

胰岛素对糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞体外生物学活性的影响

陈新¹, 谭新伟², 刘洪臣³, 冯岩¹ (1. 空军总医院口腔科, 北京 100036; 2. 新疆维吾尔自治区巴州人民医院口腔科 841000; 3. 解放军进修学院口腔医学研究院口腔科, 北京 100036)

【摘要】 目的 探讨糖尿病大鼠应用胰岛素对下颌骨成骨细胞体外生物学活性的影响。方法 将 20 只 7 周龄的 SD 大鼠分为对照组(8 只)与实验组(12 只), 实验组大鼠注射四氧嘧啶建立糖尿病大鼠模型, 建模后获取下颌骨进行培养并提取成骨细胞, 设置对照组并根据胰岛素剂量设置各实验组, 采用噻唑蓝(MTT)法检测大鼠成骨细胞的增殖率, 采用对硝基苯磷酸盐(PNPP)法检测骨细胞碱性磷酸酶(ALP)水平, 并进行下颌骨成骨细胞糖摄取检测, 比较分析各组检测结果。结果 加药后 48 h 与 72 h 各不同剂量胰岛素实验组标本的吸光度值与对照组和实验组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 其中以 10^{-6} mol/L 剂量组的吸光度值最高。加药后 3、7、14 d 各不同剂量胰岛素实验组标本的 ALP 水平与实验组及对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 加药后 21 d 10^{-6} mol/L 及 10^{-7} mol/L 胰岛素实验组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。2-NBDG 加入 20 min 时吸光度值从高到低依次为 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组、实验组、对照组; 40 min 时吸光度值从高到低依次为实验组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、对照组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组。结论 糖尿病大鼠应用胰岛素后可改善其上颌骨成骨细胞的分化功能, 同时对糖摄取量也具有明显的抑制作用。

【关键词】 糖尿病; 胰岛素; 下颌骨; 成骨细胞; 体外生物活性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.06.050 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)06-0836-02

糖尿病可对患者的骨整合形成产生明显的影响, 以往通常采用羟基磷灰石涂层进行改善, 但常存在溶解及感染等不良事件, 导致实施效果受到限制^[1]。由于大部分糖尿病患者都需要长期注射胰岛素^[2], 临床医师在人工种植牙过程中逐渐丰富给药思路, 在通过颌骨局部给药确保血糖控制的同时发挥其改善骨整合的作用^[3]。而骨整合的良好改善与成骨细胞的作用密切相关^[4-5], 目前关于糖尿病患者颌骨成骨细胞的临床报道较为少见, 本研究通过对糖尿病大鼠与健康大鼠开展相关研究, 观察其上颌骨成骨细胞分化与糖摄取量的相关表现, 为下颌骨局部应用胰岛素提供良好的依据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 实验动物与分组 选取 7 周龄的 SD 大鼠 20 只, 其中雌性、雄性大鼠各 10 只, 体质量 190~250 g, 平均(223.7 ± 5.3)g。将大鼠随机分为对照组(8 只)与实验组(12 只)。

1.2 糖尿病动物模型的建立 对照组大鼠经腹腔注射生理盐水, 剂量为 100 mg/kg; 实验组大鼠经腹腔注射 20 mg/mL 的四氧嘧啶, 剂量为 200 mg/kg。待腹腔注射 3 d 后, 检测实验组大鼠血糖, 若空腹血糖为 7.8 mmol/L 或以上则糖尿病大鼠建模成功。所有实验大鼠均根据《关于善待实验动物的指导性意见》开展相关处理与操作。

1.3 方法

1.3.1 下颌骨成骨细胞培养 对照组大鼠无需测量血糖水平, 将下颌骨成骨细胞培养于 5.5 mmol 糖培养基。实验组大鼠在建模成功后 10 d 内均给予标准喂养, 第 11 天将大鼠处死, 应用酶消化联合组织块法对获取的标本进行培养。将大鼠处死后置于乙醇中浸泡消毒 5 min, 依据无菌操作标准取出下颌骨, 再次置于乙醇中浸泡消毒, 然后于氯酸钠内放置 1 min。应用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)连续清洗标本 3 次,

放至培养基中剔除标本组织的筋膜、肌肉、神经等, 将全部牙齿拔除, 再将处理标本清洗 3 次。将获取标本剪成 1 mm³ 小块, 注入其 5 倍体积的胰蛋白酶以有效地去除消化液。相同方式反复进行 5 次, 离心处理后在所获得的白色沉淀物中加入培养基与胎牛血清(FBS), 再置于培养瓶内。采用 FBS 抑制标本再消化, 旋松培养瓶口后放置孵箱中培养。培养 3 d 后针对酶消化所获得的细胞组织进行换液, 7 d 后针对组织块进行换液, 此后每 3 天进行 1 次换液。

1.3.2 下颌骨成骨细胞分化检测 针对大鼠标本进行合理的分组, 建立对照组(健康大鼠)、实验组(糖尿病大鼠)、 10^{-5} mol/L 胰岛素实验组、 10^{-6} mol/L 胰岛素实验组及 10^{-7} mol/L 胰岛素实验组。采用噻唑蓝(MTT)法检测大鼠成骨细胞的增殖率, 采用对硝基苯磷酸盐(PNPP)法检测骨细胞碱性磷酸酶(ALP), 并将 2 项检测结果进行统计学比较分析。

1.3.3 下颌骨成骨细胞葡萄糖摄取检测 针对大鼠标本进行合理分组, 建立对照组(健康大鼠)、 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、实验组(糖尿病大鼠)、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组。荧光标记 2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)的配置方法为 0.01 mol/L PBS 中加入 2-NBDG 粉末, 浓度为 200 μmol/L, 将标本第 5 代细胞接种于玻片上, 通过培养液反复处理后应用荧光显微镜进行观察, 再采用处理软件获取荧光积分吸光度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据处理与统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验或方差分析; 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠下颌骨成骨细胞增殖率比较 MTT 法检测结果显示, 在加药后 24、48、72 h 不同剂量胰岛素实验组标本的吸光

度与对照组和实验组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 胰岛素实验组中, 以 10^{-6} mol/L 剂量组的吸光度最高。见表 1。

表 1 大鼠下颌骨成骨细胞吸光度比较($\bar{x} \pm s, A$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.19±0.4	0.14±0.3	0.14±0.2
实验组	0.12±0.2	0.11±0.2	0.11±0.2
10^{-5} mol/L 胰岛素实验组	0.16±0.4 ^{ab}	0.17±0.4 ^{ab}	0.18±0.3 ^{ab}
10^{-6} mol/L 胰岛素实验组	0.17±0.3 ^{ab}	0.20±0.5 ^{ab}	0.19±0.4 ^{ab}
10^{-7} mol/L 胰岛素实验组	0.16±0.3 ^{ab}	0.19±0.3 ^{ab}	0.17±0.4 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠下颌骨成骨细胞 ALP 水平比较 PNPP 法检测结

表 2 大鼠下颌骨成骨细胞 ALP 水平比较($\bar{x} \pm s$, 金氏单位)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	0.61±0.13	1.24±0.38	1.28±0.40	0.83±0.22
实验组	0.17±0.06	0.23±0.08	0.62±0.14	0.46±0.11
10^{-5} mol/L 胰岛素实验组	0.11±0.02 ^{ab}	0.39±0.09 ^{ab}	0.89±0.27 ^{ab}	0.81±0.17 ^b
10^{-6} mol/L 胰岛素实验组	0.21±0.04 ^{ab}	0.72±0.17 ^{ab}	1.13±0.42 ^{ab}	0.63±0.15 ^{ab}
10^{-7} mol/L 胰岛素实验组	0.26±0.09 ^{ab}	0.33±0.10 ^{ab}	0.53±0.11 ^{ab}	0.67±0.19 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 大鼠下颌骨成骨细胞葡萄糖摄取量比较 各组大鼠标本均呈现出荧光表现随时间延长而增强的特征, 将 2-NBDG 加入 20、40 min 时各组积分吸光度比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 其吸光度值从高到低依次为 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组、实验组、对照组; 40 min 时吸光度值从高到低依次为实验组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、对照组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组, 见表 3。

表 3 大鼠下颌骨成骨细胞荧光积分吸光度比较($\bar{x} \pm s, A$)

组别	20 min	40 min
对照组	2 893.6±792.4	20 789.2±928.7
10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组	30 472.1±1 643.2	45 981.4±1 938.2
实验组	10 937.9±926.7	87 369.3±2 113.6
10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组	19 372.1±1 132.6	17 819.1±987.6

3 讨论

1 型糖尿病在青少年中发病时会明显抑制骨骼发育, 在成人中发病还会影响骨密度, 使骨质疏松的发生概率上升, 造成各种骨折的发生并影响愈合速度^[6]。而 2 型糖尿病的发生会升高患者的骨密度, 但明显降低骨强度^[7]。上述差异主要是由于 1 型糖尿病患者处于胰岛素绝对缺乏状态, 而 2 型糖尿病患者主要表现为胰岛素抵抗^[8]。通过不同的表现可以判断, 在骨骼的生长过程中胰岛素可发挥合成代谢效用。本研究对大鼠成骨细胞的分化状况进行检测后发现, 应用胰岛素的实验组大鼠其成骨细胞增殖率与 ALP 水平均提高, 并且 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ mol/L 胰岛素剂量组具有不同程度的改善。在 24~72 h 中, 10^{-6} mol/L 胰岛素的促增殖效果最佳并且伴随用药时间的延长, 细胞内 ALP 水平存在一定的剂量依赖性表现, 提示长期应用胰岛素后成骨细胞可能存在耐药表现, 敏感性下降。

果显示, 在加药后 3、7、14 d 时不同剂量胰岛素实验组标本的 ALP 水平与实验组和对对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 21 d 时 10^{-6} mol/L 及 10^{-7} mol/L 胰岛素实验组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 10^{-5} mol/L 胰岛素实验组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在不同水平胰岛素实验组中 ALP 水平在 3 d 时以 10^{-7} mol/L 胰岛素实验组最高, 7、14 d 时以 10^{-6} mol/L 胰岛素实验组最高, 21 d 时以 10^{-5} mol/L 胰岛素实验组最高。各组标本 ALP 水平在 14 d 内均随时间延长而提高, 14 d 后均呈现下降。见表 2。

相对于健康人群, 糖尿病患者骨转换率下降与骨量减少高发^[9], 主要由患者血糖控制状况所致, 以往血糖控制较好者其不良事件的发生情况会受到明显抑制^[10]。本研究针对不同大鼠开展了成骨细胞糖摄取的相关实验, 结果显示各组标本的荧光表现均随时间延长而增强。在 2-NBDG 加入 20 min 时各组别荧光积分吸光度比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 吸光度值从高到低依次为 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组、实验组、对照组; 2-NBDG 加入 40 min 时各组别荧光积分吸光度比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 吸光度值从高到低依次为实验组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+对照组、对照组、 10^{-6} mol/L 胰岛素+实验组。表明在胰岛素的作用下糖尿病大鼠成骨细胞糖摄取会受到限制, 进而改善患者成骨细胞的状态。

综上所述, 糖尿病大鼠应用胰岛素后可改善上颌骨成骨细胞的分化功能, 同时对糖摄取量也具有明显的抑制作用。

参考文献

[1] 吴璇, 刘洪臣, 鄂玲玲, 等. 胰岛素对糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞分化的影响[J]. 口腔医学研究, 2014, 30(5): 407-410.

[2] 左旭阳, 章秋. 骨骼是 2 型糖尿病中胰岛素抵抗的一个部位[J]. 中华糖尿病杂志, 2013, 5(3): 191.

[3] 吴璇, 刘洪臣, 吕娇, 等. 胰岛素对糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞糖摄取的影响[J]. 口腔医学研究, 2010, 26(3): 346-348.

[4] Bronoosh P, Tanideh N, Noorafshan A, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular bone defects: an experimental study in rabbits[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2015, 44(2): 277-284. (下转第 841 页)

理选药。鲍曼不动杆菌对氨基青霉素, 1~2 代头孢菌素和 1 代喹诺酮抗菌药物天然耐药, 对常用抗菌药物的耐药率均大于 50.00%, 对替加环素较敏感, 但儿童不宜使用^[8]。鲍曼不动杆菌的耐药机制与铜绿假单胞菌相似, 且前者的耐药性更为严重, 给临床医生用药带来了极大困难。本研究结果中, 鲍曼不动杆菌对亚胺培南和美罗培南的敏感率与 2012 年的检测结果 (55.19% 和 53.44%) 相近, 比 2011 年 (41.62% 和 35.57%) 明显提高^[3], 这可能与切实有效的医院感染管理及抗菌药物临床应用专项整治等活动有关。由于嗜麦芽窄食单胞菌产生金属酶, 对碳青霉烯类药物天然耐药, 故治疗嗜麦芽窄食单胞菌引起的感染不可使用该类药物。而本研究结果显示, 嗜麦芽窄食单胞菌对 CLSI 所推荐的左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑和米诺环素的敏感率均在 91.30% 及其以上, 较 2011 年明显提高, 可以作为抗感染治疗的首选药物; 而对头孢哌酮/他唑巴坦的敏感率较低 (44.93%), 应参考药敏结果选药。在实际工作中, 采用 K-B 法检测肺炎链球菌时其对青霉素和苯唑青霉素的敏感性低, 因此改用 CLSI 推荐的 MIC 法进行检测。同样, 对青霉素敏感的金黄色葡萄球菌需要做青霉素抑菌圈边缘试验^[9], “沙滩样”、β-内酰胺酶诱导试验阴性时表明该菌对青霉素敏感; “绝壁样”、β-内酰胺酶诱导试验阳性表明该菌对青霉素耐药。

多重耐药菌的变化趋势图显示, MRSA 和 PDR-PA 从 2009 年起连续 5 年下降; PDR-ABA 对包括碳青霉烯类在内的几乎所有抗菌药物均存在耐药菌株, 2005~2010 年呈逐年上升趋势, 但从 2011 年起连续 3 年逐渐下降, 由 67.65% 下降为 50.22% 和 44.73%^[2]。此外, 产 ESBLs 的大肠杆菌和肺炎克雷伯菌由 2012 年的 62.99% 和 48.56% 降至 2013 年的 59.27% 和 34.03%^[2]。这一方面可能是由于医院各项感染控制措施的落实使多重耐药菌感染减少; 另一方面可能由于细菌培养送检率增高, 使细菌检测总数增高, 从而使多重耐药菌比例相对下降。因此尚需进一步探讨。ICU 病房、烧伤病房和神经外科病房是多重耐药及泛耐药鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌分布最多的科室^[10]; 碳青霉烯类抗菌药物耐药的肠杆菌科细菌主要分布在儿科病房, 应引起相关科室的注意。

综上所述, 经过抗菌药物的专项整治等一系列活动, 特别是对碳青霉烯类、四代头孢、糖肽类、利奈唑胺等抗菌药物的限

制使该院的细菌耐药情况逐渐得以改善。但是, 多重耐药菌感染的防控形势依然严峻, 应逐步提高临床医师的细菌培养送检意识, 遵守卫生部《抗菌药物临床应用指导原则》。并在应用抗菌药物前, 应正确留取合格的标本送检, 尽早将经验治疗转为目标治疗, 并根据病原菌药敏检测结果及时地修正用药种类和剂量。

参考文献

[1] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 11.

[2] 李平, 金炎, 郭凤琴, 等. 致患者感染病原菌种类和常用抗菌药物敏感性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(7): 894-895.

[3] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(5): 321-329.

[4] 胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2011 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(5): 321-329.

[5] 文细毛, 任南, 吴安华, 等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2): 350-355.

[6] 莫善颖, 李梦薇, 韦柳华, 等. 铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(22): 5553-5555.

[7] 张家云. 铜绿假单胞菌医院感染现状及耐药性探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(6): 1233.

[8] 姜兰斌, 杨波, 张巍. ICU 鲍氏不动杆菌流行株的耐药性变迁[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(17): 4289-4291.

[9] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S22[S]. Wayne, USA: CLSI, 2012.

[10] 魏雪芳, 邵宜波, 张磊, 等. 烧伤病房病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(15): 3278-3280.

(收稿日期: 2014-08-29 修回日期: 2014-12-29)

(上接第 837 页)

[5] Zhang YB, Wang L, Jia S, et al. Local injection of substance P increases bony formation during mandibular distraction osteogenesis in rats [J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2014, 52(8): 697-702.

[6] 吴璇, 刘洪臣, 鄂玲玲, 等. 糖尿病大鼠下颌骨成骨细胞葡萄糖转运蛋白-1 及胰岛素受体 α1 的表达[J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29(4): 348-350.

[7] Schleicher I, Parker A, Leavesley D, et al. Surface modification by complexes of vitronectin and growth factors for serum-free culture of human osteoblasts [J]. Tissue Eng, 2005, 11(12): 1688-1698.

[8] Fujii H, Hamada Y, Fukagawa M. Bone formation in spontaneously diabetic Torii-newly established model of non-obese type 2 diabetes rats [J]. Bone, 2008, 42(2): 372-379.

[9] 万贤凤, 兰泽栋, 曾琳, 等. 人重组骨形成蛋白-4 与人重组胰岛素样生长因子-1 联合应用对鼠成骨细胞的影响[J]. 广东牙病防治, 2013, 21(3): 127-130.

[10] 何玉玲, 周后德, 隋国良, 等. 胰岛素受体底物 1 在前成骨细胞分化过程中的表达[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(9): 769-772.

(收稿日期: 2014-08-22 修回日期: 2014-12-29)