

糖尿病 SD 大鼠骨密度及骨组织学特点研究

杨曼¹⁾, 杨莹¹⁾, 苏玉林²⁾, 李奕平¹⁾

(1) 昆明医科大学第四附属医院内分泌科, 云南昆明 650032; 2) 昆明医科大学第一附属医院核医学科, 云南昆明 650021)

[摘要] **目的** 观察糖尿病 SD 大鼠模型骨密度、骨组织学及生化指标的改变, 探讨血糖与骨代谢的关系。**方法** 采用单次大剂量链脲佐菌素的方法, 用雄性 SD 大鼠制备糖尿病 SD 大鼠模型, 以正常血糖雄性 SD 大鼠作为阴性对照, 12 周后, 抽取大鼠心脏血测定血糖、血脂、血钙、血磷、碱性磷酸酶; 采用双能 X 光衍射仪测定大鼠右侧胫骨和股骨离体骨的骨密度, 取左侧股骨上段制作病理标本。**结果** 糖尿病组 SD 大鼠体重显著低于正常对照组, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 注射 STZ 48 h 后血糖明显升高并持续存在。糖尿病组 SD 大鼠骨质疏松明显, 股骨及胫骨 BMD 显著降低 ($P < 0.05$)。糖尿病组 SD 大鼠的 AKP、LDL-C 显著升高 ($P < 0.05$), 而血钙、HDL-C 显著降低 ($P < 0.05$)。**结论** 糖尿病组 SD 大鼠表现为骨密度减少, 不仅出现血生化的异常, 且出现明显的骨组织形态结构异常, 提示高血糖导致骨代谢异常。

[关键词] 糖尿病; 大鼠模型; 骨密度; 骨质疏松

[中图分类号] R587 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 07 - 0000 - 00

Characteristic of Bone Mineral Density and Bone Tissue of Diabetic SD Rats

YANG Man¹⁾, YANG Ying¹⁾, SU Yu - lin²⁾, LI Yi - ping¹⁾

(1) Dept. of Endocrinology, The Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 2) Dept. of Nuclear Medicine, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between blood glucose and bone metabolism by observing bone mineral density, bone tissue and biochemical parameters of diabetic SD rats. **Methods** Male SD rats were prepared for diabetes SD rats using the method of single high-dose chain urea with bacterium element, Normal blood glucose of male SD rats were considered as a control group. After 12 weeks, the blood glucose, blood lipid, blood calcium, phosphorus, alkaline phosphatase were detected. The bone density of the right tibia and the femur of rats in vitro was detected by dual-energy X-ray diffraction. The left femurs were made as pathological specimens. **Results** Body weight of SD rats in diabetic group was significantly lower than that of control group, with statistical significance ($P < 0.001$); the blood glucose rose significantly 48 hours after injecting STZ and hyperglycemia persisted. Indexes of osteoporosis of diabetic SD rats were observed. The BMD of the femur and tibia decreased significantly ($P < 0.01$). AKP, LDL - C of diabetic SD rats increased significantly ($P < 0.01$), and blood calcium, HDL - C decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** SD rats with diabetes mellitus are characterized by not only the lower bone mineral but blood biochemical abnormalities and bone tissue morphology. High levels of blood glucose leads to abnormal bone metabolism.

[Key words] Diabetic mellitus; Rat model; Bone mineral density; Osteoporosis

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30960148; 81260135); 云南省中青年学术技术带头人后备人才基金资助项目 (2011CI045); 云南省医学学科带头人基金资助项目 (D-201217)

[作者简介] 杨曼 (1976~), 女, 河南周口市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事内分泌临床工作。

[通讯作者] 杨莹. E-mail: yangying2072@126.com

近年来糖尿病发病率逐年增高,糖尿病并发骨质疏松症的发病率也随之增高,对糖尿病患者生活影响很大.糖尿病并发骨质疏松症的发病原因很多,其机理尚不清楚,为临床预防及治疗带来很大困难,故对其发病机理的研究就成为了必需.

笔者采用雄性 SD 大鼠单次大剂量注射链脲佐菌素的方法,制备糖尿病大鼠模型,以正常雄性 SD 大鼠作为正常对照,观察糖尿病 SD 大鼠模型骨密度、骨组织学及生化指标,探讨糖尿病与骨代谢关系.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药 物 链脲佐菌素 (streptozotocin 泽浩科技公司),柠檬酸/柠檬酸钠缓冲溶液 (pH 4.4,用前高压灭菌);配制成 0.05% 的 STZ 溶液.

1.1.2 动 物 2 月龄 SD 雄性健康大鼠 25 只,体重 (250 ± 20) g,由昆明医科大学实验动物中心提供.

1.1.3 主要仪器 One Touchn 快速血糖仪 (美国强生公司),Prodigy ADVANCE 双能 X 线骨密度仪 (美国 GE 公司),LEICA RM2245 切片机 (德国 Leica 公司),XSZ1-1-17 显微镜及 OLYMPUS BX50 图像分析系统.

1.2 方 法

1.2.1 糖尿病大鼠模型制备 随机选 10 只雄性 SD 大鼠为正常对照组,注射柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液,普通饲料喂养.15 只雄性 SD 大鼠,腹腔内单次注射新鲜配制的 STZ 溶液 50 mg/kg (用 20ml 柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液溶解 100 mg STZ,充分混匀,过滤于无菌容器内),48 h 后测定血糖,以后每 3 d 测血糖 1 次,筛选大鼠.空腹血糖 ≥ 15 mmol/L 的大鼠为糖尿病组大鼠.其中 14 只大鼠血糖达到标准,1 只未达到上述标准.造模成功的大鼠在饲养过程中死亡 1 只 (考虑与感染有关).

1.2.2 样品采集 造模成功 12 周后,用氯胺酮麻醉后,开胸,心脏抽血处死大鼠,送检血糖、血脂、血钙、血磷、碱性磷酸酶;在冰盒上立即剥离大鼠的股骨及胫骨,将大鼠的左侧股骨上段制作成病理标本,取大鼠右侧股骨和胫骨进行骨密度测定.

1.2.3 骨密度测定 尽量去除大鼠右侧股骨和胫骨表面的软组织,用 Prodigy ADVANCE 双能 X 线骨密度仪测定其骨密度,最后用小动物分析软件进行分析.

1.2.4 病理切片观察 用 10% 的福尔马林固定大鼠股骨上段近干骺端,EDTA (PH7.0) 脱钙 28 d,石蜡包埋,LEICA RM2245 切片机切片后,HE 染色,XSZ1-1-17 显微镜及 OLYMPUS BX50 图像分析系统进行观察.

1.3 统计学处理

用 SPSS 软件包进行数据分析,结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示.组间差异采用方差分析及 *t* 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 糖尿病大鼠模型体重、血糖的改变

除去造模未成功和喂养过程中死亡的大鼠,有 13 只大鼠入选糖尿病组.10 只大鼠入选正常对照组,糖尿病组 SD 大鼠体重显著低于正常对照组 ($P < 0.05$),注射 STZ 溶液 48 h 后,糖尿病组 SD 大鼠血糖显著升高,并持续至处死前,见表 1.

2.2 糖尿病大鼠模型股骨和胫骨骨密度的改变

与正常对照组相比,糖尿病组 SD 大鼠离体股骨及胫骨骨密度显著降低 ($P < 0.05$),见表 2.

2.3 糖尿病大鼠模型生化指标的改变

与正常对照组比较,糖尿病组 SD 大鼠的碱性磷酸酶 (AKP) 显著升高 ($P < 0.05$),而血钙显著降低 ($P < 0.05$),血磷无明显差异,见表 2.糖尿病组 SD 大鼠的低密度脂蛋白 (LDL-C) 显著升高 ($P < 0.05$),高密度脂蛋白 (HDL-C) 显著降低 ($P < 0.05$),总胆固醇、甘油三脂 (TC、TG),差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 3.

2.4 糖尿病大鼠模型股骨上段近干骺端病理切片观察

与正常对照组相比,糖尿病组大鼠股骨上段近干骺端骨小梁变细,较稀疏,横向骨小梁稍减少,骨髓腔稍扩大,骨母细胞稍减少,见图 1.

3 讨 论

在糖尿病大鼠模型制备过程中,笔者观察到 STZ 溶液注射后,糖尿病组 SD 大鼠体重逐渐减轻,考虑与 STZ 溶液注射后 SD 大鼠胰腺 B 细胞坏死有关,糖尿病大鼠模型胰岛素分泌减少,血糖升高,大鼠出现多饮、多尿、多食、体重下降.正常对照组 SD 大鼠体重逐渐增加,故两组体重存在显著差异.目前流行病学研究发现,体重增加可促进骨量生成^[4];本研究中糖尿病组 SD 大鼠骨量生成减少,

表 1 STZ 注射前后 2 组大鼠体重及血糖的改变 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The changes in the body weight and blood glucose before and after STZ injection in two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	STZ 注射前		STZ 注射后	
		体重 (g)	血糖 (mmol/L)	体重 (g)	血糖 (mmol/L)
对照组	10	356.2 ± 19.1	5.65 ± 0.74	615.6 ± 20.9	5.62 ± 0.63
糖尿病组	13	361.2 ± 16.9	5.15 ± 0.45	311.7 ± 37.3*	24.39 ± 2.68*

与对照组比较, * $P < 0.05$.

表 2 2 组大鼠骨密度及生化指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 Comparison of bone density and biochemical indexes of rats between two groups ($\bar{x} \pm s$)

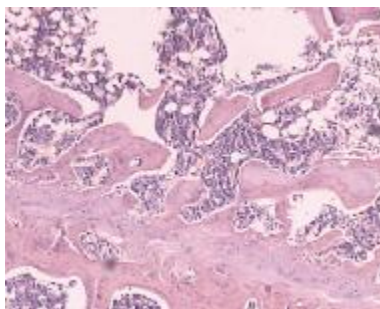
组别	n	骨密度 (g/cm ²)	AKP (U/L)	血钙 (mmol/L)	血磷 (mmol/L)
对照组	10	0.195 ± 0.012	164 ± 25.9	2.58 ± 0.89	2.54 ± 0.25
糖尿病组	13	0.159 ± 0.010*	505 ± 97.4*	2.21 ± 0.68*	2.72 ± 0.19

与对照组比较, * $P < 0.05$.

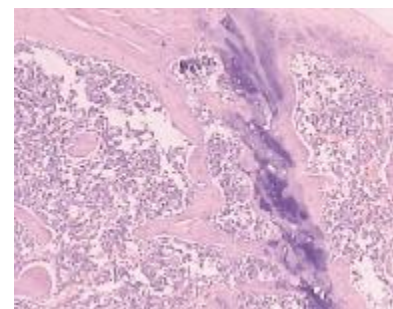
表 3 2 组大鼠血脂的比较 [mmol/L, ($\bar{x} \pm s$)]Tab. 3 Comparison of blood lipids levels of rats between two groups [mmol/L, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	n	LDL-C	HDL-C	TC	TG
对照组	10	0.193 ± 0.052	0.625 ± 0.147	1.60 ± 0.28	1.45 ± 0.31
糖尿病组	13	0.636 ± 0.136*	0.476 ± 0.093*	1.49 ± 0.22	1.48 ± 0.30

与对照组比较, * $P < 0.05$.



对照组 (×40)



糖尿病组 (×40)

图 1 2 组大鼠股骨上段近干骺端病理切片 HE 染色

Fig. 1 The pathological changes of femur approaching metaphysis in rats in two groups(HE staining)

骨密度减低, 可能与其体重降低有关。

目前国内外研究均提示糖尿病与骨量减少有密切关系^[2-3]。研究显示 1 型糖尿病患者中约 67% 的男性和 57% 的女性患者存在股骨颈和或脊柱低骨量, 14% 的男性患者达到了骨质疏松的诊断标准。Fuji 等研究结果显示, 2 型糖尿病患者骨密度低于正常对照组^[4], 国内报道 2 型糖尿病患者骨量减少的发生率为 30% ~ 74.1%, 是非糖尿病人群的 2 ~ 4 倍以上^[5]。本研究中糖尿病组 SD 大鼠的股骨及胫骨骨密度较正常对照组降低, 与上述国内外研究一致, 提示高血糖与骨量减少有关。

许多研究已证实, 糖尿病患者骨折风险明显增加。对糖尿病实验模型的研究表明, 糖尿病时骨结

构的改变增加了骨折的危险性^[6]。有研究显示 2 型糖尿病患者髌骨骨折的危险性增加了 2.1 ~ 2.8 倍^[7]。研究表明骨质疏松性髌部骨折与骨密度及局部骨小梁结构有密切相关性^[8]。本研究中糖尿病组 SD 大鼠股骨上段近干骺端骨小梁变细, 较稀疏, 横向骨小梁稍减少, 骨髓腔稍扩大, 骨母细胞稍减少, 存在骨结构的改变, 提示高血糖与骨结构的改变有关, 但本研究中糖尿病组 SD 大鼠骨结构的改变较轻, 考虑可能与造模后饲养时间较短有关。

血糖升高时, 出现多尿, 使钙、磷从尿中丢失, 同时尿糖升高, 肾小管对钙、磷的重吸收减少, 导致血清低钙、低磷、使甲状旁腺激素分泌增多, 造成骨吸收增加, 骨量减少, 是糖尿病骨密度

减少的原因之一^[9]。另外, Huang 等研究发现肾脏受损使 1, 25-(OH)₂D₃ 合成减少, 影响钙的转运和维生素 D 的代谢, 使尿钙排出增加, 钙、磷吸收减少, 破骨细胞活性增加^[10]。本研究中糖尿病组 SD 大鼠血钙明显降低, 碱性磷酸酶明显升高, 与上述研究一致, 提示高血糖与骨代谢紊乱有关; 但血磷无明显差异, 与上述研究不同, 可能与标本量较小有关, 在以后的研究中扩大样本量, 观察血磷有无差异。

目前血脂异常与骨质疏松的关系尚不明确, 相关研究较少, 本研究中糖尿病组 SD 大鼠的低密度脂蛋白显著升高, 高密度脂蛋白显著降低, 但剔除高血糖的影响后, 与骨量减少是否相关还不清楚, 可以进一步研究。

糖尿病并发骨质疏松症的发病机理非常复杂, 影响因素很多, 仍需要进一步研究, 为临床治疗提供科学依据。

[参考文献]

- [1] ZHAO LAN-JUAN, LIU YONG-JUN, LIU PENG-YUAN, et al. Relationship of obesity with osteoporosis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(5): 1 640 - 1 646.
- [2] OMOY A, YAFFE P, ZANGEN S W, et al. Decreased response of osteoblasts obtained from aged Cohen diabetic sensitive rats to sex steroid hormones and 1,25OH₂D₃ in culture [J]. *Odontology*, 2006, 94(1): 38 - 43.
- [3] DEL PINO-MONTES J, BENITO G E, FERNANDEZ - SALAZAR M P, et al. Calcitriol improves streptozotocin-induced diabetes and recovers bone mineral density in diabetic rats [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 75 (6): 526 - 532.
- [4] FUJII H, KONO K, KASAYAMA S, et al. Oxidative and Nitrosative Stress and Progression of Diabetic Nephropathy in type 2 diabetes [J]. *American Journal of Nephrology*, 2010, 31(4): 342-352.
- [5] 黄昶荃, 陈建梅. 老龄 II 型糖尿病大鼠肾 1- α 羟化酶与骨密度变化的研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2006, 12 (1): 33 - 35.
- [6] DOMINGUEZ L J, MURATORE M, QUARTA E, et al. Osteoporosis and diabetes [J]. *Reumatismo*, 2004, 56 (4): 235 - 241.
- [7] JANGHORBANI M, VAN DAM R M, WILLETT W C, et al. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture [J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 166(5): 495 - 505.
- [8] UNNANUNTANA A, GLADNICK BP, SWIFT J M, et al. The assessment of fracture risk, *The journal of bone and joint surgery* [J]. *American Volume*, 2010, 92(3): 743 - 753.
- [9] FEI Y, ZHANG M, LI M, et al. Element analysis in femur of diabetic osteoporosis model by SRXRF microprobe [J]. *Micron*, 2007, 38(6): 637 - 642.
- [10] HUANG C Q, MA G Z, MA Y, et al. The relationship among renal injury, changed activity of renal 1- α hydroxylase and bone loss in elderly rats with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus [J]. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2009, 32(3): 196 - 201.

(2014 - 02 - 21 收稿)