

# 糖松康合剂对糖尿病性骨质疏松大鼠的治疗作用 及其对 IGF-1 和 GLP-1 表达的影响

张贤梅<sup>1</sup> 孙勤国<sup>1</sup> 江波<sup>1</sup> 余福安<sup>1</sup> 谢谢<sup>1</sup> 从泽伟<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨糖松康合剂对糖尿病性骨质疏松大鼠的治疗作用及其对胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和胰高血糖素样多肽-1(GLP-1)表达的影响。**方法:**采用高脂饮食联合多次小剂量链脲佐菌素腹腔注射的方法建立糖尿病骨质疏松模型,将模型 SD 大鼠随机分为 3 组。模型组(12 只)高脂饮食,不给予任何药物;糖松康组(10 只)高脂饮食,糖松康合剂 1.6 g/kg 灌胃给药;骨化三醇组(10 只)即阳性对照组,高脂饮食,骨化三醇 0.04  $\mu\text{g/kg}$  灌胃给药。3 组均用甘精胰岛素控制血糖,另设正常对照组(8 只),普通饮食,不给予任何药物。检测大鼠体质量、血糖,观察精神、饮食、尿量等一般情况,干预 6 周后,采血常规检测血钙、血磷、血镁、肝肾功能等生化指标,双能 X 线检测各组大鼠全身骨密度,ELISA 法检测各组 IGF-1 和 GLP-1 的表达。**结果:**较正常组比较,模型组表现明显多饮多食多尿消瘦症状,全身骨密度减低,差异有统计学意义( $P=0.045$ ),呈现低钙、低磷、低镁等电解质代谢紊乱现象,IGF-1 和 GLP-1 表达减低,差异有统计学意义( $P=0.039$ ,  $P=0.047$ );糖松康组血钙、血磷、血镁含量上升,IGF-1 和 GLP-1 表达较模型组升高,差异有统计学意义( $P=0.026$ ,  $P=0.049$ ),且高于骨化三醇组,差异无统计学意义( $P=0.056$ )。**结论:**糖松康合剂对糖尿病性骨质疏松有一定疗效,且其作用机制与调节 IGF-1 和 GLP-1 的表达有关。

**[关键词]** 糖松康合剂;糖尿病性骨质疏松;胰岛素样生长因子-1;胰高血糖素样多肽-1

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)09-0005-04

## Therapeutic Effect of Tangsongkang Mixture on Diabetic Osteoporosis Rats and Expression of Insulin-like Growth Factor-1 and Glucagon-like Polypeptide-1

ZHANG Xianmei<sup>1</sup> SUN Qinguo<sup>1</sup> JIANG Bo<sup>1</sup> YU Fuan<sup>2</sup> XIE Xie<sup>1</sup> CONG Zerwei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China.

**Abstract Objective:** To investigate the therapeutic effect of Tangsongkang mixture on diabetic osteoporosis rats and the expression of IGF-1 and GLP-1. **Methods:** Diabetic osteoporosis model was established by intraperitoneal injection of high-fat diet combined with multiple low-dose streptozotocin. Model SD rats were randomly divided into 3 groups: model group (12 rats): high-fat diet, no medication was given; Tangsongkang mixture group (10 rats): high fat-diet, Tangsongkang mixture intragastric administration at 1.6 g/kg; calcitriol group (10 rats), that is, positive control group: high-fat diet, intragastric administration at 0.04  $\mu\text{g/kg}$ . The three groups were treated with insulin glargine to control blood glucose, and normal control group (8 rats): normal diet, no medication was given. The body weight and blood glucose were measured, and the general conditions such as spirit, diet, and urine volume were observed. After 6 weeks of intervention, biochemical parameters such as serum calcium, phosphorus, magnesium, and liver and kidney function were measured by routine blood detection sampling. Dual energy X-ray measurement was performed in each group to examine the bone mineral density of rats. The expression of IGF-1 and GLP-1 was detected by ELISA. **Results:** Compared with the normal group, the model group showed obvious polydipsia, polyphagia, polyuria and weight loss ( $P=0.045$ ). It showed electrolyte metabolism disorder such as low calcium, low phosphorus, and low magnesium. The expression of IGF-1 and GLP-1 was decreased ( $P=0.039$ ,  $P=0.047$ , respectively). The levels of serum calcium, phosphorus, and magnesium in the Tangsongkang group in-

creased, and the expressions of IGF-1 and GLP-1 were higher than those in the model group ( $P=0.026$ ,  $P=0.049$ ), statistically significant, and higher than the calcitriol group

( $P=0.056$ ). **Conclusion:** Tangsongkang Mixture has a certain therapeutic effect on diabetic osteoporosis, and the mechanism of action is related to the expression of IGF-1 and GLP-1.

**Keywords:** Tangsongkang mixture; diabetic osteoporosis; insulin-like growth factor-1; glucagon-like peptide-1

糖尿病性骨质疏松(Diabetic Osteoporosis, DOP)是糖尿病严重慢性并发症,胰岛素样生长因子-1(Insulin-like Growth Factor-1, IGF-1)和胰高血糖素样多肽-1(Glucagon-like Peptide1, GLP-1)是骨代谢的重要因子,在DOP的发生和发展中具有重要作用<sup>[1,2]</sup>,中药在提高DOP患者骨密度、缓解骨痛等方面具有明显优势<sup>[3]</sup>。糖松康合剂是补肾健骨的经验方,在长期大量临床工作中总结其在改善患者骨骼疼痛、增加骨密度、维生素D水平等方面有明显疗效,但其作用机制不明。本课题建立DOP模型,用糖松康合剂干预模型大鼠,常规检测各组大鼠肝肾功能、血钙、血磷、血镁生化指标,双能X线吸收测定法(Dualenergy X-ray Absorptiometry, DXA)测定大鼠全身骨密度,ELISA法检测大鼠血清IGF-1和GLP-1表达,探讨糖松康合剂对DOP的疗效及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级SD大鼠(雄性,体质量180~200 g,50只)及饲料,购买于湖北省实验动物研究中心(SCXK鄂2008-0005),喂养于本院实验动物中心(SYXK鄂2014-0080)。

### 1.2 实验药物及试剂

糖松康合剂(生龙骨30 g,生牡蛎30 g,桑寄生10 g,续断10 g,淫羊藿10 g,黄柏10 g,天花粉10 g,湖北天济中药饮片有限公司)由本科拟方,本院药剂科煎制,骨化三醇胶丸(青岛正大海尔制药有限公司,批号1407281),血糖仪及试纸(强生稳豪型),链脲佐菌素(Sigma公司),IGF-1及GLP-1 ELISA试剂盒(武汉市华美生物工程有限公司,CSB-E12800r,CSB-E04582r)。

### 1.3 实验仪器

大鼠常规生化指标由本院检验科检测,全自动生化分析仪(AU-5400,贝克曼公司),酶标仪(深圳雷社生命科学股份有限公司),台式离心机(珠海黑马医学仪器公司),双能X线骨密度仪(USA)。

### 1.4 方法

**1.4.1 DOP模型的建立<sup>[4,5]</sup>** 将SPF级大鼠随机分两组:正常组(8只)普食(玉米30%,小麦粉21%,豆粕20%,麸皮16%,鱼粉8%,酵母粉2.5%,骨粉1.5%,植物油0.3%,盐0.5%,多维生素0.2%),造模组(42只)高脂饮食(普通饲料50%,猪油16%,蔗糖12%,蛋黄12%,奶粉5%,花生4%,麻油0.5%,盐0.5%),适应性喂养2周后,模型组30 mg/kg腹腔注射3% STZ,1次/d,连续6次,

正常组腹腔注射同等剂量0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液。每周检测血糖1次,以随机血糖 $\geq 16.7$  mmol/L者视为糖尿病模型成功,第9周结束后乙醚麻醉双能X线检测大鼠全身骨密度下降者纳入实验。

**1.4.2 实验分组及给药** 正常对照组(8只)普通饮食,不给予任何药物干预;模型组(12只)高脂饮食,不给予任何药物;糖松康组(10只)高脂饮食,给予糖松康合剂干药计量1.6 g/kg给药;骨化三醇组(10只)即阳性对照组,高脂饮食给予骨化三醇生理盐水稀释后以0.04  $\mu$ g/kg给药。后3组均用甘精胰岛素皮下注射控制血糖,使随机血糖波动在11.1 mmol/L上下,1次/d。均灌胃给药,1次/d,连续6周。

**1.4.3 大鼠一般观察、全身骨密度及常规生化检测** 主要观察造模期间及药物干预后大鼠精神、饮食、尿量情况,检测体质量、血糖,药物干预6周后乙醚麻醉,双能X线检测骨密度(BMD),断颈处死耳后静脉取血,检测肝肾功能、血钙(Ca)、血磷(P)、血镁(Mg)常规生化指标。

**1.4.4 ELISA法检测IGF-1及IGF-1的表达** 按照ELISA试剂盒说明进行:将血标本以4 000 r/min,10 min离心,取上清,放4℃冰箱,标准品倍比稀释,标准曲线合格后待测样品加样,设空白对照孔,100  $\mu$ L/孔,覆膜,37℃孵育1.5 h,倒掉液体,加入稀释的抗体工作液,100  $\mu$ L/孔,覆膜,37℃孵育1 h,倒掉液体,洗板3次,吸干孔内液体,加入酸辣跟过氧化物酶工作液,100  $\mu$ L/孔,覆膜,37℃孵育0.5 h,洗板5次,加入底物溶液,100  $\mu$ L/孔,覆膜,37℃孵育15 min,直至标准孔呈梯度呈色后加入终止液,50  $\mu$ L/孔,用酶标仪450 nm波长检测OD值,记录数值,根据标准曲线换算得出各组IGF-1和IGF-1的含量。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS16.0软件对所得数据进行统计处理,计量数据资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间的两两比较采用独立样本 $t$ 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况观察

正常组大鼠相对安静、温顺,毛发白皙、顺华、有光泽,无异味,见图1A。模型组大鼠表现出明显的“三多一少”(多饮、多食、多尿、消瘦)症状,精神差,时躁动,体形瘦小,毛发脏乱,有较浓的异味,见图1B。药物干预后,骨化三醇组和糖松康组多饮多食多尿症状稍好转,形体、精神、毛发改变不明显。

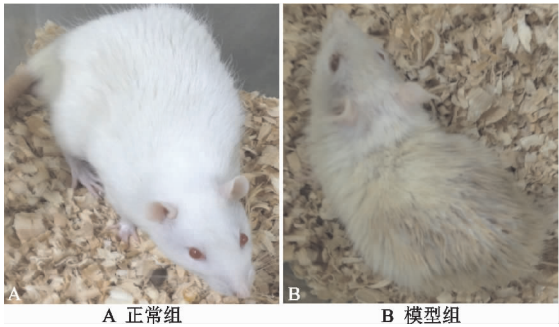


图 1 正常组与模型组大鼠一般情况观察

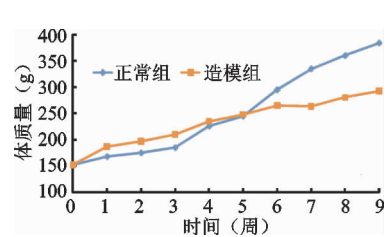


图 2 造模过程中大鼠平均体质量变化趋势

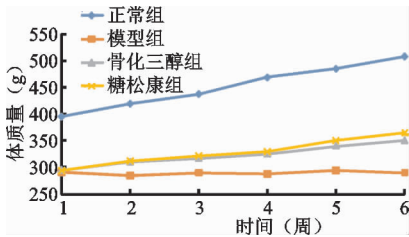


图 3 药物干预后各组大鼠平均体质量变化趋势

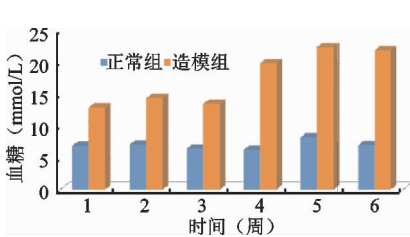


图 4 造模后大鼠血糖变化情况

2.3 各组常规生化指标检测结果

较正常组比较,模型组尿素(Urea)、谷草转氨酶(Ast)、谷丙转氨酶(Alt)稍升高,血钙、血磷及血镁下降;骨化三醇组和糖松康组两治疗组尿素、肌酐

2.2 大鼠体质量、血糖的变化

正常组大鼠平均体质量平稳增长,模型组 5 周前较正常组增长快,5 周后增长速度下降,低于正常组,与正常组形成“剪刀差”样的整体趋势(见图 2)。药物干预后骨化三醇组与糖松康组平均体质量增速缓慢,高于模型组,模型组体质量呈下降趋势(见图 3)。造模后血糖明显升高,4 周后血糖均值超过 20 mmol/L(见图 4)。

(Cre)、谷草转氨酶及谷丙转氨酶较正常组差异无统计学意义( $P>0.05$ );两治疗组血钙、血磷及血镁有所上升,糖松康组明显,且差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 1。

表 1 各组大鼠常规生化指标对比( $\bar{x}\pm s$ )

分组	Urea(mmol/L)	Cre( $\mu$ mol/L)	Ast(IU/L)	Alt(IU/L)	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	Mg(mmol/L)
正常组	6.30 $\pm$ 0.32	37.98 $\pm$ 2.33	147.70 $\pm$ 31.71	42.74 $\pm$ 9.56	2.78 $\pm$ 0.08	3.31 $\pm$ 0.51	1.16 $\pm$ 0.12
模型组	6.43 $\pm$ 0.66 <sup>1)</sup>	27.30 $\pm$ 1.04 <sup>1)</sup>	151.43 $\pm$ 35.09	44.90 $\pm$ 10.00	2.73 $\pm$ 0.04	2.92 $\pm$ 0.32 <sup>1)</sup>	1.11 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>
骨化三醇组	6.23 $\pm$ 1.08 <sup>2)</sup>	25.50 $\pm$ 7.39	138.03 $\pm$ 30.82	46.97 $\pm$ 20.15	2.80 $\pm$ 0.28 <sup>2)</sup>	3.00 $\pm$ 0.85	1.07 $\pm$ 0.14
糖松康组	6.26 $\pm$ 0.92	28.80 $\pm$ 6.61	132.22 $\pm$ 13.25 <sup>3)</sup>	48.40 $\pm$ 17.75	2.82 $\pm$ 0.19 <sup>3)</sup>	3.23 $\pm$ 0.46 <sup>3)</sup>	1.31 $\pm$ 0.37 <sup>3)</sup>

注:1)模型组的 Urea,Cre,P 及 Mg 与正常组比较  $P<0.05$ ( $P$  值依次为 0.037,0.047,0.023,0.049);2)骨化三醇的 Urea 和 Ca 与模型组比较, $P<0.05$ ( $P$  值依次为 0.029,0.043);3)糖松康组 Ast,Ca,P 及 Mg 与模型组比较, $P<0.05$ ( $P$  值依次为 0.038,0.046,0.036,0.042)。

2.4 各组大鼠 BMD 及血清 IGF-1 和 GLP-1 的表达情况

与正常组比较,模型组 BMD,IGF-1 及 GLP-1 均有所下降,且差异有统计学意义( $P<0.05$ );骨化三醇

及糖松康合剂治疗后,相应指标数值上升,糖松康组上升明显,与模型组比较,糖松康组 GLP-1 和 IGF-1 的表达量升高明显,且差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 各组 BMD 及血清 IGF-1 和 IGF-1 的表达情况( $\bar{x}\pm s$ )

分组	BMD(g/cm <sup>2</sup> )	GLP-1(pg/mL)	IGF-1(ng/mL)
正常组	0.20 $\pm$ 0.02	141.35 $\pm$ 28.49	1 843.06 $\pm$ 259.04
模型组	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	55.86 $\pm$ 16.87 <sup>1)</sup>	519.53 $\pm$ 248.53 <sup>1)</sup>
骨化三醇组	0.17 $\pm$ 0.01	91.14 $\pm$ 16.50 <sup>2)</sup>	815.29 $\pm$ 302.81
糖松康组	0.18 $\pm$ 0.03	116.42 $\pm$ 25.80 <sup>3)</sup>	1 138.39 $\pm$ 764.86 <sup>3)</sup>

注:1)模型组 BMD,GLP-1 及 IGF-1 与正常组比较, $P<0.05$ ( $P$  值依次为 0.045,0.039,0.047);2)骨化三醇组 GLP-1 与模型组比较, $P<0.05$ ( $P=0.041$ );3)糖松康组 GLP-1 和 IGF-1 与模型组比较, $P<0.05$ ( $P$  值依次为 0.026,0.049)。

3 讨论

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,长期高血糖状态,一方面引起渗透性利尿,可使钙、磷、镁等物质排出增加,肾血流动力学改变影响肾小管对钙、磷、镁的重吸收,最终出现低钙、低镁、低磷现象,引起

骨矿物代谢紊乱;另一方面,高血糖增加破骨细胞活性,影响成骨细胞功能,导致骨吸收增加,骨形成减少,骨细胞功能下降,出现骨质疏松,易发骨折<sup>[6,7]</sup>。IGF-1 是骨骼细胞分泌的重要因子,其作用于骨原细胞,刺激 DNA 合成,增加成骨细胞的数目,同时可通过抑制

骨胶原降解而调节骨吸收,维持骨量的平衡,是维持成骨细胞与破骨细胞之间平衡最重要的生长因子,还可刺激细胞摄取氨基酸合成胶原从而促进骨矿化可促进骨转换<sup>[2,8]</sup>。GLP-1 对骨代谢具有正性作用,是一种新型同时具有抑制骨吸收和增加骨形成调节作用的肠促胰素,GLP-1 及其类似物应用于临床,不仅可控制血糖,还可影响骨质代谢,减缓糖尿病所致的骨质疏松,对骨质具有保护作用<sup>[9,10]</sup>。本课题通过建立 DOP 模型,检测发现模型大鼠骨密度下降,出现明显低钙、低磷及低镁现象,IGF-1 和 GLP-1 表达明显下降,与前期诸多研究是一致的,糖松康合剂干预后与模型组比较,大鼠全身骨密度及血钙、血磷、血镁上升,IGF-1 和 GLP-1 表达明显,且差异有统计学意义,未出现明显肝肾功能损害,表明糖松康合剂对 DOP 模型大鼠有一定疗效且安全,其作用机制可能与调节骨矿物代谢及 IGF-1 和 GLP-1 表达有关。

糖松康合剂中生龙骨、生牡蛎用量各 30 g 为君药,养阴潜阳,补肾益精,符合“消渴”阴虚燥热之病机,同时兼顾“骨萎”肾精亏虚为主之机理,桑寄生、续断、淫羊藿补益肝肾,强筋健骨为臣药,助君药之力,加强补肾健骨充髓之效,同时桑寄生具有益血通络之功,治疗久病入络成瘀,黄柏、天花粉性偏寒,养阴清热,为使药,黄柏入肾经,清虚热,天花粉又能生津止渴,一方面能辅助君药加强养阴润燥效果,另一方面防止方中温补太过,更加灼伤津液,达到寒热并用,阴平阳秘的目的,全方以补肾健骨为主,兼顾养阴清热。现代药理学研究显示生龙骨、生牡蛎含有碳酸钙、磷酸钙,少量铁、镁、锌、钾、钠等,对血管、肾脏有保护作用,能提高免疫力。桑寄生含有黄酮类、维生素、微量元素等有效成分,具有加强肝脏的葡萄糖代谢,提高肝细胞对胰岛素敏感性作用,同时对骨关节、血管均具有保护作用<sup>[11]</sup>。续断的有效成分续断皂苷可诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,增加大鼠骨密度,降低骨转换率,提高股骨强度<sup>[12]</sup>。蒋俊等<sup>[13]</sup>总结淫羊藿有效成分淫羊藿总黄酮、淫羊藿苷、宝藿苷 I 及淫羊藿素具有较强的抗骨质疏松作用。黄柏有效成分皮中小檗碱和天花粉乙酸乙酯提取物和凝集素粗品具有较强的降糖作用,黄柏提取物对关节软骨、胶原纤维和蛋白多糖的代

谢均有明显的影响<sup>[14,15]</sup>。综上所述,糖松康合剂中有有效成分对“消渴”“骨萎”有治疗作用,其作用机制与糖松康合剂中药效成分调节 IGF-1 和 GLP-1 活性有关,其具体信号通路有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 魏雨田. 血清胰岛素样生长因子-1 水平与 2 型糖尿病骨密度的关系[D]. 唐山:华北理工大学,2017:13-15.
- [2] 李晓宇,冯正平. 糖尿病性骨质疏松发病机制的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2014,20(5):580-583.
- [3] 吴宏梓,方洲,汪少波. 中药治疗糖尿病性骨质疏松疗效与安全性的系统评价[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(3):251-271.
- [4] 梁燕龙,杜敏群,赖文秀,等. 2 型糖尿病性骨质疏松的鼠类模型的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(9):1164-1167.
- [5] 蒋云霞,李双蕾,陈文辉. 2 型糖尿病性骨质疏松动物模型建立[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(7):894-898.
- [6] 冯正平,邓华聪. 糖尿病性骨质疏松发病机制的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2012,18(3):281-284.
- [7] 尹嘉晶,彭永德. 糖尿病与骨质疏松[J]. 中华内分泌代谢杂志,2014,30(5):449-452.
- [8] 黄莹芝,叶山东. 糖尿病性骨质疏松的相关危险因素研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(5):647-650.
- [9] 杨秋萍. 胰高血糖素样肽-1 与糖尿病性骨质疏松症[J]. 昆明医科大学学报,2014,35(9):1-3.
- [10] 王一然,翟骁,王奇金. GLP-1 及其类似物对减缓骨质疏松作用的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2015,21(6):752-756.
- [11] 管俊,崔瑛. 桑寄生药理作用及临床应用研究进展[J]. 河北中医,2017,39(3):460-462.
- [12] 牛银波,潘亚磊,李晨睿,等. 续断防治骨质疏松的研究进展[J]. 中国药理学通报,2013,29(7):892-894.
- [13] 蒋俊,崔莉,孙娥,等. 基于淫羊藿黄酮类化合物的体内代谢阐述其抗骨质疏松药效物质基础[J]. 中草药,2014,45(5):721-729.
- [14] 李丹丹,江培,杨书美. 黄柏的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 黑龙江医药,2014,27(3):601-605.
- [15] 冯果,陈娟,刘文,等. 天花粉有效成分及药理活性研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2015,32(6):59-62.

(收稿日期:2018-03-06)