血脂作用与金龙等研究相一致,采用二甲双胍与辛伐他汀联合用药对改善血脂优于单纯应用二甲双胍,实验中未见不良反应。但辛伐他汀在动物体内增加骨密度的剂量远大于人体降脂的口服剂量,具体人体用药的剂量,值得进一步探索和研究。

【参 考 文 献】

- [1] LI Guiyun, WU Zhengzhi. Study on the Best Dosage of Streptozocin in Inducing Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2007, 17(2): 74-77.
 - [2] Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. Diabetologia, 2005, 48(7): 1292-1299.
 - [3] Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, et al. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug Metformin on osteoblasts in culture. European Journal of Pharmacology, 2006, 536 (1-2): 38-46.
 - [4] Fathi MH, Salehi M, Saatchi A, et al. In vitro corrosion behavior of bioceramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants. Dent Mater, 2003, 19(3): 188-198.
 - [5] JIN Long, GE Zheng-yan, GUO Yujie, et al. Study of Jiangtang Xiaozhi Tablets on Decreasing Levels of Blood Glucose and Serum Lipid in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(21): 161-165.
 - [6] HE Zhihua, LIU Chuanyin, WAN Fengfu. Simvastatin combined with fenofibrate in the treatment of hyperlipidemia. CHINA MODERN DOCTOR, 2009, 6(2): 51.
 - [7] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science, 1999, 286 (5446): 1946-1949.
 - [8] Pytlík M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, et al. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. Pol J Pharmacol, 2003, 55(1): 63-71.
 - [9] Oxlund H, Dalstra M, Andeassen TT, et al. Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength. Calcif tissue Int, 2001, 69(5): 299-304.
- (收稿日期: 2012-12-06)
-
- (上接第 696 页)
- [2] Lane NE, Yao W, and Kinney. J H Both hPTH (1-34) and bFGF increase trabecular bone mass in osteopenic rats but they have different effects on trabecular bone architecture. J Bone Miner Res, 2003, 18(12): 2105-2115.
 - [3] Mitra E, Rubin C and Qin YX. Interrelationship of trabecular mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone. J Biomech, 2005, 38(6): 1229-1237.
 - [4] Hoc T, Henry L, and Verdier M. Effect of microstructure on the mechanical properties of Haversian cortical bone. Bone, 2006, 38(4): 466-474.
 - [5] Rho JY, Tsui TY and Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. Biomaterials, 1997, 18(20): 1325-1330.
 - [6] Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. Journal of Materials Research, 1992, 1564-1583.
 - [7] Tang B, Ngan AH and Lu WW. An improved method for the measurement of mechanical properties of bone by nanoindentation. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(9): 1875-1881.
 - [8] Sun LW, Fan YB, Li DY, et al. Evaluation of the mechanical properties of rat bone under simulated microgravity using nanoindentation. Acta Biomater, 2009, 5(9): 3506-3511.
 - [9] Fazzalari NL and Parkinson IH. Fractal properties of cancellous bone of the iliac crest in vertebral crush fracture. Bone, 1998, 23(1): 53-57.
 - [10] Hodgkinson R, Currey JD and Evans GP. Hardness, an indicator of the mechanical competence of cancellous bone. J Orthop Res, 1989, 7(5): 754-758.
 - [11] Dong XN, Luo Q, Sparkman D M, et al. Random field assessment of nanoscopic inhomogeneity of bone. Bone, 2010, 47(6): 1080-1084.
 - [12] Cai Zb, Zhu MH, Gao SS, et al. Investigation on radial fretting behavior of human axial femur compact bone. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2008, 42(5): 707-710.
 - [13] Mulder L, Koolstra JH, Toonder JM, et al. Intratrabeular distribution of tissue stiffness and mineralization in developing trabecular bone. Bone, 2007, 41(2): 256-265.
 - [14] Norman J, Shapter JG, Short K, et al. Micromechanical properties of human trabecular bone: a hierarchical investigation using nanoindentation. J Biomed Mater Res A, 2008, 87(1): 196-202.
 - [15] Boivin G and Meunier PJ. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. Calcif Tissue Int, 2002, 70(6): 503-511.
- (收稿日期: 2012-09-24)

二甲双胍和辛伐他汀联用药对糖尿病大鼠骨密度变化的实验研究

作者: 张彬, 黄碧坤, 王旭明, 王付涛, 孟菲, 朱连鹏, ZHANG Bin, HUANG Bikun, WANG Xuming, WANG Futao, MENG Fei, ZHU Lianpeng
作者单位: 河北联合大学口腔医学院正畸科, 唐山, 063000
刊名: 中国骨质疏松杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis
年, 卷(期): 2013, 19(7)

参考文献(9条)

1. LI Guiyun, WU Zhengzhi Study on the Best Dosage of Streptozocin in Inducing Rat Model of Type,2 Diabetes Mellitus [期刊论文]-Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine 2007(02)
2. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk [外文期刊] 2005(07)
3. Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD Osteogenic actions of the anti-diabetic drug Metformin on osteoblasts in culture 2006(1-2)
4. Fathi MH, Salehi M, Saatchi A In vitro corrosion behavior of bioceramic, metallic, and bioceramic-metallic coated stainless steel dental implants 2003(03)
5. JIN Long, GE Zheng-yan, GUO Yujie Study of Jiangtang Xiaozhi Tablets on Decreasing Levels of Blood Glucose and Serum Lipid in Rats with Type,2 Diabetes Mellitus 2012(21)
6. HE Zhihua, LIU Chuanyin, WAN Fengfu Simvastatin combined with fenofibrate in the treatment of hyperlipidemia 2009(02)
7. Mundy G, Garrett R, Harris S Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins [外文期刊] 1999(5446)
8. Pytlik M, Janiec W, Misiarz-Myrta M Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats 2003(01)
9. Oxlund H, Dalstra M, Andeassen TT Statin given perorally to adult rats increases cancellous bone mass and compressive strength 2001(05)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201307003.aspx