

1 型糖尿病小鼠钙磷代谢研究

姜爱玲, 刁腾月, 潘海, 张岩

(上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 通过对1型糖尿病小鼠模型的研究,检测其尿液、血清、骨骼中钙、磷含量.腹腔注射链脲佐菌素(40 mg/kg),连续5 d,诱导糖尿病小鼠模型.使用钙、磷试剂盒检测血清、尿液、骨骼中的钙、磷含量.糖尿病小鼠血磷升高($P < 0.05$),尿磷降低($P < 0.05$),尿钙升高($P < 0.05$).股骨中钙、磷($P < 0.05$)含量较正常组降低,胫骨中钙含量降低($P < 0.05$).研究表明,高血糖引起尿钙流失增加,继而导致骨骼钙溶出增加,骨钙含量降低.另外,高血糖引起尿磷排泄减少,从而导致高血磷状态.

关键词: 糖尿病; 钙; 磷; 骨

中图分类号: R 335

文献标志码: A

Calcium-Phosphorus Metabolism of Type 1 Diabetic Mice

JIANG Ailing, DIAO Tengyue, PAN Hai, ZHANG Yan

(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for
Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: The contents of calcium and phosphorus in urine, serum, and bone of mice with type 1 diabetes were investigated. The streptozotocin was injected into the mice intraperitoneally at 40 mg/kg of body weight for 5 consecutive days to induce diabetic models. The contents of calcium and phosphorus were detected by calcium and phosphorus detection kits respectively. In the mice with diabetes mellitus, serum phosphorus ascends ($P < 0.05$), urinary phosphorus descends ($P < 0.05$), and urinary calcium ascends ($P < 0.05$). Calcium ($P < 0.05$) and phosphorus ($P < 0.05$) in femur and calcium ($P < 0.05$) in tibia both descend. Thus, the hyperglycemia leads to the increasing loss of calcium in urine and bone, consequently induces the decrease of bone calcium content. In addition, the hyperglycemia leads to the decreased level of urinary phosphorus, and then induces the hyperphosphatemia status.

Key words: diabetes mellitus; calcium; phosphorus; bone

收稿日期: 2014-05-22

基金项目: 上海市教委科研创新重点资助项目(11ZZ137)

第一作者: 姜爱玲(1992-),女,硕士研究生.研究方向:骨生物学. E-mail:454463884@qq.com

通信作者: 张岩(1978-),男,副教授.研究方向:骨生物学、骨内分泌代谢. E-mail:medicineyan@aliyun.com

Albright 于 1948 年首先报道了长期糖尿病患者可诱发骨质疏松. 经过近 30 年的研究, 发现糖尿病病人骨折的发生率明显增高, 骨折愈合缓慢^[1-2]. 1976 年光子吸收法测量骨密度技术的问世, 为日益突出的糖尿病引发骨量减少的检测提供技术基础^[3]. 钙、磷对动物体新陈代谢和生长发育起重要作用, 钙是动物骨中含量最多的无机矿质元素, 是构成动物骨骼的主要成分. 绝大部分钙和磷形成骨中矿物盐的主体羟基磷灰石及无定形的胶体磷酸钙, 与胶原结合共同沉积于骨骼中, 维持其正常力学性能^[4].

临床研究显示, 1 型糖尿病能够诱导骨矿含量降低^[5], 而对于 1 型糖尿病动物的分子生物学检测发现, 小肠、肾脏负责钙主动转运的蛋白分子含量降低^[6], 因此, 可以推断 1 型糖尿病诱发体内钙、磷代谢异常, 并对骨组织产生损伤, 影响骨矿正常的生理代谢. 基于此, 本研究通过构建 1 型糖尿病小鼠模型, 探究其体内的钙、磷代谢, 从而能更好地理解 1 型糖尿病性骨质疏松症的病理进程.

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器、实验动物

实验使用的主要试剂、仪器为: 钙、磷、肌酐试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司, 中国); 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ; sigma 公司, 美国); 戊巴比妥钠(sigma 公司, 美国); 血糖仪(OneTouch UltraEasy, 美国); 酶标仪(Bio-Tek, 美国); 马弗炉(Vulcan3-550, 美国); 离心机(Eppendorf, 德国); 超低温冰箱(New Brunswick, 英国).

DBA/2J 小鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供. 动物合格证号: 2007000524918; 许可证号: SCXK(沪)2007-0005. 动物自由摄食、饮水, 于实验室环境(温度 26 ± 2 °C, 相对湿度 50%~60%, 光照/黑暗交替 12 h)适应 1 周后, 开始实验. 伦理批准文号: 10PJ1407700.

1.2 动物模型建立及分组

采用 10 周龄雄性 DBA/2J 小鼠建立糖尿病模型. 取 10 只小鼠作为正常对照组; 另 10 只小鼠腹腔注射 STZ(40 mg/kg), 持续注射 5 d, 每次注射前禁食 4 h. 注射完成 1 周后, 尾部取血, 使用血糖仪测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG), FBG 高于 9 mmol/L 被认为是糖尿病小鼠. 实验期间以及处死

动物前, 监测小鼠 FBG.

1.3 样本收集

STZ 注射 8 周后, 使用小鼠代谢笼收集尿液, 并于 -80 °C 保存. 使用 0.9% 的生理盐水配制戊巴比妥钠溶液, 以 50 mg/kg 体重的剂量进行腹腔注射. 小鼠麻醉后, 经摘眼眶取血, 放于 1.5 mL 离心管, 室温静置 1 h, 于 4 °C、5 600 rpm 转速下离心 6 min, 取上层血清, 于 -80 °C 保存; 取小鼠胫骨和股骨, 剔除肌肉和结缔组织, 放在 1.5 mL 的离心管内, -20 °C 保存, 用于骨骼钙、磷含量测定.

1.4 尿液、血清钙磷含量测定

将尿液和血清从 -80 °C 超低温冰箱取出, 室温放置、复温, 待全部融化后, 经混匀、短暂离心后, 使用钙、磷、肌酐试剂盒测定尿液与血清中相应指标的浓度, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行.

1.5 骨骼钙磷含量测定

1.5.1 样品溶液的制备

60 °C 烘烤样品 72 h 到恒重, 之后在马弗炉中 800 °C 煅烧 6 h, 待充分冷却后, 称灰重. 每份样品取出一半骨灰量, 用 6 mol/L 的盐酸溶液溶解, 稀释 20 倍配成待测溶液.

1.5.2 钙磷浓度测定

同尿液、血清钙磷含量测定方法.

1.6 数据分析

实验数据以 Mean $\pm$ SEM 表示. 使用 t 检验组间差异, $P < 0.05$ 表明两组间有显著差异.

2 实验结果

2.1 小鼠空腹血糖水平

在 STZ 注射后 1 周、5 周、8 周 3 个时间点, 正常对照组小鼠空腹血糖值都处于正常水平, 而 STZ 注射组小鼠空腹血糖值都高于 9 mmol/L, 并且随时间延续, 血糖值逐步升高, 被认为是高血糖模型成功, 结果如表 1 所示.

表 1 空腹血糖水平 (Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)

Tab.1 Level of fasting blood glucose
(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)

检测时间	正常对照组血糖/ (mmol $\cdot$ L ⁻¹)	糖尿病组血糖/ (mmol $\cdot$ L ⁻¹)
STZ 注射后 1 周	7.2 $\pm$ 0.4	12.5 $\pm$ 1.6
STZ 注射后 5 周	8.2 $\pm$ 0.3	19.8 $\pm$ 3.8
STZ 注射后 8 周	8.5 $\pm$ 0.6	27.7 $\pm$ 1.9

2.2 尿液中钙、磷水平

与正常对照组相比,糖尿病小鼠尿磷排泄降低($P < 0.05$),而尿钙水平显著升高($P < 0.05$),结果如表2所示。

表2 尿液中钙磷水平(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)
Tab.2 Calcium and phosphorus levels in urine
(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)

检测指标	正常对照组	糖尿病组
P/Cr (mg/mg)	0.37 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.06 *
Ca/Cr (mg/mg)	0.04 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02 *

* $P < 0.05$, vs. 正常对照组

2.3 血清中钙、磷水平

与对照组相比,糖尿病小鼠血磷水平明显升高($P < 0.05$),结果如表3所示。

表3 血清中钙磷水平(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)
Tab.3 Calcium and phosphorus levels in serum
(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)

检测指标	正常对照组	糖尿病组
P (mg/dL)	10.93 $\pm$ 0.30	12.27 $\pm$ 0.50 *
Ca (mg/dL)	9.00 $\pm$ 0.24	8.94 $\pm$ 0.44

* $P < 0.05$, vs. 正常对照组

2.4 骨骼灰分钙磷水平

对骨骼灰分的检测结果显示,糖尿病组胫骨($P < 0.05$)和股骨($P < 0.05$)Ca含量均显著低于对照组,股骨($P < 0.05$)磷含量显著低于对照组,结果如表4所示。

表4 骨骼灰分钙磷水平(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)
Tab.4 Calcium and phosphorus levels in bone ash
(Mean $\pm$ SEM, $n = 10$)

检测指标	正常对照组	糖尿病组
胫骨 P (mg/mg)	0.097 $\pm$ 0.002	0.090 $\pm$ 0.002
胫骨 Ca (mg/mg)	0.241 $\pm$ 0.005	0.208 $\pm$ 0.024 *
股骨 P (mg/mg)	0.087 $\pm$ 0.005	0.071 $\pm$ 0.009 *
股骨 Ca (mg/mg)	0.233 $\pm$ 0.055	0.202 $\pm$ 0.005 *

* $P < 0.05$, vs. 正常对照组

3 讨论

本实验显示,1型糖尿病小鼠尿磷降低,血磷升高,这与患1型糖尿病的青少年的临床研究结果相一致^[7]。这可能是由于长病程糖尿病易导致肾脏疾病,引起肾损伤,肾排磷减少,导致血磷升高。对基因敲除小鼠研究也证实了高磷血症加剧糖尿病肾病^[8]。这提示在对糖尿病患者治疗中应兼顾肾脏疾

病的监测。

糖尿病组中高尿钙的出现,则是由于患者体内的血糖处于高水平,出现高渗透利尿状况,导致尿钙含量升高。高尿钙可以导致维生素D代谢异常,进而导致1型糖尿病小鼠肾脏钙转运蛋白表达降低^[9]。临床研究显示,1型糖尿病患者血清胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的含量和活性都降低,同时,骨矿含量降低^[10]。钙负平衡导致继发性甲状旁腺功能亢进,甲状旁腺激素分泌增多,刺激破骨细胞分化,骨吸收增强^[11-12]。同时,血磷增加会促进血钙向骨组织转移并沉积,而高血磷还会抑制肾近曲小管细胞线粒体中的1- α 羟化酶的活性,使肾内活性维生素D合成和分泌减少,降低了肠道钙吸收功能。在以上两方面作用下,血清中钙离子水平下降,从而阻碍骨形成和骨组织矿化^[13]。

通过对小鼠骨钙磷含量的检测,可看出1型糖尿病小鼠由于高血糖渗透利尿导致钙、磷代谢异常,最终导致骨骼中钙磷含量降低。钙、磷是骨基质的主要组成成分,在合理控制糖尿病患者血糖的同时,应及时检测其钙、磷水平,加强对糖尿病性骨质疏松症的预防。

参考文献:

- [1] 郭英,李茵茵. 糖尿病并发骨质疏松症的研究进展[J]. 临床荟萃,2004,19(22):1312-1314.
- [2] Takamoto I, Kadowaki T. Diabetes and osteoporosis[J]. Clinical Calcium,2004,14(2):255-261.
- [3] 马玉琢,王东岳,赵刚. 单光子吸收法测量骨密度的临床应用[J]. 山东医药,1990,30(7):14-15.
- [4] 王剑,王栋,何建平,等. 口服补钙对甘肃鼯鼠钙磷代谢的影响[J]. 动物学杂志,2010,45(4):46-51.
- [5] Khan T S, Fraser L A. Type 1 diabetes and osteoporosis: from molecular pathways to bone phenotype[J]. Journal of Osteoporosis,2015,2015:174186.
- [6] Zhang Y, Diao T Y, Wang L, et al. Protective effects of water fraction of fructus ligustri lucidi extract against hypercalciuria and trabecular bone deterioration in experimentally type 1 diabetic mice [J]. Journal of Ethnopharmacology,2014,158(Part A):239-245.
- [7] Hamed E A, Abu Faddan N H, Adb Elhafeez H A, et al. Parathormone-25(OH)-vitamin D axis and bone status in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus [J]. Pediatric Diabetes,2011,12(6):536-546.
- [8] Taketani Y, Shuto E, Arai H, et al. Advantage of a low glycemic index and low phosphate diet on diabetic

- nephropathy and aging-related diseases [J]. The Journal of Medical Investigation, 2007, 54(3/4): 359 - 365.
- [9] Zhang Y, Papasian C J, Deng H W. Alteration of vitamin D metabolic enzyme expression and calcium transporter abundance in kidney involved in type 1 diabetes-induced bone loss[J]. Osteoporosis International, 2011, 22(6): 1781 - 1788.
- [10] Joshi A, Varthakavi P, Chadha M, et al. A study of bone mineral density and its determinants in type 1 diabetes mellitus [J]. Journal of Osteoporosis, 2013, 2013: 397 - 814.
- [11] 冯玉欣, 逢力男. 糖尿病与骨质疏松的研究进展[J]. 国外医学内分泌学分册, 1999, 19(3): 132 - 133.
- [12] 谈志龙, 任海龙, 白人晓, 等. 骨质疏松症与骨代谢生化测定指标[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006, 12(1): 92 - 96.
- [13] 邱明琪, 姜欣. 内分泌代谢疾病与骨质疏松研究进展[J]. 实用临床医学, 2006, 7(9): 164 - 168.
- (编辑: 丁红艺)

(上接第 567 页)

- [6] Paul S S, Rimiston S J, Tachie M F. Experimental and numerical investigation of turbulent cross-flow in a staggered tube bundle [J]. International Journal of Heat and Fluid Flow, 2008, 29(2): 387 - 414.
- [7] 杨莱, 叶建军, 邹宽, 等. 横掠管束非稳态周期性充分发展流动的数值模拟[J]. 西安交通大学学报, 2001, 35(11): 1122 - 1125.
- [8] 潘维, 池作和, 斯东波, 等. 匀速流体横掠管束的流场数值模拟[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2004, 38(8): 1043 - 1046.
- [9] Khan W A, Culham J R, Yovanovich M M. Convection heat transfer from tube banks in crossflow: analytical approach[J]. International Journal of Heat and Mass Transfer, 2006, 49(25/26): 4831 - 4838.
- [10] 杨莱, 黄夫泉, 章立新, 等. 水平板自然对流换热的非线性特性[J]. 工程热物理学报, 2008, 29(2): 275 - 277.
- [11] 王治云. 开口腔内耦合换热的模拟及其解的非线性分析[D]. 上海: 上海理工大学, 2011.
- [12] 张昆. 圆筒内开缝圆筒自然对流及非线性特性[D]. 上海: 上海理工大学, 2011.
- [13] Grimson E D. Correlation and utilization of new data on flow resistance and heat transfer for cross flow of gases over tube banks[J]. Transactions of the ASME, 1937, 59: 583 - 594.
- [14] Zhang Y W, Chen Z Q. The effect of a gap between layers on the heat transfer performance of aligned tube banks[J]. Heat Transfer Engineering, 1992, 13(2): 33 - 41.
- [15] 申春赞, 杨莱, 王津, 等. 圆内开缝圆不同开缝方向自然对流换热[J]. 上海理工大学学报, 2013, 35(5): 425 - 429.
- [16] Hausen H. Heat transfer in counterflow, parallel flow, and cross-flow[M]. New York: McGraw-Hill Inc, 1983.
- (编辑: 丁红艺)