

氯沙坦对糖尿病雄性大鼠早期骨质变化影响的实验研究 *

柯东鲁¹ 胡小华² 谢琴³ 艾雯⁴ 徐聪^{3#}

(1 江西省彭泽县人民医院 彭泽 332700; 2 南昌大学第二附属医院 江西南昌 330006; 3 南昌大学第四附属医院 江西南昌 330003; 4 江西中医药大学 2012 级硕士研究生 南昌 330006)

摘要:目的:探讨糖尿病雄性大鼠在氯沙坦干预治疗后其骨质的早期变化情况。方法:将满 2 月龄的雄性 SD 大鼠 45 只,随机分为正常对照组(A 组)15 只和实验组(B 组)30 只。A 组给予腹腔内注射柠檬酸盐缓冲液,B 组糖尿病大鼠模型经腹腔内注射链尿佐菌素(STZ)建立,随机分为糖尿病对照组(B1 组)和氯沙坦治疗组(B2 组),每组 15 只。B2 组大鼠给予氯沙坦 10 mg/(kg·d)灌服,A、B1 组大鼠灌服生理盐水 1.5 ml/(只·d)。所有大鼠均予以普通饲料喂养,待 B2 组大鼠灌服药物至 14 周末,测定三组大鼠骨密度(BMD)后全部处死,取出血液及骨样本,检测血清碱性磷酸酶(ALP)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、骨组织 BMP-2 基因表达以及血清 IL-6 等。结果:骨代谢指标,与 B1 组比较,B2 组的血清 ALP 显著性升高($P<0.05$),TRACP 显著性降低($P<0.05$);骨组织 BMP2-mRNA 的表达水平,与 B1 组比较,B2 组显著性升高($P<0.05$);骨密度测定,与 A 组比较,B1 组显著性降低($P<0.05$);与 B1 组比较,B2 组显著性升高($P<0.05$);血清 IL-6,与 B1 组比较,B2 组显著性降低($P<0.05$)。结论:氯沙坦能改善糖尿病雄性大鼠的骨代谢,增加其骨密度,使骨组织 BMP-2 基因表达增强和血清 IL-6 减少,较好地改善糖尿病雄性大鼠骨质疏松状况。

关键词:骨质疏松;糖尿病雄性 SD 大鼠;氯沙坦;BMD;BMP-2;IL-6

中图分类号:R587.1

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.07.055

随着生活水平的提高和生活方式的改变,糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)的发病率正逐年增加并低龄化^[1],其并发症随之增多,糖尿病并发骨质疏松是最常见的一种并发症,但未能引起足够的重视^[2]。骨质疏松症是一种以骨组织骨量减少和微观结构退化为特征、致使骨脆性增加并易于发生骨折的疾病,糖尿病患者患骨质疏松症的概率比正常人群明显增加,氯沙坦(Losartan)是第一个选择性血管紧张素 II 受体拮抗剂(Angiotensin II Antagonist, A II A)药物,可特异性抑制血管紧张素 II 受体(AT1 型),阻断缩血管作用,有效降低肾小球内高压^[3]。同时还能促使血管内皮生长因子、血管生成素的分泌,改善肾脏局部血液供应,促进细胞外基质降解,阻断肾小球硬化、肾间质纤维化进程,延缓糖尿病肾病的进展^[4]。近年来还发现其能影响降钙素基因相关肽和内皮素-1 的表达^[5],因此,我们应用糖尿病大鼠模型观察氯沙坦对糖尿病雄性大鼠早期骨质代谢的影响。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取满 2 月龄且体重为 120~150 g 的健康雄性 SD 大鼠(南昌大学医学院实验动物中心供给)45 只作为实验动物,由同一名饲养人员饲养于清洁级环境中,普通饲料喂养,自由饮水,温度设定为(22±2)℃,湿度设定为(72±2)%,24 h 自动昼夜循环,光照 10~12 h/d。

1.1.2 药物及试剂 氯沙坦片(国药准字

H20030654),链脲佐菌素(美国 Sigma 公司),血糖检测试纸(拜耳医药保健有限公司),柠檬酸盐缓冲液(上海基免实业有限公司),DAB 显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),10%双氧水(天津市鑫钰源商贸有限公司),多聚赖氨酸(上海复蒙基因生物科技有限公司),EDTA(常州市捷胜化工有限公司),DEPC(上海劲马实验有限公司),二甲苯(南昌化学试剂厂),甘油(南昌化学试剂厂),石蜡油(广州生物工程有限公司),碘^[125I]白细胞介素-6 放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所),血清抗酒石酸酸性磷酸酶测试盒(上海沪峰化工有限公司),血清胰岛素试剂盒(潍坊三维生物工程集团有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的建立和分组 45 只大鼠随机分为正常对照组(A 组)15 只和实验组(B 组)30 只。A 组大鼠按 50 mg/kg 剂量给予腹腔内注射柠檬酸盐缓冲液 1 次,B 组大鼠按 50 mg/kg 剂量给予腹腔内注射链尿佐菌素(STZ,溶于 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液,pH 值 4.5),72 h 后取尾静脉血,测血糖>16.65 mmol/L(罗氏 ACCU-CHEK 血糖仪测定),表明造模成功,然后将 B 组随机分为糖尿病对照组(B1 组)和氯沙坦治疗组(B2 组),每组 15 只,各组大鼠在体重、自由活动度和精神状态上无显著的统计学差异($P>0.05$)。

1.2.2 实验方法 A、B1 组大鼠灌服生理盐水 1.5 ml/(只·d),B2 组大鼠按邢学农^[6]的剂量给予氯沙坦

* 基金项目:江西省卫生和计划生育委员会科技项目(编号:20121048)

通讯作者:徐聪, E-mail: 397264674@qq.com

10 mg/(kg·d) 化水后灌服,待 B2 组灌服氯沙坦至 14 周末重新测定三组大鼠血糖,若 A 组大鼠血糖全部正常,B 组大鼠均符合糖尿病大鼠模型标准,在测定各组大鼠骨密度(BMD)后全部处死,取材前一晚禁食,次日检测各项指标。取出血液及骨样本,检测血清碱性磷酸酶(ALP)、血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)和骨组织 BMP-2 基因表达以及血清白细胞介素-6(IL-6)等。

1.3 观察内容

1.3.1 骨密度测定 三组大鼠用 10%水合氯醛 3 ml/kg 在腹腔内行注射麻醉,待其呈稳定的昏睡状态后,将其仰卧于美国 GE 公司 Prodigy Advance 型双能 X 线骨密度仪检查台上,牵拉外展其四肢,使小动物检测软件可以对其进行全身扫描,并对腰椎、股骨和胫骨进行 BMD 测定及分析,得到检测结果。

1.3.2 血液指标测定 (1)血液标本的采集:处死大鼠后,立即用注射器从右心室穿刺抽取静脉血约 4 ml,装入普通试管,2 500 rpm 离心(江西佳华离心机制造有限公司),分离出血清,分装于 -20 ℃保存,行相关生化指标检测。(2)血液指标的检测:三组大鼠的血糖(GLU)、血清钙(Ca)、磷(P)和 ALP 的检测均采用贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪进行检测;空腹胰岛素与 TRACP 按其具体试剂盒操作说明进行检测;血清 IL-6 的含量,按碘¹²⁵I 白细胞介素-6 放射免疫分析药盒操作说明进行操作测定。

1.3.3 骨 BMP-2 及其平均光密度(OD)值测定 标本及切片制备:三组大鼠处死后,在严格无菌条件下切取腰 2 椎体(L₂)和右侧胫骨,快速除去周围软组织后置于 4%多聚甲醛(内含 0.1%DEPC)中固定 12 h,用蒸馏水冲洗 2 次后,在 70%乙醇中固定 2 h,20%EDTA 中脱钙(45 ℃)3 d,蒸馏水彻底冲洗,依次置于 70%、80%、90%、95%和 100%的乙醇中逐级脱水各 24 h,二甲苯透明 12 h,渗透液浸透、软石蜡包埋,骨组织纵行连续切片(切片厚度约 6 μm),最后黏贴在用 10%多聚赖氨酸包被的载玻片上,60 ℃烤箱中烘烤 22 h。以上所使用的玻片和容器全部都经彻底的泡酸泡碱清洗,200 ℃干烤 2 h,以彻底消灭 RNA 酶污染,实验过程加入 0.1%DEPC 以抑制 RNA 酶对 RNA 的分解。

1.3.4 骨组织中 BMP2-mRNA 表达的检测 按 BMP-2 原位杂交检测试剂盒上的步骤说明进行操作。为了抑制 RNA 的分解,操作中所用的蒸馏水、脱蜡、缓冲液、水化剂均加入 0.1%EDPC。

1.3.5 图像分析原位杂交结果 用电子光学显微

镜(日本,Olympus)对标本进行观察和拍照,每一标本每个视野照一张(共 4×4 张),再用图像分析系统分析和计算每一个视野的阳性染色平均光密度。

1.4 统计学方法 所得数据用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用二独立样本 t 检验或方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重比较 大鼠饲养期间无死亡,氯沙坦灌服至第 14 周末,三组大鼠的表现各有不同:A 组大鼠精神状态良好;B 组大鼠出现多食、多饮、多尿、消瘦及生长、行动迟缓等糖尿病症状,以 B1 组为突出。与 A 组 (331.2±12.7) g 相比,B 组大鼠的体重[B1 组 (178.6±16.1) g、B2 组 (191.5±13.8) g]均下降明显,差异有统计学意义($P<0.05$);B 组间差异无统计学($P>0.05$)。

2.2 骨密度比较 与 A 组比较,B 组的腰椎、股骨和胫骨 BMD 均显著性降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 B1 组比较,B2 组的腰椎、股骨和胫骨 BMD 均明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$),并且 B2 组骨小梁稀疏、断裂情况少于 B1 组。见表 1。

表 1 三组大鼠不同部位的 BMD 比较(g/cm ² , $\bar{x} \pm s$)				
组别	腰 2 椎体	股骨	胫骨	
A 组	0.220 1±0.017 6	0.198 6±0.032 4	0.159 5±0.010 3	
B1 组	0.178 7±0.021 1 [*]	0.169 1±0.020 1 [*]	0.136 8±0.009 5 [*]	
B2 组	0.201 5±0.010 8 [#]	0.186 8±0.016 9 [#]	0.151 1±0.008 9 [#]	

注:与 A 组比较,^{*} $P<0.05$,[#] $P<0.05$;与 B1 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.3 骨代谢指标比较 与 A 组的 ALP 比较,B 组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 B1 组比较,B2 组也有明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 A 组比较,B1 组的 TRACP 明显升高,有显著差异($P<0.05$),但 B2 组却明显降低,有显著差异 ($P<0.05$);B2 与 B1 组比较,也有显著性差异 ($P<0.05$)。但三组的血清钙和磷均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 三组大鼠骨代谢的指标比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	ALP(U/L)	TRACP(U/L)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)
A 组	86.81±11.20	9.12±0.96	2.21±0.10	2.88±0.15
B1 组	110.53±12.80 [*]	10.33±1.08 [*]	2.23±0.08	2.79±0.11
B2 组	141.22±9.50 [#]	6.65±1.06 [#]	2.22±0.10	2.81±0.13

注:与 A 组比较,^{*} $P<0.05$,[#] $P<0.05$;与 B1 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.4 骨 BMP2-mRNA 表达、骨 BMP-2 平均 OD 及血清 IL-6 比较 在骨 BMP2-mRNA 表达中,A 组的原位杂交阳性染色在骨小梁周围的部分骨细胞、成骨细胞和骨基质表面着色较深,而 B2 组的阳性染色则在其骨细胞、部分间充质细胞和成骨细胞,较广泛出现且阳性着色深,B1 组则染色细胞少,且着

色较浅。与 A 组的骨 BMP-2 平均 OD 值相比,B2 组大鼠的骨 BMP-2 平均 OD 值明显升高,有显著性差异 ($P<0.05$),B1 组则有降低的趋势,但无显著性差异 ($P>0.05$);与 B1 组比较,B2 组的平均 OD 值明显升高,有显著差异 ($P<0.05$)。与 A 组的血清 IL-6 比较,B 组明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与 B1 组比较,B2 组却明显降低,差异也有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 三组大鼠 BMP-2 平均 OD 值及血清 IL-6 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均 OD 值	血清 IL-6
A 组	0.21± 0.057	28.47± 6.796
B1 组	0.20± 0.034 [△]	46.31± 7.581*
B2 组	0.25± 0.033 ^{△#}	38.37± 8.776 [#]

注:与 A 组比较,[△] $P>0.05$,* $P<0.05$;与 B1 组比较,[#] $P<0.05$ 。

3 讨论

目前对糖尿病并发症的研究主要集中在糖尿病合并肾病、心脑血管疾病、周围血管病变及周围神经病变等方面,而对糖尿病引起的骨质疏松并未引起应有的重视。但近年来有调查证明,糖尿病患者不但合并骨质疏松症的发生率远高于其他的并发症,而且其合并骨质疏松症的发病率和骨质疏松性骨折的危险性都明显高于非糖尿病人群^[7]。本研究结果支持这种观点,B 组糖尿病大鼠无论从体重、BMD 还是骨代谢指标 (ALP、TRACP)和血清 IL-6 均与 A 组正常大鼠有明显的差异,因为我们在实验中应用了正常对照组、糖尿病对照组和氯沙坦治疗组,这就排除了用药剂量对结果的干扰,从结果我们还可以看出 B 组的氯沙坦治疗组中骨质疏松的病变程度要明显好于非治疗的糖尿病对照组,从而进一步证实了糖尿病大鼠存在着骨质疏松状况。

国内外的许多研究都证实了糖尿病会影响骨生成,加速骨丢失,从而使骨密度减少,而出现糖尿病性骨质疏松^[8],但发病机制目前还不完全清楚。有关骨质疏松症和肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统之间的关系以及临床上应用血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 或血管紧张素 II 受体拮抗剂治疗骨质疏松症的相关报道极少,A II A 类的药物一直以来都被用于心血管系统疾病和糖尿病引起的肾脏疾病的治疗,有人对 ACEI 及钙通道阻滞剂 (CCB) 治疗绝经后妇女骨质疏松状况进行观察,发现应用 ACEI 的 BMP 较 CCB 者高,且应用时间超过 5 年者的 BMP 要明显高于应用时间少于 5 年者^[9],国外也有证实 ACEI 对钙代谢和 BMP 有促进作用的研究^[10]。有报道发现 A II A 对组织中 OPG 水平影响明显,对血浆中 OPG 的表达有上调作用,而 OPG/RANKL 水平对骨质丢失有重要作用^[11]。有人发现 A II A 类药物

的伊贝沙坦 (Irbesartan) 可以改善糖尿病患者骨质疏松的状况^[12],同类药物的氯沙坦是在高血压病、动脉疾病、心脏肥大、心力衰竭及糖尿病、肾病等方面研究与应用最早与最多的一个药物,但在改善糖尿病患者骨质疏松方面国内外却鲜有报道。从本研究可以看出,经氯沙坦治疗后,糖尿病大鼠的 BMD 和 ALP 较未经治疗的糖尿病大鼠高,骨组织 BMP2-mRNA 表达较未经治疗的糖尿病大鼠增强,骨代谢产物 TRACP 和血清 IL-6 较未经治疗的糖尿病大鼠减少,且骨小梁稀疏、断裂情况少于未经治疗糖尿病大鼠,又提示 A II A 对糖尿病雄性大鼠骨量的维持、骨密度的增加有一定效果,起着改善糖尿病大鼠骨质疏松的作用。

众所周知,雄激素在骨骼的生长、代谢,骨量的维持和骨的重建等方面起着重要的作用,本研究应用的是雄性 SD 大鼠,因此氯沙坦对雌性大鼠或去势雌性大鼠抗糖尿病致骨质疏松的效果如何有待于进一步研究。总之,我们认为氯沙坦能很好地纠正和改善糖尿病雄性大鼠骨质疏松状况。

参考文献

[1]Geiss LS,Pan L,Cadwell B,et al.Changes in incidence of diabetes in U.S. adults,1997-2003[J].Am J Prev Med,2006,30(5):371-377
[2]Volta U,Caio G,Stanghellini V,et al.The changing clinical profile of celiac disease: a 15-year experience (1998-2012) in an Italian referral center[J].BMC Gastroenterol,2014,14:194
[3]王琪琦.阿魏酸钠与氯沙坦联合治疗早期糖尿病肾病的效果观察[J].吉林医学,2012,33(13):2783
[4]段建召,赵松,王磊,等.氯沙坦联合阿魏酸钠治疗早期糖尿病肾病的临床研究[J].中国老年学杂志,2007,27(6):543-544
[5]何伟,李英,胡志娟,等.氯沙坦对糖尿病大鼠肾组织降钙素基因相关肽和内皮素 -1 表达的影响[J].河北医药,2014,36(18):2734-2736
[6]邢学农,丁敏,李素梅,等.转化生长因子 β 1 对糖尿病骨代谢影响的实验研究[J].中国临床保健杂志,2006,9(5):427-430
[7]赵伟业,董碧蓉,欧雪梅,等.骨质疏松药物治疗的新进展及循证证据[J].中国骨质疏松杂志,2003,9(1):80-82
[8]高志红,樊继援,尹滩,等.112 例糖尿病患者骨密度的变化[J].中华内分泌代谢杂志,2000,16(4):254-255
[9]阎德文,王建平,吴清平,等.高血压患者有血管紧张素转换酶抑制剂治疗时的骨密度[J].中国骨质疏松杂志,1999,5(4):30-32
[10]Perez-Castrillon JL,Silva J,Justo I,et al.Effect of quinapril, quinapril-hydrochlorothiazide, and enalapril on the bone mass of hypertensive subjects: relationship with angiotensin converting enzyme polymorphisms[J].Am J of Hypertens,2003,16(6):453-459
[11]Chang K,Chang WH,Huang S,et al.Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor[J].J Orthop Res,2005,23(6):1308-1314
[12]Gunczler P,Lanes R,Paoli M,et al.Decreased bone mineral density and bone formation markers shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus[J].Pediatr Endocrinol Metab,2001,14(5):525-528

(收稿日期: 2014-12-04)