

自发性 2 型糖尿病 OLETF 大鼠骨质量特点的研究

程彦臻¹ 陈珺² 王丹³ 王际语¹ 张桦¹ 杨力^{1*}

1. 南方医科大学珠江医院内分泌科, 广州 510282
2. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广州 510006
3. 广东省口腔医院牙周种植科, 广州 510280

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 04-0395-04

摘要: **目的** 观察自发 2 型糖尿病 OLETF 大鼠骨质量和骨代谢的特点。**方法** 选用 4 周龄雄性糖尿病 OLETF 大鼠 8 只, 雄性 LETO 大鼠 8 只作为同种系正常对照, 予常规饲料喂养。实验期间每周记录各组实验动物体重和进食量, 计算每周每只动物的每天平均进食量。24 周龄时处死所有大鼠, 检测血糖、血清胰岛素、骨代谢相关指标, 取两侧股骨、两侧胫骨和 L4、L5, 用于 Micro-CT 观察骨微结构和骨形态计量学分析以及骨生物力学测定。**结果** 与对照组相比, OLETF 组大鼠体重显著增加 ($P < 0.05$), 空腹血糖、胰岛素明显升高 ($P < 0.05$), 骨形成指标骨钙素明显降低 ($P < 0.05$), 骨吸收指标抗酒石酸性磷酸酶明显升高 ($P < 0.05$), 血钙、血磷差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 两组大鼠骨密度的差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Micro-CT 显示 OLETF 组大鼠骨量下降, 骨质量也明显下降, 骨质受损较 LETO 组大鼠严重; 骨生物力学数据显示, OLETF 组大鼠股骨最大负荷和刚度均低于 LETO 组 ($P < 0.05$)。**结论** 自发 OLETF 大鼠骨质改变明显, 是观察 2 型糖尿病对哺乳动物骨质和骨量变化的较好的参考模型。

关键词: 2 型糖尿病; OLETF 大鼠; 骨质量

Characteristics of bone property in spontaneous diabetic OLETF rats

CHENG Yanzhen¹, CHEN Jun², WANG Dan³, WANG Jiyu¹, ZHANG Hua¹, YANG Li¹

1. Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282
2. School of Life Science and Biological Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006
3. Department of Periodontal and Implant Dentistry, Guangdong Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China

Corresponding author: YANG Li, Email: yangli19762009@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics of bone quality and bone metabolism in type 2 diabetic OLETF rats. **Methods** Eight 4-week-old male OLETF rats and 8 male LETO rats were selected. The rats in both groups were fed with routine fodder. The body weight and amount of daily intake of the rats were recorded. The rats were executed when they were 24 weeks of age. Serum glucose, insulin, and bone turnover makers were detected. Bilateral femurs, bilateral tibia, and the lumbar vertebrae L4 and L5 were collected. They were used for bone histomorphometry analysis using micro-CT and bone biomechanical test. **Results** Compared with those in control group, the body weight, serum glucose, and insulin increased significantly in rats of OLETF group ($P < 0.05$). The activity of serum osteocalcin in OLETF rats decreased significantly, while the activity of serum TRAP increased significantly ($P < 0.05$). There was no significant difference between the two groups in serum calcium, phosphorus, and bone mineral density ($P > 0.05$). Micro-CT showed that bone mass and bone quality decreased more in OLETF group than in LETO group. Biomechanics results suggested that the maximal loading stiffness of the femurs were lower in OLETF group than in LETO group ($P < 0.05$). **Conclusion** The bone change is obvious in OLETF rats, which may be a useful model to investigate bone abnormalities in obese type 2 diabetes.

Key words: Type 2 diabetes; OLETF rats; Bone mass

基金项目: 国家自然科学基金(81270966); 广东省自然科学基金(S2012010009494); 南方医科大学科研启动基金(PY2013N050)

* 通讯作者: 杨力, Email: yangli19762009@163.com

骨质疏松是一种以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征, 导致骨质脆性增加和易于骨折的代谢性疾病。糖尿病可通过多种因素影响骨密度 (Bone mineral density, BMD) 与骨质量, 继而导致骨质疏

松,增加骨折风险。但是 1 型和 2 型糖尿病对骨质量的作用不完全相同,1 型糖尿病可直接导致 BMD 下降,而在 2 型糖尿病患者中骨密度基本正常甚至可升高,但骨折风险却显著增加^[1]。为了更好地研究 2 型糖尿病对骨质和骨量的作用,笔者选用自发性糖耐量异常动物模型雄性 OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) 大鼠及同种系正常 LETO (Long Evans Tokushima Otsuka) 大鼠进行观察性实验,评估 2 型糖尿病对大鼠骨骼的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 4 周龄 OLETF 大鼠 8 只,同周龄雄性 LETO 大鼠 8 只为其同种系正常对照,由日本大冢制药株式会社德岛研究所赠送。每笼 4~6 只饲养于 SPF 级环境,环境温度控制在(21±2)℃,湿度为(55±10)%,光照与黑暗 12 h 交替。标准饲料喂养,自由进食、饮水。24 周龄进行糖耐量实验(隔夜禁食 12 h,葡萄糖 2 g/kg 胃管注入),检测 0、30、60、90 和 120 min 血糖,参照日本大冢制药株式会社德岛研究所关于 OLETF 大鼠的实验研究,血糖峰值>16.7mmol/L,且 120 min 血糖>11.1 mmol/L,诊断为糖尿病,符合任何一项诊断为糖耐量异常(IGT)。24 周时,所有 OLETF 大鼠均诊断为糖尿病,下文称为 OLETF 组,所有 LETO 大鼠均无糖尿病或糖耐量异常,下文称为 LETO 组。

1.2 一般项目观察及检测指标

两组成模动物各饲养 24 周,实验期间每周记录

各组实验动物体重和进食量,计算每周每只动物的每天平均进食量。实验结束前日开始禁食 15 h,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,右心室彻底放血处死大鼠,收集血液离心,离心后-80℃保存。取两侧股骨、两侧胫骨和 L4、L5,用于 μCT 观察骨微结构和骨形态计量学分析以及骨生物力学测定。稳豪®倍优型血糖仪检测空腹血糖;全自动生化分析仪检测血钙、血磷;酶联免疫吸附法测定血清骨钙素(Osteocalcin, OC)、抗酒石酸性磷酸酶(Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)。

1.3 主要仪器及试剂

稳豪®倍优型血糖仪,全自动生化分析仪,-80℃超低温冰箱,骨钙素、TRAP ELISA 试剂盒, Micro-CT 仪器为 MCT-CB100MF (Hitachi Medico Technology, Tokyo, Japan),骨生物力学检测仪器使用 MZ-500S (Maruto, Tokyo, Japan)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据均采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组动物临床特点

24 周龄大鼠的数据如表 1 所示,OLETF 组大鼠体重显著高于 LETO 组大鼠(*P*<0.05),空腹血糖、胰岛素、骨吸收指标 TRAb 明显高于 LETO 大鼠(*P*<0.05),骨形成指标骨钙素明显低于 LETO 组(*P*<0.05),血钙、血磷差异无统计学意义(*P*>0.05)。

表 1 两组大鼠实验室检测指标的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of serum metabolism and bone turnover parameters between the two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	体重 (g)	血糖 (mmol/L)	胰岛素 (μIU/mL)	血钙 (mmol/L)	血磷 (mmol/L)	骨钙素 (ng/mL)	TRAb (U/L)
LETO 组	430.79±22.13	5.65±0.36	25.46±0.60	2.50±0.06	2.39±0.12	16.25±2.83	2.25±0.20
OLETF 组	570.31±14.28*	8.25±1.02*	51.03±1.12*	2.49±0.03	2.43±0.12	13.99±2.33*	2.58±0.26*

注: * *P*<0.05, vs LETO group.

2.2 骨微结构、骨密度变化

大鼠胫骨 BMD 见表 2,两组差异无统计学意义(*P*>0.05)。Micro-CT 观察到的骨超微结构及骨形态计量学参数如图 1、表 2。图 1 显示 OLETF 组大鼠骨质破坏严重,而 LETO 组基本正常。表 2 中,OLETF 组骨体积分数(Bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数量(Trabecular Number, Tb. N)均显著低于 LETO 组,骨小梁分离度(Trabecular

Separation/Spacing, Tb. Sp)、结构模型指数(Structure Model Index, SMI)均高于 LETO 组。骨小梁厚度(Trabecular Thickness, Tb. Th)的差异无统计学意义(BV/TV、Tb. Th、Tb. N、Tb. Sp、SMI 均是与骨质量有关的指标,骨质疏松时, BV/TV 降低, Tb. Th、Tb. N 值减小, Tb. Sp 增加, SMI 值增加)。

2.3 骨生物力学数据

为评估大鼠股骨强度,笔者采用三点弯曲实验,

表 2 两组大鼠骨密度、骨微结构参数

Table 2 BMD and parameters of the tibia in two groups

组别	BMD (mg/cm ³)	BV/TV (%)	Tb. Th (mm)	Tb. N (1/mm)	Tb. Sp (mm)	SMI (mm)
LETO 组	802. 8334 ± 14. 7376	11. 820 ± 2. 997	0. 0896 ± 0. 0055	2. 1077 ± 0. 1278	0. 4566 ± 0. 0847	2. 3558 ± 0. 2621
OLETF 组	810. 8776 ± 10. 6791	6. 010 ± 1. 812 *	0. 0951 ± 0. 0047	1. 2869 ± 0. 1278 *	0. 7755 ± 0. 0862 *	2. 8473 ± 0. 3746 *

注: * $P < 0.05$, vs LETO group.

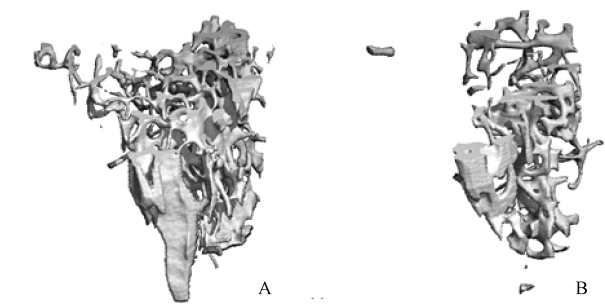


图 1 大鼠胫骨超微结构图。
A:LETO 组;B:OLETF 组

Fig. 1 Micro-construction of the rat tibia.
A: LETO rats; B:OLETF rats

如图 2 所示,研究表明 OLETF 组最大负荷和刚度均低于 LETO 组($P < 0.05$)。

3 讨论

1 型糖尿病可通过降低骨密度增加骨质风险,而在 2 型糖尿病中,骨密度、骨质与骨量的改变尚未完全明了。为了研究 2 型糖尿病对骨质和骨量的作用,笔者选用自发性糖耐量异常动物模型雄性 OLETF 大鼠,评估 2 型糖尿病对大鼠骨骼的影响。此动物模型为日本大冢制药公司开发的一种自发性 2 型糖尿病大鼠,由于胆囊收缩素(CCK)-A 受体基

因表达的缺失,导致其食欲亢进和肥胖,并逐渐出现高胰岛素血症、血脂异常及血糖升高,与人类 2 型糖尿病的病理生理进程极为相似,是目前国际上公认的理想动物模型。笔者在 24 周龄时发现该大鼠与正常大鼠相比,体重明显增加、空腹血糖升高,确定造模成功。另外,为防止雌激素对骨质的影响,笔者选用雄性动物模型。

在本实验中,笔者发现 OLETF 大鼠与对照组相比,BMD 的变化无统计学差异,分析原因主要有以下两点:首先,笔者发现 OLETF 大鼠体重较 LETO 大鼠明显增加。既往已有多项研究报道肥胖状态下,骨骼所承受的机械负荷增加,骨骼应力增加^[2],均与 BMD 呈正相关。另外,最主要的原因是 2 型糖尿病与骨质疏松之间存在一项悖论:骨折风险升高与貌似“强壮的骨骼”并存。众所周知,在 1 型糖尿病中,骨密度明显降低,导致骨折危险性增加^[3];而 2 型糖尿病病人 BMD 可正常^[3],甚至升高^[4-5],但髋部骨折风险却较无糖尿病组增加了 1.4 ~ 1.7 倍^[1, 6]。这说明在 2 型糖尿病中,骨密度的值不能作为骨折的危险预测因子。

骨折的发生取决于骨强度,骨强度不仅与骨密度相关,更是骨质量的综合反应,而反映骨质量的目前通用的较好方法是观察骨显微结构,或进行骨生

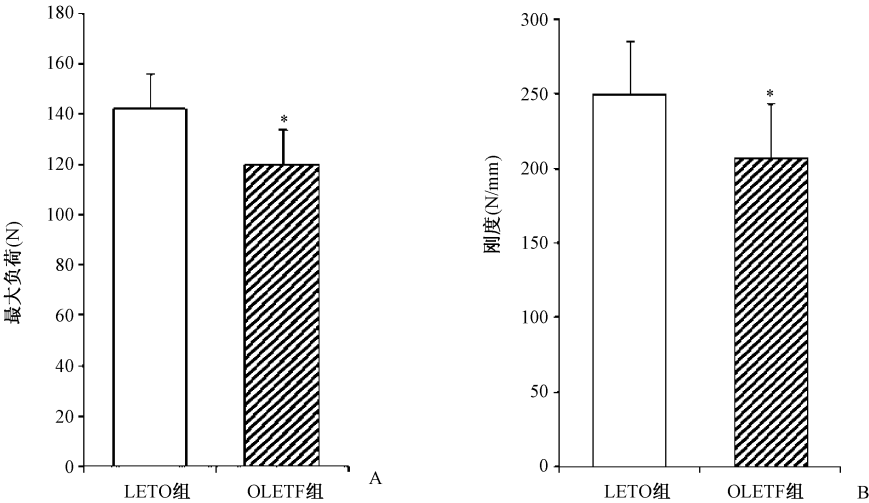


图 2 两组大鼠股骨生物力学数据。A:最大负荷;B:刚度(* $P < 0.05$, vs LETO group)

Fig. 2 Mechanical properties of the midshaft of the femurs. A: Maximum load; B: Stiffness(* $P < 0.05$ vs LETO group.)

物力学检测,笔者同时选用这两种方法对骨质量进行评估,可显著提高检测的准确性。Micro-CT 是一种非破坏性的 3D 成像技术,可以在不破坏样本的情况下清楚了解样本的内部显微结构,不仅形象直观,分辨率极高(可以达到 μm 级别),且可检测多个骨相关参数。从图 1 中可看到 OLETF 组大鼠骨小梁破坏严重,而 LETO 大鼠骨结构几近正常,从微观结构上证实了 OLETF 大鼠骨质受损。表 2 中, BV/TV 降低提示骨量减少, Tb. N 减小提示骨小梁数目减少, Tb. Sp 增加提示骨吸收增加, SMI 增加提示骨小梁从板状向杆状转变, 以上数据均说明 OLETF 大鼠松质骨破坏严重,这也与 Hamann C 等^[7]报道的 Zucker 糖尿病大鼠 (Zucker diabetic fatty, ZDF) 研究相一致。在生物力学实验中,显示 OLETF 大鼠股骨的最大负荷力和刚度均降低,也是使骨折风险增加的关键因素之一。Kimura S 等^[8]也曾报道自发 2 型糖尿病瘦素缺失 SDT-fa/fa 大鼠股骨最大负荷、刚度均降低,胫骨容量稀疏。

正常骨代谢处于成骨细胞形成新骨和破骨细胞吸收旧骨的动态平衡中,2 型糖尿病时高血糖能够改变成骨细胞的生物矿化进程,增加 RANKL,降低骨质量^[9]。胰岛素及胰岛素样生长因子不足,也造成骨细胞中骨基质成熟和转换减少,成骨作用减弱^[10]。高渗透压环境能够影响成骨细胞及破骨细胞分化、成熟,其所致的渗透性利尿使钙、磷、镁等从尿大量排出,导致血清的钙、磷浓度降低,使甲状旁腺素分泌增多,加上糖基化终末产物的累积,均使破骨细胞活性增强,钙磷动员增加,骨质脱钙,溶骨作用增强^[11]。笔者研究发现 OLETF 大鼠血钙、血磷的变化无统计学意义,但骨形成指标降低,骨吸收指标升高,成骨和破骨失衡,最终导致骨质疏松。由于人体的特殊性,不能很好地观察骨质变化,这一模型为观察糖尿病状态下在体哺乳动物骨质和骨量变化

提供了较好的参考价值。

【 参 考 文 献 】

[1] 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.

[2] Gower BA, Casazza K. Divergent effects of obesity on bone health. *J Clin Densitom*,2013,16(4):450-454.

[3] Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, et al. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*,1999,22(7):1196-1200.

[4] Yaturu S, Humphrey S, Landry C, et al. Decreased bone mineral density in men with metabolic syndrome alone and with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*,2009,15(1): 5-9.

[5] Hadzibegovic I, Miskic B, Cosic V, et al. Increased bone mineral density in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Ann Saudi Med*,2008,28(2): 102-104.

[6] Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int*,2007, 18(4):427-444.

[7] Hamann C, Goettisch C, Mettelsiefen J, et al. Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2011,301(6): E1220-1228.

[8] Kimura S, Sasase T, Ohta T, et al. Characteristics of bone turnover, bone mass and bone strength in Spontaneously Diabetic Torii-Lepr fa rats. *J Bone Miner Metab*,2012,30(3):312-320.

[9] Garcia-Hernandez A, Arzate H, Gil-Chavarria I, et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*,2012, 50(1):276-288.

[10] Schwartz AV. Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone? *Calcif Tissue Int*, 2003,73(6):515-519.

[11] Inaba M, Nishizawa Y, Mita K, et al. Poor glycemic control impairs the response of biochemical parameters of bone formation and resorption to exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with type 2 diabetes. *Osteoporos Int*,1999, 9(6):525-531.

(收稿日期: 2014 - 07-07)