

高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3048>唐辉¹, 姚志浩¹, 罗道文¹, 彭双麟², 杨双林², 王浪², 肖金刚^{1, 2, 3}

2095-4344.3048

投稿日期: 2020-06-03

送审日期: 2020-06-05

采用日期: 2020-07-09

在线日期: 2020-09-05

中图分类号:

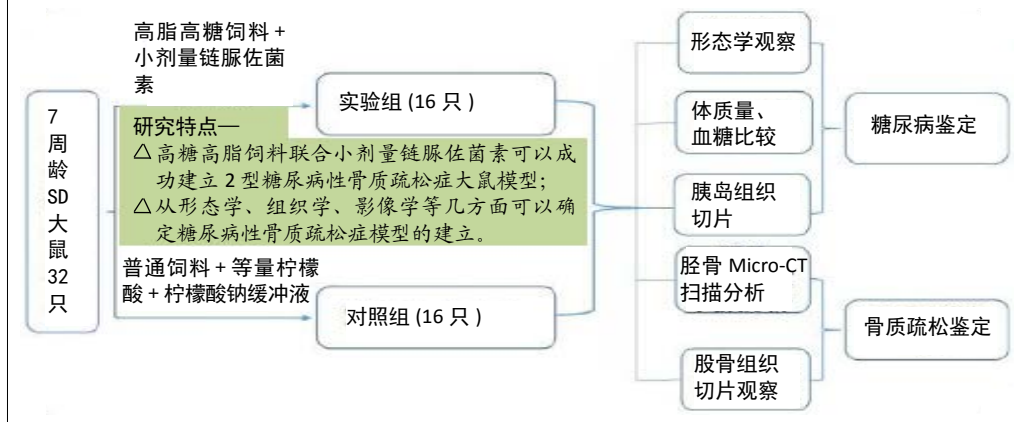
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)08-01207-05

文献标识码: B

文章快速阅读:



文题释义:

糖尿病性骨质疏松症(diabetic osteoporosis, DOP): 是一种退行性、全身性、代谢性疾病,为糖尿病在骨骼系统的常见慢性并发症之一,因胰岛分泌缺乏或胰岛素抵抗引起骨代谢及钙磷代谢紊乱,导致单位体积内骨量减少、骨组织微结构改变、骨强度减低、脆性增加,易发生骨折。

链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ): 是从无色链霉菌中提取的一种广谱抗生素,具有抗菌、抗肿瘤的作用,本质是一种氨基葡萄糖-亚硝基脲。由于其对动物胰岛β细胞具有特异性的毒性作用,被广泛用于1型和2型糖尿病动物模型制备。

摘要

背景: 单纯给予高脂高糖饮食诱导建立糖尿病骨质疏松症模型时间较长,费用高,成模稳定性较差。化学药物链脲佐菌素诱导法就被作为研究绝经后骨质疏松的动物模型建立的最常用方法之一,目前对于该疾病模型的鉴定报道较少。

目的: 建立大鼠2型糖尿病性骨质疏松模型,并对建立的2型糖尿病大鼠骨质疏松动物模型进行鉴定。

方法: 选择7周龄雄性SD大鼠32只,根据体质量采用随机数字表法将其随机分为对照组(16只)和模型组(16只),模型组采用高脂高糖饲料喂养4周,并且按35 mg/kg一次性腹腔注射链脲佐菌素诱导成为2型糖尿病性骨质疏松症模型;对照组采用普通饲料喂养4周,并且按10 mL/kg腹腔注射等剂量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。从形态学、组织学、影像学等几方面对两组大鼠进行研究。实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准。

结果与结论: ①模型组16只大鼠成模12只,成模率75%;②与对照组大鼠比较,模型组大鼠在注射链脲佐菌素后,体质量呈现出先下降、后稍回升的趋势;大鼠表现出多饮、多尿、多食等糖尿病症状;空腹血糖明显升高($P < 0.05$),并呈持续状态;股骨组织学切片可见骨小梁稀疏;胫骨Micro-CT扫描及三维重建显示大鼠骨体积分数及骨小梁数量显著降低,骨小梁分离度显著升高,出现明显骨质疏松影像;③结果可说明,选取的7周龄SD大鼠在高糖高脂饲料喂养4周基础上,联合采用小剂量链脲佐菌素(35 mg/kg),可以成功建立2型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型。从形态学、组织学、影像学等几方面可以确定糖尿病性骨质疏松症模型的建立。

关键词: 骨;骨质疏松;糖尿病;链脲佐菌素;Micro-CT;模型;大鼠

High fat and high sugar diet combined with streptozotocin to establish a rat model of type 2 diabetic osteoporosis

Tang Hui¹, Yao Zhihao¹, Luo Daowen¹, Peng Shuanglin², Yang Shuanglin², Wang Lang², Xiao Jingang^{1, 2, 3}

¹School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ²Oral and Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Tang Hui, Master candidate, School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Corresponding author: Xiao Jingang, MD, Professor, School of Stomatology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Oral and Maxillofacial Reconstruction and Regeneration Laboratory, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China; Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

¹西南医科大学口腔医学院,四川省泸州市 646000; ²西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室,四川省泸州市 646000; ³西南医科大学附属第一医院口腔颌面外科,四川省泸州市 646000

第一作者: 唐辉,男,1992年生,重庆市人,西南医科大学在读硕士,主要从事口腔颌面外科临床与基础研究。

通讯作者: 肖金刚,博士,教授,西南医科大学口腔医学院,四川省泸州市 646000;西南医科大学口腔颌面修复重建和再生实验室,四川省泸州市 646000;西南医科大学附属第一医院口腔颌面外科,四川省泸州市 646000

<https://orcid.org/0000-0003-1657-8571> (唐辉)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81870746, 81371125),项目负责人:肖金刚

引用本文: 唐辉,姚志浩,罗道文,彭双麟,杨双林,王浪,肖金刚.高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立2型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型[J].中国组织工程研究,2021,25(8):1207-1211.



Abstract

BACKGROUND: A high-fat and high-sugar diet to induce a diabetic osteoporosis model is time-consuming, with high cost and poor model stability. Induction by streptozotocin is one of the most common methods to establish an animal model of postmenopausal osteoporosis. At present, there are few reports on the identification of this disease model.

OBJECTIVE: To establish a rat model of type 2 diabetic osteoporosis rat models, and to identify the animal model established.

METHODS: Thirty-two male 7-week-old Sprague-Dawley rats were selected and randomly divided into a normal control group ($n=16$) and a model group ($n=16$) according to their body mass using a random number table method. The model group was fed with high-fat and high-sugar diet for 4 weeks, and a small dose of streptozotocin was intraperitoneally injected at 35 mg/kg to induce a type 2 diabetic osteoporosis model; the normal control group was fed with normal maintenance feed for 4 weeks, and an equal dose of 10 mL/kg citric acid-sodium citrate buffer was intraperitoneally injected. Two groups of rats were studied from the aspects of morphology, histology and imaging. An approval was obtained from the Animal Experimental Ethics Committee of Southwest Medical University.

RESULTS AND CONCLUSION: There were 16 rats in the model group, 12 rats were modeled, and the modeling rate was 75%. Compared with the normal control group, in the model group, the body mass of rats showed a gradual downward trend and a slightly upward trend after the injection of streptozotocin. These rats presented symptoms of diabetes, such as polydipsia, polyuria and polyphagia. Fasting blood glucose level increased significantly ($P < 0.05$), and showed a continuous state. The histological section showed that the trabecular bone was sparsely distributed. Imaging results showed that the bone volume fraction and the number of trabeculae in rats were significantly reduced, and the separation of trabecular bone was significantly increased, indicating a significant osteoporosis. To conclude, the 7-week-old Sprague-Dawley rats which are fed with high-sugar and high-fat diet for 4 weeks can be given low-dose streptozotocin (35 mg/kg) to successfully establish the animal model of type 2 diabetic osteoporosis. From the aspects of morphology, histology, imaging, the successful establishment of diabetic osteoporosis model can be determined.

Key words: bone; osteoporosis; diabetes; streptozotocin; Micro-CT; model; rat

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81870746 and 81371125 (both to XJG)

How to cite this article: TANG H, YAO ZH, LUO DW, PENG SL, YANG SL, WANG L, XIAO JG. High fat and high sugar diet combined with streptozotocin to establish a rat model of type 2 diabetic osteoporosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(8):1207-1211.

0 引言 Introduction

随着全世界社会经济的高速发展, 广大人民的生活水平不断提高, 人们饮食结构的不断变化, 生活节奏的持续加快及多坐少动的日常习惯等诸多不利于身体健康的行为, 导致全球糖尿病的患病率迅速增长。糖尿病目前已经成为了全球性的卫生问题。

糖尿病是一种与体内代谢相关的全身性疾病, 患者中以 2 型糖尿病为主。骨质疏松症是一种系统性的骨骼疾病, 其主要以骨质量减低、骨细微结构破坏、骨强度降低及骨质风险升高为特点^[1]。在临床中, 糖尿病和骨质疏松症既是两种相对独立的慢性疾病, 但又不可分割^[2]。半个多世纪前有学者就认为糖尿病与骨质疏松有关, 1948 年有学者发现糖尿病与骨量丢失、骨质疏松相关, 并首次提出糖尿病骨减少的概念^[3]。糖尿病性骨质疏松属于继发性骨质疏松, 是糖尿病在骨骼系统中出现的最常见的一种并发症。目前, 2 型糖尿病已确认是引起骨骼损伤及骨脆性增加的独立危险因素^[4-7]。近年来, 国内外的调查结果显示糖尿病性骨质疏松的发病率约占糖尿病患者的 50% 以上^[8-9], 国内李贵英等^[9]报告能占 55.9%, 其发病率远远高于其他并发症, 且有逐年增高趋势。糖尿病性骨质疏松的发病率呈逐年上升趋势, 其高致残率明显降低患者的生活质量, 同时也带来极大的社会经济负担^[10-11]。

动物模型的建立对进一步明确糖尿病性骨质疏松症的特点及机制的深入研究具有重大意义。对于大鼠糖尿病性骨质疏松症模型的建立, 目前尚未有统一的标准建模方法, 并且对建造模型未进行深入的相关鉴定研究。因此, 此次实验旨在通过建造大鼠糖尿病性骨质疏松模型, 并对该模型进行相关鉴定, 为后期进一步明确糖尿病性骨质疏松症的特点及机制的深入研究奠定基础, 同时也为糖尿病性骨质疏松患者的骨组织工程研究奠定相关的实验基础。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 建立动物模型。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 1 至 10 月在西南医科大学

口腔医学院口颌面修复重建与再生实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 7 周龄雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量 (238 ± 12) g, 购于西南医科大学基础医学部实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(川)2018-17。大鼠自由摄食、摄水, 饲养室室温 (22 ± 2) °C, 湿度 48%, 昼夜 12 h。

1.3.2 实验用主要饲料、药品、试剂和仪器 高脂高糖饲料 [开源动物饲料(常州)有限公司]; 链脲佐菌素(美国 Sigma 公司); 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(美国雅培公司); 苏木精-伊红(北京索莱宝科技有限公司产品); 血糖仪及血糖试纸(德国罗氏诊断公司); 电子天平(上海速展计量仪器有限公司); 光学显微镜(Olympus BX51, 日本); 石蜡切片机(Leica, 德国); Micro-CT(Scanco viva40, 瑞士)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 将 32 只大鼠测量体质量, 根据体质量采用随机数字表法随机分为模型组与对照组, 每组 16 只, 每组大鼠随机分为 4 笼, 每笼各 4 只。

1.4.2 建立大鼠 2 型糖尿病性骨质疏松模型 模型组给予高脂高糖饲料, 对照组给予普通饲料, 喂养 4 周。

(1) 配制链脲佐菌素(STZ): 首先配置 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液: 将柠檬酸与柠檬酸钠分别 2.0 g 与 2.94 g 各溶解于 100 mL 生理盐水中, 使其浓度为 0.1 mmol/L, 各取 75 mL, 充分混合后测定 pH 值, 调节 pH, 保持 pH 值为 4.2, 保存于 4 °C 冰箱待用, 临用前将链脲佐菌素溶解在已配置 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液中, 形成浓度为 0.3% 链脲佐菌素溶液, 配置后使用锡箔纸进行遮光保护。

(2) 给药方式: 两组大鼠均禁食 12 h, 模型组大鼠行一次性腹腔注射链脲佐菌素 (35 mg/kg, 注射 1 次), 链脲佐菌素在使用前配置, 使用过程中用锡箔纸进行遮光保护。对照组给予柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (10 mL/kg) 一次性腹腔注射。注射后将大鼠放置回原笼中正常饲养, 适宜条件下 (室温 20-25 °C、相对湿度 60%-80%) 自由饮水、摄食, 常规喂养 (给予普通饲料)。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	建立大鼠 2 型糖尿病性骨质疏松模型
借鉴已有标准实施动物造模:	高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立大鼠 2 型糖尿病性骨质疏松模型
研究问题需要改进动物模型方法及意义:	快速建立一个稳定的糖尿病性骨质疏松模型对深入研究糖尿病性骨质疏松的发病机制及治疗方法至关重要。单纯给予高脂高糖饮食诱导建立糖尿病骨质疏松模型时间较长, 费用高, 成模稳定性较差
动物来源及品系:	雄性 SD 大鼠购于西南医科大学基础医学部实验动物中心
造模技术描述:	模型组大鼠处理: (1) 给予高脂高糖饲料, 喂养 4 周; (2) 大鼠禁食 12 h, 行一次性腹腔注射链脲佐菌素 (35 mg/kg), 链脲佐菌素在使用前配置, 使用过程中用锡箔纸进行遮光保护
造模主要诱导用药:	链脲佐菌素
动物数量及分组方法:	根据大鼠体重采用随机数字表法随机分为模型组和对照组, 每组 16 只
造模成功评价指标:	于注射链脲佐菌素后 3, 7, 10, 14, 21 d 测量大鼠空腹血糖, 连续 3 次测得空腹血糖均 ≥ 16.7 mmol/L, 则为糖尿病造模成功 ^[11-12]
造模后实验观察指标:	①两组大鼠造模前后体质量及空腹血糖水平; ②胰岛组织苏木精伊红染色结果; ③大鼠胫骨 Micro-CT 扫描结果; ④股骨组织切片分析结果
造模后动物处理:	造模前及造模后 3, 7, 10, 14, 21 d 空腹状态下测量大鼠体质量及血糖值; 于注射链脲佐菌素 8 周后, 过量麻醉处死大鼠, 取大鼠胰岛组织、双侧股骨及胫骨, 进行相关指标检测
伦理委员会批准:	实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准

1.4.3 生命体征观察 造模前及造模后每日对模型组和对照组大鼠的生命体征及一般状况进行观察比较, 主要观察大鼠的食量、尿量、毛发、精神状态等指标, 观察并记录。

1.4.4 大鼠尾静脉血糖及体质量测量 测量时保证大鼠在安静、温暖、通风、熟悉的环境下实施, 给药前及给药后 3, 7, 10, 14, 21 d, 在空腹状态下测体质量及剪尾取血, 测其血糖值, 每次每一只均测量 3 次, 取其平均值, 作为最终结果并纪录统计, 每次测量前后对大鼠尾部均采用碘伏进行消毒。

1.4.5 糖尿病成功检测标准 模型组大鼠一次性左下腹腔注射链脲佐菌素 (35 mg/kg) 后, 于 3, 7, 10, 14, 21 d 后测量大鼠空腹血糖, 连续 3 次测得空腹血糖均 ≥ 16.7 mmol/L, 则为糖尿病造模成功^[11-12]。

1.4.6 胰岛组织切片观察 在分别注射链脲佐菌素和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 8 周后, 采用注射过量 1% 戊巴比妥 (40 mg/kg) 麻醉药物法处死大鼠。分别解剖出两组大鼠胰岛组织, 并将其固定于 40 g/L 多聚甲醛溶液中, 然后均制备苏木精-伊红染色切片。

1.4.7 胫骨 Micro-CT 分析 给药 8 周后处死大鼠, 在无菌条件下解剖胰岛组织时, 同时取下大鼠双侧股骨及胫骨, 剔除股骨及胫骨表面肌肉及骨膜, 迅速放入新鲜配制的 40 g/L 多聚甲醛固定液中进行固定, 4 °C 固定 24 h 后取出; 采用 Micro-CT 机扫描胫骨干骺端, 观察骨组织结构。扫描条件为: 电压 80 kV; 电流 500 μ A; 分辨率 10.5 μ m, 曝光时间 200 ms, 扫

描的层数 1 200 层。用三维重建处理对两组大鼠胫骨骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁数量 (Tb.N)、骨小梁分离度 (Tb.Sp) 进行检测。

1.4.8 股骨组织学分析 采用 PBS 多次充分清洗固定后的大鼠股骨组织, 清洗后放入 4 °C 10%EDTA(pH 8.0) 的溶液中, 进行脱钙。20 d 后, 待骨组织脱钙完全, 常规用乙醇进行梯度脱水、二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续纵行组织切片, 厚 5 μ m, 制备切片, 进行 Masson 染色及苏木精-伊红染色, 在光学显微镜下观察两组大鼠骨组织结构。

1.5 主要观察指标 ①两组大鼠造模前后体质量及空腹血糖水平; ②胰岛组织切片观察结果; ③大鼠胫骨 Micro-CT 扫描结果; ④股骨组织切片分析结果。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17 统计软件进行分析。收集每次测量体质量及血糖的数据, 将所有数据进行正态性检验, 其中正态分布或近似正态分布的计量资料描述以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 正态分布采用两样本的 t 检验, 若方差不齐采用 t 检验, 非正态分布数据者采用秩和检验。其余数据进行单因素方差分析, 计算结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 检验水准取值 0.05 ($\alpha=0.05$), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 对照组 16 只进入结果分析, 模型组造模成功 12 只进入结果分析。

2.2 两组大鼠一般状况 对照组大鼠在注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液后生长良好, 体质量逐渐增加, 毛发整齐光亮, 精神状态良好, 血糖稳定在正常范围之内, 并且无其他症状的出现。模型组大鼠在注射链脲佐菌素后, 每日食量、饮水量及尿量明显逐渐增加, 体型逐渐消瘦, 精神不振, 反应及活动明显迟钝, 毛发明显蓬散杂乱, 大鼠逐渐表现为三多一少的糖尿病症状。

2.3 造模前后两组大鼠体质量比较 与对照组相比, 模型组大鼠体质量明显降低 ($P < 0.05$), 差异有显著性意义。见表 1。

表 1 | 造模前后两组大鼠体质量比较 ($\bar{x} \pm s$, g)
Table 1 | Comparison of the body mass of rats between two groups before and after modeling

时间	对照组 (n=16)	模型组 (n=12)
注射前	328.2.2 \pm 20.2	336.0 \pm 27.3
注射后 3 d	330.7 \pm 20.2	320.92 \pm 21.9 ^a
注射后 7 d	334.7 \pm 18.7	315.02 \pm 20.8 ^a
注射后 10 d	339.9 \pm 18.0	310.22 \pm 24.6 ^a
注射后 14 d	343.8 \pm 17.8	327.5 \pm 20.7 ^a
注射后 21 d	355.3 \pm 20.4	338.5 \pm 21.3 ^a

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

2.4 两组大鼠空腹血糖水平 与对照组大鼠空腹血糖相比较, 模型组大鼠空腹血糖在注射链脲佐菌素后明显升高 ($P < 0.001$), 差异有显著性意义。见表 2。

2.5 胰岛组织切片观察 造模后 8 周两组大鼠胰岛组织切片苏木精-伊红染色见图 1。与对照组相比, 模型组胰岛细胞明显稀疏。

2.6 Micro-CT 检测结果 造模后 8 周两组大鼠胫骨 Micro-CT 扫描及三维重建见图 2, 3。对照组大鼠骨组织皮质骨均匀, 骨小梁较为致密; 与对照组相比模型组大鼠皮质骨增厚, 骨

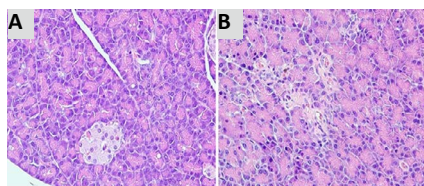
髓腔明显增大，骨小梁断裂并且稀疏。

2.7 股骨组织切片分析结果 造模 8 周两组大鼠股骨苏木精-伊红染色切片镜下观与 Masson 染色切片镜下观察见图 4。

表 2 | 造模前后两组大鼠血糖水平比较 (x̄±s, mmol/L)
Table 2 | Comparison of the blood glucose levels of rats between the two groups before and after modeling

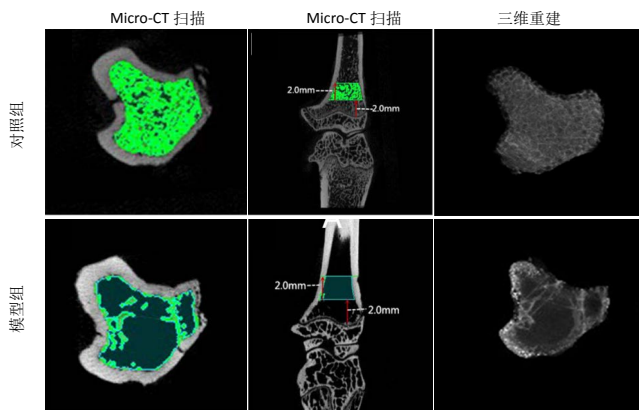
时间	对照组 (n=16)	模型组 (n=12)
注射前	4.6±0.4	4.7±0.47
注射后 3 d	4.7±0.2	23.0±4.4 ^a
注射后 7 d	4.7±0.2	19.4±3.3 ^a
注射后 10 d	4.8±0.2	19.3±3.3 ^a
注射后 14 d	4.7±0.3	20.1±4.1 ^a
注射后 21 d	4.9±0.2	19.1±3.2 ^a

表注：与正常对照组比较，^aP < 0.05



图注：图 A 为对照组；B 为模型组。与对照组相比，模型组胰岛细胞明显稀疏

图 1 | 造模后 8 周两组大鼠胰岛组织切片苏木精-伊红染色 (x100)
Figure 1 | Hematoxylin-eosin staining of pancreatic islet tissue at 8 weeks after modeling in the two groups (x100)

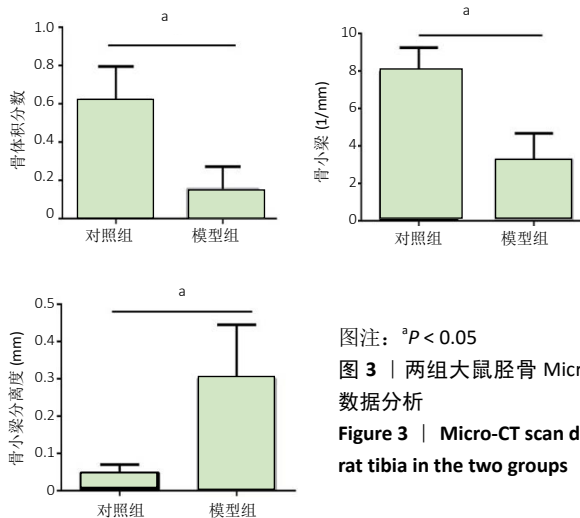


图注：对照组大鼠骨组织皮质骨均匀，骨小梁较为致密；与对照组相比模型组大鼠骨髓腔明显增大，骨小梁断裂并且稀疏

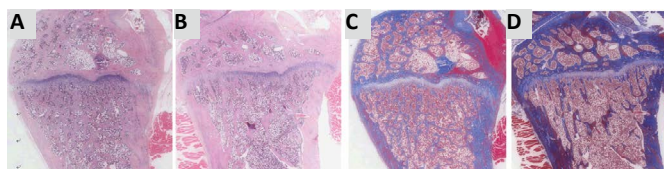
图 2 | 两组大鼠胫骨 Micro-CT 扫描及三维重建
Figure 2 | Micro-CT scan and three-dimensional reconstruction of the rat tibia in the two groups

3 讨论 Discussion

糖尿病是一组以血糖浓度高为特征的慢性疾病，糖尿病患者中大部分为 2 型糖尿病，胰岛素抵抗是其发生的主要因素^[13]。2 型糖尿病并发症较多且严重，其中糖尿病骨质疏松症是其重要并发症之一。糖尿病性骨质疏松的发病率逐年上升，但其的发病机制目前尚未能明确，如今认为与高糖状态下出现血钙水平异常，导致骨代谢异常等多种因素相关^[14]。所以快速建立一个稳定的糖尿病性骨质疏松模型对深入研究糖尿病性骨质疏松的发病机制及治疗方法至关重要。高糖食物可造成动物模型高胰岛素血症，而高脂肪食物可导致动物模型胰岛素分泌功能减退，使机体糖耐量降低^[15]，通过高脂高糖喂养可形成胰岛素抵抗，并导致高胰岛素血症的形成。单纯



图注：^aP < 0.05
图 3 | 两组大鼠胫骨 Micro-CT 扫描数据分析
Figure 3 | Micro-CT scan data of the rat tibia in the two groups



图注：图 A(对照组)，B(模型组)为苏木精-伊红染色；C(对照组)，D(模型组)为 Masson 染色。对照组大鼠骨小梁清晰，排列密集，骨小梁间距较小；与对照组相比模型组大鼠骨小梁稀疏，排列紊乱，骨小梁间距较大

图 4 | 造模后 8 周两组大鼠股骨苏木精-伊红染色及 Masson 染色观察 (x20)
Figure 4 | Hematoxylin-eosin staining and Masson staining of the rat femur at 8 weeks after modeling (x20)

给予高脂高糖饮食诱导建立糖尿病骨质疏松症模型时间较长，费用高，成模稳定性较差。

链脲佐菌素是一种广谱抗菌素，具有抗菌、抗肿瘤的作用，同时研究发现其对动物胰岛 β 细胞具有特异性的毒性作用，其作用机制是选择性损伤胰岛 B 细胞，导致胰岛素分泌减少^[7]。大鼠采用高脂高糖饮食诱导 4 周后，会产生胰岛素抵抗，即表现为其胰岛素受体与胰岛素的结合能力减弱，当分泌相同剂量的胰岛素时，产生降低血糖的效应也会降低^[16-18]。虽然胰岛素抵抗最终也会表现出高血糖的体征，但此过程需要较长的时间才能够出现。大多数糖尿病动物模型建立实验，对时间都会有所要求，都希望能够缩短实验时间，所以模型组采用高糖高脂饮食诱导和药物干预相结合的方法，将成年 SD 大鼠高糖高脂饮食诱导一段时间，以诱导出胰岛素抵抗，再联合腹腔注射小剂量的链脲佐菌素，以此来加速糖尿病的进程，最终建立 2 型糖尿病大鼠模型，该方法具有制造方法简便、药物毒性低、特异性高等优点。

经典的糖尿病诊断标准为：典型糖尿病症状(多饮、多尿、多食、不明原因的体质量下降)加上随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L 或加上空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L^[19-20]。对于此次实验糖尿病的诊断，研究选择在造模后 3, 7, 10, 14, 21 d, 对模型组大鼠的体质量及血糖进行测量及造模前、造模后每日对大鼠生命体征等一般状况进行观察比较，结果表明模型组大鼠血糖明显升高，体质量呈现出先下降、后稍回升的趋势，体型消瘦，每

日饮水量、饮食量及尿量明显增多；造模后 3, 7, 10, 14, 21 d 后连续 3 次测得空腹血糖均 ≥ 16.7 mmol/L；这些生命体征表现都与临床上 2 型糖尿病患者的临床表现及症状相近。以上结果说明了模型组大鼠已具有了糖尿病症状及表现，并且模型组大鼠的发病过程及临床表现与 2 型糖尿病相类似，这与实验的预期结果相同。由于 2 型糖尿病具有较多的发病原因，因此无论是诱导性、自发性、遗传性还是转基因动物模型，都不可能将糖尿病的发病及发展过程完全表现出来^[21]。而此次实验通过给予高糖高脂饮食并结合链脲佐菌素建立了大鼠糖尿病模型，该模型的发病过程及临床表现与人类糖尿病相类似，因而可以用于糖尿病及其并发症的相关研究。此外，该模型动物不需要使用药物来维持生命时间，这与其他实验相比较，具有独特优势，虽然部分模型大鼠血糖与之前比较稍有所降低，但仍然高于对照组的正常水平，这与临床上 2 型糖尿病患者早期通过减轻体重来改善胰岛素抵抗的表现相类似。

目前对骨质疏松的评价，DEXA 法测量骨密度是大多数相关报道的常用评价方法，但是此方法存在不能完全体现骨强度的变化以及无法反映骨结构的缺点^[22]。目前也有相关文献报道采用 Micro-CT 扫描技术来评价小动物骨质疏松症。Micro-CT 检查是一种非侵入性、非破坏性的高分辨率检查骨骼微结构的方法^[23]。此次实验亦采用 Micro-CT 扫描技术来评价大鼠的骨质疏松症，一方面，Micro-CT 能够将大鼠骨骼的三维解剖结构清晰地呈现出来，从不同角度观察大鼠骨质的变化；另一方面，通过 Micro-CT 扫描，可以测定大鼠的骨体积、骨小梁数量及骨小梁间距值，通过统计学分析，模型组与对照组比较，差异有显著性意义。实验对骨质疏松症鉴定的另外一个方法为制作股骨组织切片，造模后 8 周，取两组大鼠股骨组织切片进行苏木精-伊红染色和 Masson 染色，通过比较发现，与对照组相比，模型组大鼠骨髓腔明显增大、骨小梁间距明显加宽，骨小梁变细、断裂，骨小梁之间明显疏松紊乱，这些均是典型的骨质疏松改变，与 Micro-CT 扫描结果相一致，证明了骨质疏松模型建立的成功。

综上所述，从形态学、组织学、影像学等几方面结果可以得出，高糖高脂饮食诱导联合小剂量链脲佐菌素 (35 mg/kg) 可以成功建立 2 型糖尿病骨质疏松症大鼠模型，该模型的建立为后续研究糖尿病骨代谢奠定了基础。

作者贡献：通讯作者设计实验并负责论文审核，第一作者进行实验实施及撰写论文，其他作者均为实验参与者。

经费支持：该文章接受了“国家自然科学基金项目(81870746, 81371125)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署

名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 夏维波, 章振林, 林华, 等. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2017)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(3): 281-309.
- [2] MOHSIN S, KAIMALA S, SUNNY JJ, et al. Type 2 Diabetes Mellitus Increases the Risk to Hip Fracture in Postmenopausal Osteoporosis by Deteriorating the Trabecular Bone Microarchitecture and Bone Mass. *J Diabetes Res.* 2019; 2019:3876957.
- [3] 杨蕾, 付勤. 2 型糖尿病性骨质疏松骨质量改变研究 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(1): 100-108.
- [4] STARR JESSICA F, BANDEIRA LEONARDO C, AGARWAL SANCHITA, et al. Robust Trabecular Microstructure in Type 2 Diabetes Revealed by Individual Trabecula Segmentation Analysis of HR-pQCT Images. *J Bone Miner Res.* 2018; 33(9): 1665-1675.
- [5] SHAW JE, SICREE RA, ZIMMET PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87(1): 4-14.
- [6] PORTAL-NÚÑEZ S, ARDURA JA, LOZANO D, et al. Adverse Effects of Diabetes Mellitus on the Skeleton of Aging Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2016; 71(3): 290-299.
- [7] YING X, CHEN X, WANG T, et al. Possible osteoprotective effects of myricetin in STZ induced diabetic osteoporosis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2020; 866: 172805.
- [8] REYES-GARCÍA R, ROZAS-MORENO P, LÓPEZ-GALLARDO G, et al. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2013; 50(1): 47-52.
- [9] 李桂英, 吕波, 邸彬, 等. 2 型糖尿病骨质疏松的发病率及其相关因素分析 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(8): 568-571.
- [10] ZHENG ZG, ZHANG X, ZHOU YP, et al. Anhydrocaritin, a SREBPs inhibitor, inhibits RANKL-induced osteoclastic differentiation and improves diabetic osteoporosis in STZ-induced mice. *Eur J Pharmacol.* 2017; 809: 156-162.
- [11] GUO CJ, XIE JJ, HONG RH, et al. Puerarin alleviates streptozotocin (STZ)-induced osteoporosis in rats through suppressing inflammation and apoptosis via HDAC1/HDAC3 signaling. *Biomed Pharmacother.* 2019; 115: 108570.
- [12] 张燕, 杨秋萍, 赵燕, 等. 2 型糖尿病大鼠骨质疏松模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(40): 6041-6047.
- [13] WANG JY, CHENG YZ, YANG SL, et al. Dapagliflozin Attenuates Hyperglycemia Related Osteoporosis in ZDF Rats by Alleviating Hypercalciuria. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 700.
- [14] ZHEN D, LIU L, GUAN C, et al. High prevalence of vitamin D deficiency among middle-aged and elderly individuals in northwestern China: its relationship to osteoporosis and lifestyle factors. *Bone.* 2015; 71: 1-6.
- [15] DENG J, WANG DX, TANG J, et al. An increase in alveolar fluid clearance induced by hyperinsulinemia in obese rats with LPS-induced acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 2020; 279: 103470.
- [16] 齐兵, 戴维群, 尤建宇, 等. 不同种药物干预骨质疏松模型大鼠股骨压缩力学的变化 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 42(19): 6770-6775.
- [17] SIMAS JM, KUNZ RI, BRANCAHALÃO RM, et al. Effects of physical exercise on the cartilage of ovariectomized rats submitted to immobilization. *Einstein (Sao Paulo).* 2015; 13(4): 574-579.
- [18] YINGLING VR, MITCHELL KA, LUNNY M. Acute hypothalamic suppression significantly affects trabecular bone but not cortical bone following recovery and ovariectomy surgery in a rat model. *Peer J.* 2016; 12(4): 1575-1595.
- [19] POWER SM, MATIC DB, HOLDSWORTH DW. The Effects of Nonvascularized Versus Vascularized Bone Grafting on Calvarial Defect Healing. *J Craniofac Surg.* 2015; 26(1): 290-295.
- [20] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [21] DING XQ, YANG L, HU Y, et al. Effect of local application of bisphosphonates on improving peri-implant osseointegration in type-2 diabetic osteoporosis. *Am J Transl Res.* 2019; 11(9): 5417-5437.
- [22] ROKN AR, SHAKERI AS, ETEMAD-MOGHADAM S, et al. Regenerative Effects of Three Types of Allografts on Rabbit Calvarium: An Animal Study. *J Dent (Tehran).* 2015; 12(11): 823-834.
- [23] 罗道文, 黄旭, 王雷, 等. C57 小鼠骨质疏松症伴颅骨极量缺损模型的建立 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(36): 5793-5798.