文章编号:1000-5404(2014)19-1987-04

论著

胰岛素样生长因子-1改善糖尿病大鼠骨质疏松及其机制的初步研究

邓子阳[1],刘学政[1],张德志[2],左中夫[1],付云杰[1],刘万鹏[1] (121001 辽宁 锦州,辽宁医学院:人体解剖学教研室[1],附属第一医院骨科[2])

[摘要] **目的** 探讨胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)对糖尿病大鼠骨质疏松的影响及机制。**方法** 取30只体质量220~250 g的雄性3月龄SD大鼠,腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型,按随机数字表法分为对照组(正常大鼠腹腔注射PBS)、糖尿病组(糖尿病大鼠腹腔注射PBS)及IGF-1治疗组(糖尿病大鼠腹腔注射IGF-1),3个月后观察骨源性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase,BALP)含量、胫骨钙磷含量、胫骨灰与胫骨质量之比、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)表达及胫骨骨密度。**结果** 对照组、糖尿病组及IGF-1组BALP含量分别为(2.42±0.56)、(1.54±0.41)及(2.18±0.62)ng/L,钙含量分别为(5.89±1.21)、(5.41±0.75)及(5.75±1.05)mol/L,磷含量分别为(3.78±0.56)、(3.21±0.47)及(3.67±0.41)mol/L,胫骨灰与胫骨质量比值分别为(67.21±0.81)%、(63.13±0.63)%及(65.81±0.21)%。与对照组相比,糖尿病组BALP含量低,胫骨BMP-2表达少,钙磷含量、胫骨灰重与胫骨质量比值、胫骨密度均下降($P<0.05$)。与糖尿病组相比,IGF-1组BALP含量增加,胫骨BMP-2表达上调,胫骨钙磷含量、胫骨灰重与胫骨质量比值、胫骨骨密度均显著提高($P<0.05$)。**结论** IGF-1可增加糖尿病大鼠胫骨钙磷含量、提高胫骨灰重与胫骨质量比值、防止糖尿病大鼠骨质疏松,其机制可能与IGF-1促进骨骼BMP-2表达、提高BALP含量有关。

[关键词] 胰岛素样生长因子-1;糖尿病;骨质疏松
[中图法分类号] R587.1; R681.05; R977.6 [文献标志码] A

Effects of IGF-1 on osteoporosis in diabetic rats

Deng Ziyang[1], Liu Xuezheng[1], Zhang Dezhi[2], Zuo Zhongfu[1], Fu Yunjie[1], Liu Wanpeng[1] ([1]Department of Human Anatomy, [2]Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning Province, 121001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects and potential mechanisms of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on osteoporosis in diabetic rats. **Methods** Thirty male SD rats (with an age of 3 months and weight of 220 to 250 g) were randomly assigned into control group (naive rats administered with PBS), diabetic group (diabetic rats received PBS), and IGF-1 group (diabetic rats received IGF-1). After SD diabetic rats were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin, PBS or 1 mg/(kg·d) IGF-1 was given to the rats from the corresponding groups for 3 months. Then the tibial bone density was calculated with the aid of X-ray photography, the serum level of bone alkaline phosphatase (BALP) was detected, the contents of tibial calcium and phosphonium were measured for the weight ratio of tibial ash to tibial bone, and the expression of tibial bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) was detected by Western blotting and immunohistochemical assay. **Results** In the control, diabetic and IGF-1 groups, the BALP level was 2.42±0.56, 1.54±0.41 and 2.18±0.62 ng/L respectively; the calcium content was 5.89±1.21, 5.41±0.75 and 5.75±1.05 mol/L respectively; the phosphonium content was 3.78±0.56, 3.21±0.47 and 3.67±0.41 mol/L respectively; the ratio of tibial ash to tibial bone was (67.21±0.81)%, (63.13±0.63)% and (65.81±0.21)% respectively. The serum level of BALP, the expression of BMP-2, the contents of calcium and phosphonium, the weight ratio of tibial ash to tibial bone, and the tibial bone density were decreased in diabetic group

[基金项目] 国家自然科学基金(81041063);辽宁省自然科学基金(联合基金)(2013022061)
[通信作者] 刘学政,E-mail:liuxuezheng168@vip.sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140807.1557.008.html(2014-08-07)

compared with control group ($P<0.05$). While, the IGF-1 group showed increased BALP level, up-regulated tibial BMP-2, increased contents of tibial calcium and phosphonium, increased weight ratio of tibial ash to tibial bone, and improved tibial bone density compared to diabetic group ($P<0.05$). **Conclusion** IGF-1 enhances the tibial contents of tibial calcium and phosphonium, increase weight ratio of tibial ash to tibial bone, and inhibit osteoporosis in diabetic rats. These alterations may result from IGF-1 enhancing the level of BALP and up-regulating BMP-2 in the tibia.

[**Key words**] insulin-like growth factor-1; diabetes mellitus; osteoporosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81041063) and the Natural Science Foundation of Liaoning Province (United Foundation, 2013022061). Corresponding author: Liu Xuezheng, E-mail: liuxuezheng168@vip.sina.com

糖尿病对机体影响广泛,患者可发生骨代谢异常,发生骨质疏松,但糖尿病导致骨质疏松的机制尚不完全清楚。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor,IGF-1)与骨代谢密切相关,IGF-1 与成骨细胞上的受体结合后能促进Ⅰ型骨胶原蛋白合成,与破骨细胞上的受体结合后能抑制胶原酶在破骨细胞内的合成,并酸化骨原细胞和骨基质而利于骨矿化,从而促进骨的形成[1-2]。糖尿病时血清 IGF-1 含量明显降低[3],但 IGF-1 在糖尿病骨质疏松的作用及机制尚不明确。本研究拟观察 IGF-1 对糖尿病大鼠骨质疏松的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

30 只健康雄性 3 月龄 SD 大鼠,体质量 220~250 g 购自辽宁医学院实验动物中心,动物许可证号:SCXK(辽)20030007。骨钙磷及骨源性碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase,BALP)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,IGF-1 购自上海麦仓生物技术有限公司,骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)及 β-actin 抗体购自 Abcam 生物公司,QDR4500w 型双能 X 线骨密度测量仪购自美国 Hologic 公司。

1.2 动物分组及给药

SD 大鼠腹腔注射 1% 的 STZ 溶液(60 mg/kg),48 h 后检测尾静脉血糖 >16.7 mmol/L 即为糖尿病模型。按随机数字表法分为对照组、糖尿病组及 IGF-1 治疗组($n=10$)。参照文献[4],IGF-1 治疗组的糖尿病大鼠按照 1 mg/(kg·d)剂量腹腔注射 IGF-1,对照组的正常 SD 大鼠及糖尿病组的糖尿病大鼠腹腔均注射 PBS。分组处理 3 个月后进行各指标检测。

1.3 血清 BALP 含量检测

以 30 mg/kg 剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,断头取血,以 3 000×g,离心 10 min,分离血清,按照试剂盒操作步骤,以直接紫外法检测血清 BALP 含量。

1.4 胫骨钙磷含量检测

如上述断头处死大鼠后取胫骨,剔除软组织,干燥器中 105 ℃烘至固定重量,记录质量,再置电炉上加热至无烟,最后置于马福炉内,550 ℃灰化 5 h,记录质量,以 20% 稀盐酸溶解粉灰,定容至 25 mL,从中吸取 1.2 mL 稀释至 50 mL,按照试剂盒操作步骤检测胫骨中钙磷含量,并根据 2 次称量结果,计算骨灰占胫骨质量的百分比。

1.5 Western blot 检测胫骨 BMP-2 表达

处死大鼠后,剥离胫骨,切开骨髓腔,以 PBS 冲洗骨髓腔至冲洗 PBS 无红色,锯成小块,液氮冷冻 30 min,取出,研钵中研磨胫骨成粉末,加入蛋白裂解液,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,检测并调节上清液中的蛋白浓度,行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜,以 BMP-2 蛋白及 β-actin 一抗室温下分别孵育 2 h,再以辣根过氧化物酶结合的二抗室温孵育 1 h,以 NCIP/NBT 液显色,利用 Gene Genius 生物图像凝胶分析系统观察分析条带。

1.6 免疫组织化学染色检测 BMP-2 在胫骨的表达

修洁大鼠胫骨,置于 4% 多聚甲醛溶液于 4 ℃固定 48 h,再以 10% 的 EDTA 溶液脱钙,3 d 更换 1 次脱钙液,12 周完全脱钙后,行乙醇梯度脱水、二甲苯透明,按试剂盒说明进行 BMP-2 免疫组化染色后常规 HE 复染,裱片后显微镜下观察。

1.7 胫骨骨密度检测

10% 水合氯醛腹腔注射(3 mL/kg)麻醉大鼠,采用小物体扫描模式测量大鼠胫骨骨密度,准确度 0.01%,扫描速度 60 mm/s,分辨率为 1.0 mm×1.0 mm,精确度变异系数 5%。参照文献[5]的方法,将大鼠置于 X 线摄影仪下拍摄胫骨照片,参数设定为距离 90 cm,电压 40 kV,电流 40 mA。

1.8 影像学观察大鼠胫骨密度

以 30 mg/kg 剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,以 0.3 kV 电压,拍摄股骨 X 线正位片。

1.9 统计处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 统计软件行单因素方差分析,样本均数组间比较采用 LSD 分析。

2 结果

2.1 各组大鼠 BALP 含量

对照组、糖尿病组及 IGF-1 治疗组血清 BALP 含量分别为(2.42±0.56)、(1.54±0.41)及(2.18±0.62)ng/L。糖尿病组 BALP 含量低于对照组($P<0.01$),而 IGF-1 治疗组血清 BALP 含量高于糖尿病组($P<0.01$)。

2.2 各组大鼠胫骨钙磷含量及胫骨骨灰占胫骨质量百分比

与对照组相比,糖尿病大鼠胫骨钙磷含量降低、胫骨骨灰

占胫骨质量百分比也下降(均为 $P<0.01$)。与糖尿病组相比,IGF-1 治疗组大鼠胫骨钙磷含量、胫骨骨灰占胫骨质量百分比均明显升高($P<0.01$,表 1)。

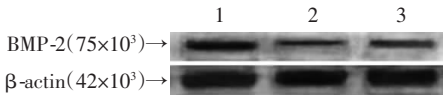
表 1　IGF-1 对糖尿病大鼠胫骨钙磷含量及胫骨骨灰占胫骨质量百分比的影响($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	钙(mol/L)	磷(mol/L)	胫骨灰与胫骨质量比(%)
对照组	5.89±1.21	3.78±0.56	67.21±0.81
糖尿病组	5.41±0.75[a]	3.21±0.47[a]	63.13±0.63[a]
IGF-1 治疗组	5.75±1.05[b]	3.67±0.41[b]	65.81±0.21[b]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与糖尿病组比较

2.3　Western blot 检测 IGF-1 对糖尿病大鼠胫骨 BMP-2 表达的影响

与对照组相比,糖尿病大鼠胫骨 BMP-2 表达减少,而 IGF-1 治疗组的糖尿病大鼠较糖尿病组大鼠胫骨 BMP-2 表达增加(图 1)。



1:对照组;2:糖尿病组;3:IGF-1 治疗组

图 1　Western blot 检测 IGF-1 对糖尿病大鼠胫骨 BMP-2 表达的影响

2.4　免疫组化检测 IGF-1 对糖尿病大鼠胫骨 BMP-2 表达的影响

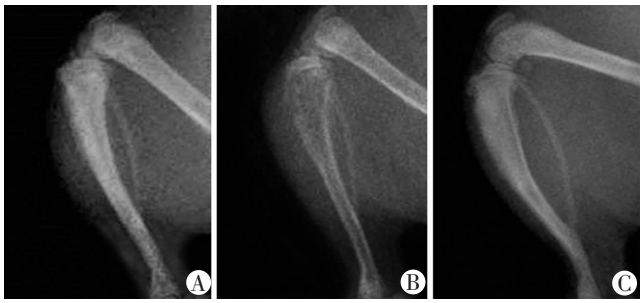
与对照组相比,糖尿病组胫骨 BMP-2 阳性细胞数目明显减少,而 IGF-1 治疗组 BMP-2 阳性细胞数目较糖尿病组明显增加(图 2)。

2.5　IGF-1 对糖尿病大鼠胫骨骨密度的影响

对照组、糖尿病组及 IGF-1 治疗组胫骨骨密度分别为(0.20±0.02)、(0.16±0.01)及(0.18±0.02)g/cm^2。与对照组相比,糖尿病组胫骨密度下降($P<0.01$);与糖尿病组相比,IGF-1 治疗组胫骨骨密度提高($P<0.01$)。

2.6　影像学观察各组大鼠胫骨密度

X 线片结果显示,与对照组相比,糖尿病组大鼠胫骨骨密度降低。与糖尿病组相比,IGF-1 治疗组大鼠胫骨密度有所提高(图 3)。结果提示,IGF-1 能恢复糖尿病大鼠骨密度。



A:对照组;B:糖尿病组;C:IGF-1 治疗组

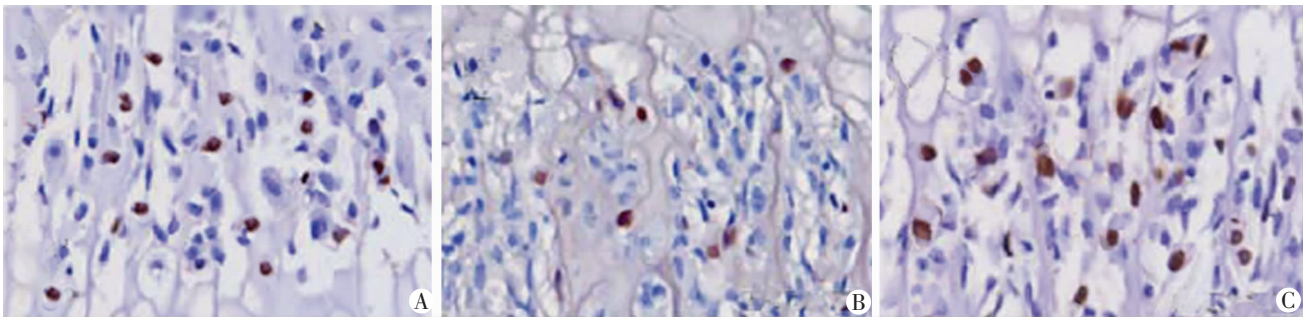
图 3　各组大鼠胫骨骨密度 X 线片表现

3　讨论

糖尿病对机体影响广泛,除了对心、脑、肾等的影响之外也严重影响患者的骨代谢,可导致患者骨质疏松,出现骨组织抗外力能力减弱,易骨折,骨折难以愈合等症状。糖尿病导致的骨质疏松被称为糖尿病骨质疏松症,是一种严重危害人类健康的骨代谢性疾病。自从提出糖尿病与骨质疏松症之间的联系之后[6],糖尿病与骨质疏松之间的关系逐渐受到越来越多的关注。

IGF-1 是骨基质中含量最多的生长因子之一,可结合成骨细胞及破骨细胞上的受体,促进Ⅰ型骨胶原蛋白的合成,抑制胶原酶的合成,酸化骨原细胞和骨基质,利于骨矿化,从而促进骨的形成[1-2]。保持其正常结构功能。IGF-1 血清含量变化对骨细胞的增殖和基质的合成有调节作用。IGF-1 降低与老年原发性骨质疏松,糖尿病骨质疏松,儿童股骨头缺血性坏死(又称为 Legg-Calvé-Perthe 综合征)及激素性骨坏死等疾病有关[7-8]。对其深入研究有利于阐明骨质疏松、骨坏死的发病机制,对最终治愈骨质疏松、骨坏死有重要价值。

IGF-1 主要由肝脏合成,1 型糖尿病及 2 糖尿病时体内 IGF-1 含量明显降低,其含量的降低与糖尿病患



A:对照组;B:糖尿病组;C:IGF-1 治疗组

图 2　免疫组化检测 IGF-1 对糖尿病大鼠胫骨 BMP-2 的表达　(SABC ×200)

者椎骨骨折的高发率密切相关[3-4,9]。本研究发现，糖尿病大鼠胫骨中钙磷含量低、骨灰占胫骨质量百分比以及骨骼密度下降明显，出现了骨质疏松表现，而通过补充外源性IGF-1，明显改善了糖尿病大鼠的骨质疏松症状，糖尿病大鼠骨骼中钙磷含量、骨灰占胫骨质量百分比及骨骼密度均显著改善。因此，IGF-1含量的减少也是导致糖尿病胫骨骨质疏松的重要原因之一。

IGF-1可通过多种分子机制促进成骨细胞分裂，提高成骨细胞活性，并且抑制骨胶原蛋白的降解。IGF-1可上调AKt的表达，增加AKt活性[10-11]，而AKt可以促进BMP-2介导的成骨活动[12]。这可能是本研究中糖尿病大鼠给予IGF-1后，骨骼BMP-2表达增加的重要机制之一。ALP与骨矿化密切相关，但血清总ALP仅50%源于骨组织的BALP，以血清总ALP含量反应成骨活动的特异性并不高，骨质疏松时血清总ALP与BALP变化趋势并不完全一致，甚至可能相反，BALP更能够直接反映成骨活动[13]。因此，本研究检测了BALP的含量变化。研究表明，BMP-2可上调BALP表达[14]。与此类似，本研究也发现IGF-1上调糖尿病大鼠骨骼BMP-2表达的同时，BALP表达明显增加。BALP能水解无机磷酸盐，降低焦磷酸盐浓度，利于骨的矿化，BMP-2除了上调BALP表达，促进成骨活动之外，还能诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化[15-16]。因此，BMP-2及BALP的表达增加，可能是IGF-1抑制糖尿病大鼠骨质疏松的重要分子机制。

本研究以STZ诱导的糖尿病大鼠为研究对象，证实了外源性IGF-1可改善糖尿病大鼠骨质疏松状况，其机制可能与IGF-1恢复糖尿病大鼠骨骼内BMP-2及BALP的表达有关。但IGF-1信号通路复杂，下游分子众多，本研究可能仅揭示了IGF-1抑制糖尿病大鼠胫骨骨质疏松的机制之一，而且糖尿病状态下BMP-2及BALP如何进一步诱导成骨，抑制骨质疏松，仍待探讨。尽管如此，本研究以IGF-1抑制了糖尿病大鼠骨质疏松，为糖尿病骨质疏松患者的临床治疗提供了新的思路。

参考文献：

[1] Gil-Pena H, Garcia-Lopez E, Alvarez-Garcia O, *et al*. Alterations of growth plate and abnormal insulin-like growth factor I metabolism in growth-retarded hypokalemic rats: effect of growth hormone treatment [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(3): F639-F645.

[2] Porter R M, Liu F, Pilapil C, *et al*. Osteogenic potential of reamer irrigator aspirator (RIA) aspirate collected from patients undergoing hip arthroplasty[J]. J Orthop Res, 2009, 27(1): 42-49.

[3] Shinada M, Akdeniz A, Panagiotopoulos S, *et al*. Proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 is increased in urine from patients with diabetic nephropathy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(3): 1163-1169.

[4] Fowlkes J L, Nyman J S, Bunn R C, *et al*. Osteo-promoting effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) in a mouse model of type 1 diabetes[J]. Bone, 2013, 57(1): 36-40.

[5] 张俊山，田发明，康玉川，等. 高生物涂层局部应用辛伐他汀对大鼠骨质疏松性骨折愈合的影响[J]. 第三军医大学学报，2013，35(12)：1274-1278.

[6] Leidig-Bruckner G, Ziegler R. Diabetes mellitus a risk for osteoporosis? [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001, 109(Suppl 2): S493-S514.

[7] Li Y K, Wang H, Zhu X W, *et al*. The polymorphism of Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is related to osteoporosis and bone mineral density in postmenopausal population[J]. Pak J Med Sci, 2014, 30(1): 131-135.

[8] Crane J L, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation[J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(2): 107-115.

[9] Ardawi M S, Akhbar D H, Alshaikh A, *et al*. Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes[J]. Bone, 2013, 56(2): 355-362.

[10] Sandri M, Barberi L, Bijlsma A Y, *et al*. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway[J]. Biogerontology, 2013, 14(3): 303-323.

[11] Jia L, Li Y F, Wu G F, *et al*. MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway [J]. Int J Mol Sci, 2013, 15(1): 296-308.

[12] Mukherjee A, Rotwein P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 5): 716-726.

[13] 杜志斌，陈江，黄文秀，等. 辛伐他汀对骨质疏松大鼠骨代谢的影响[J]. 中华口腔医学研究杂志：电子版，2008，2(1)：46-51.

[14] Wang L, Park P, La-Marca F, *et al*. Bone formation induced by BMP-2 in human osteosarcoma cells[J]. Int J Oncol, 2013, 43(4): 1095-1102.

[15] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, *et al*. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation[J]. J Biol Chem, 2008, 283(43): 29119-29125.

[16] 王霖霞，李玉坤. BMP-2信号通路与成骨细胞分化[J]. 国际骨科学杂志，2009，30(2)：132-133，136.

（**收稿**：2014-04-09；**修回**：2014-06-12）

（编辑　栾　嘉）