



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2024.03.014

<http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2024.03.014>

· 临床研究 ·

# 恩格列净通过 c-Jun 氨基末端激酶信号通路改善 2 型糖尿病性骨质疏松症的机制研究

胡燕琳 魏琦

**【摘要】** 目的 探讨恩格列净通过 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路改善 2 型糖尿病性骨质疏松症(T2DOP)的机制。方法 将大鼠随机分为假手术组(sham 组)、T2DOP 组、EM 组(予恩格列净干预)和 EM + Anisomycin 组(予 EM + JNK 激活剂 Anisomycin 干预),每组各 10 只。收集 4 组大鼠体重、血糖、血酸水平、骨代谢指标及股骨生物力学特征。采用 Micro-CT 测定股骨显微结构;HE 染色检测股骨组织病理学变化;蛋白质印迹法(Western blot)检测骨组织中氨基末端激酶 1(JNK1)、磷酸化 JNK1(p-JNK1)、c-Jun、磷酸化 c-Jun(p-c-Jun)蛋白表达水平并分组进行比较。结果 T2DOP 组大鼠体重明显低于 sham 组,空腹血糖(FPG)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平均明显高于 sham 组;EM 组大鼠体重明显高于 T2DOP 组,FPG、TG、TC 及 LDL-C 水平均明显低于 T2DOP 组,TG、TC 及 LDL-C 水平均明显高于 sham 组;EM + Anisomycin 组大鼠体重明显低于 EM 组,FPG、TG、TC 及 LDL-C 水平均明显高于 EM 组( $P < 0.05$ )。T2DOP 组大鼠血清骨特异性转录因子(CBF- $\alpha 1$ )、I 型前胶原氨基端原肽(P I NP)、骨钙素(OC)及 I 型胶原交联羧基端肽(CTX I)水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、骨小梁骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)均明显低于 sham 组,骨小梁间隔(Tb. Sp)高于 sham 组;EM 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP、OC 及 CTX-1 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显高于 T2DOP 组,Tb. Sp 低于 T2DOP 组;EM 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP 及 OC 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显低于 sham 组,CTX-1 水平及 Tb. Sp 均高于 sham 组;EM + Anisomycin 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP、OC 及 CTX-1 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显低于 EM 组,Tb. Sp 高于 EM 组( $P < 0.05$ )。T2DOP 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平均明显高于 sham 组;EM 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平均明显低于 T2DOP 组;EM + Anisomycin 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平均明显高于 EM 组( $P < 0.05$ )。结论 恩格列净可改善 T2DOP 大鼠骨代谢失衡和骨微结构,其作用机制可能和抑制 JNK/c-Jun 信号通路激活有关。

**【关键词】** 恩格列净; c-Jun 氨基末端激酶信号通路; 2 型糖尿病性骨质疏松症; 骨微结构; 骨代谢

[中图分类号] R587.1

[文献标识码] A

**Mechanism study of empagliflozin improving type 2 diabetes osteoporosis through c-Jun N-terminal kinase signaling pathway** Hu Yanlin, Wei Qi. Department of Endocrinology, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan 430061, China

**【Abstract】 Objective** To explore the mechanism of enggligin improving type 2 diabetes osteoporosis (T2DOP) through c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal pathway. **Methods** Randomly divide the rats into sham group (sham group), T2DOP group, EM group (treated with empagliflozin intervention) and EM + Anisomycin group (treated with EM + JNK activator Anisomycin intervention), with 10 rats in each group. Body weight, blood glucose, blood acid levels, bone metabolism indexes and biomechanical characteristics of the femur in 4 groups were collected. Using Micro-CT to determine the microstructure of the femur; HE staining was used to detect pathological changes in femoral tissue; Western blotting was used

作者单位: 430000 武汉, 武汉市红十字会医院内分泌科

通讯作者: 魏琦, E-mail: jlad4494@21cn.com

to detect the expression levels of JNK1, phosphorylated JNK1 (p-JNK1), c-Jun and phosphorylated c-Jun (p-c-Jun) proteins in bone tissue and group them for comparison. **Results** Weight of rats in T2DOP group was significantly lower than that in sham group, and levels of fasting glucose (FPG), triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were significantly higher than those in sham group; weight of rats in EM group was significantly higher than that in T2DOP group, while levels of FPG, TG, TC and LDL-C were significantly lower than those in T2DOP group, and levels of TG, TC and LDL-C levels were significantly higher than those in sham group; weight of rats in EM + Anisomycin group was significantly lower than that in EM group, whereas levels of FPG, TG, TC and LDL-C were significantly higher than those in EM group ( $P < 0.05$ ). Levels of serum bone-specific transcription factor (CBF- $\alpha 1$ ), type I procollagen amino-terminal pro-peptide (P I NP), osteocalcin (OC), and type I collagen cross-linking carboxy-terminal peptide (CTXI), the maximal load of femur, the fracture deflection, the elastic modulus, the bone mineral density of trabeculae (BMD), the bone volume fraction (BV/TV), the number of trabeculae (Tb. N), the thickness of trabeculae (Tb. Th) in T2DOP group were significantly lower than those in sham group, and the trabecular spacing (Tb. Sp) was higher than that in sham group; serum CBF- $\alpha 1$ , P I NP, OC and CTX-1 levels, maximum femur loading, deflection at fracture, elastic modulus, BMD, BV/TV, Tb. N and Tb. Th in EM group were significantly higher than those in T2DOP group, and Tb. Sp was lower than that in T2DOP group; serum CBF- $\alpha 1$ , P I NP and OC levels, femur maximum load, fracture deflection, elastic modulus, BMD, BV/TV, Tb. N, Tb. Th were significantly lower than those in sham group, and CTX-1 level and Tb. Sp were higher than those in sham group; EM + Anisomycin group rats serum CBF- $\alpha 1$ , P I NP, OC and CTX-1 levels, femur maximum load, fracture deflection, elastic modulus, BMD, BV/TV, Tb. N, Tb. Th were significantly lower than those in EM group, and Tb. Sp was higher than that in EM group ( $P < 0.05$ ). Protein expression levels of JNK1, p-JNK1, c-Jun, and p-c-Jun in the femoral tissues of rats in T2DOP group were significantly higher than those in sham group; protein expression levels of JNK1, p-JNK1, c-Jun, and p-c-Jun in the femoral tissues of rats in EM group were significantly lower than those in T2DOP group; and protein expression levels of JNK1, p-JNK1, c-Jun, and p-c-Jun in the femoral tissues of rats in EM + Anisomycin group were significantly higher than those in EM group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Empagliflozin can improve bone metabolic volume imbalance and bone microarchitecture in T2DOP rats, and its mechanism of action may be related to the inhibition of JNK/c-Jun signaling pathway activation.

[**Key words**] Empagliflozin; c-Jun N-terminal kinase signaling pathway; Type 2 diabetes osteoporosis; Bone microstructure; Bone metabolism

2 型糖尿病性骨质疏松症 (T2DOP) 是一种以骨折风险增加的代谢性疾病, 其中糖尿病导致骨脆性增加、骨量减少等是导致其发生的主要因素<sup>[1]</sup>。目前我国 T2DOP 的患病率为 37.8%, 且糖尿病发病率的增加导致 T2DOP 发病率呈上升趋势<sup>[2-3]</sup>, 钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂 (SGLT2i) 是一种不需要  $\beta$  细胞参与的口服降糖药物, 其不仅具有降血糖作用, 还能对疾病代谢异常发挥改善作用<sup>[4]</sup>。恩格列净是 SGLT2i 之一, 具有高选择性, 能通过抑制肾脏近曲小管 S1、S2 段的 SGLT2 阻止肾脏对葡萄糖的重吸收, 通过引导额外的葡萄糖排泄到尿液中而达到降低血糖的目的<sup>[5-6]</sup>。根据临床研究结果显示, 恩格列净还可降低肾病发生发展<sup>[7-8]</sup>, 目前其对骨代谢的影响存在争议。c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 是丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 家族成员之一, 可通过磷酸化没有活性蛋白中的丝氨酸和苏氨酸残基调控细胞生长、凋亡等多种过程<sup>[9]</sup>。相关研究发现, JNK 信号通路中的调节酶类可介导多种疾病的发生发展, 如肥胖、胰岛素抵抗及 2 型糖尿病 (T2DM) 等<sup>[10]</sup>, 但其在 T2DOP 中的作用尚不清楚。因此, 本研究旨在探讨恩格列净能否通过 JNK 通路改善 T2DOP。

## 材料与方法

1. 材料: SPF 级、12 周龄、体重 280 g ~ 300 g 的雌性 SD 大鼠 45 只, 均购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [许可证号: SCXK (鲁) 2019-0003]。所有大鼠统一饲养在本院的动物房内, 环境保持在温度 18 ~ 22 °C 和相对湿度 40% ~ 70%, 室内昼夜节律光照 (12 h/12 h), 自由饮水摄食, 适应 1 周。恩格列净片 (国药准字 H20213065, 正大天晴药业公司); 兔抗 JNK1、兔抗 p-JNK1、兔抗 c-Jun、兔抗 p-c-Jun、兔抗  $\beta$ -actin、山羊抗兔 IgG (美国 Abcam 公司); 链脲佐霉素 (STZ, 纯度 > 99%, 合肥博美生物科技有限责任公司); 蛋白提取试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); HE 染色试剂盒 (北京博奥拓达科技有限公司); JNK 激活剂 Anisomycin (美国 Abcam 公司); 血糖仪 (型号: ACCU-CHEK, 上北京中西远大科技有限公司); 光学显微镜 (型号: DM500, 上海光学仪器五厂); 凝胶成像系统 (型号: Gel Doc XR+, 美国伯乐公司)。

## 2. 方法

(1) 分组和模型制备<sup>[11]</sup>: 将 45 只大鼠随机分为假手术组 (sham 组) 10 只和造模组 35 只。造模组所有

大鼠均制备 T2DOP 模型,予高糖高脂饮食(正常饲料 66.5%、猪油 30%、胆固醇 2.5%、脱氧胆酸 1%)喂养 8 周,腹腔注射 STZ 溶液 30 mg/kg 建立 T2DM 模型,当尾静脉采血空腹血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 时,可视为造模成功。35 只大鼠中有 3 只大鼠造模失败并予剔除。T2DM 大鼠模型造模成功后 2 周,采用双侧卵巢摘除法制备骨质疏松(OP)大鼠模型,当 Micro-CT 测定结果示骨密度下降、骨组织形态异常、骨质破坏等时,可视为模型制备成功。32 只大鼠中共有 30 只成功建模,按照随机数字表法将其分为 T2DOP 组、EM 组(予恩格列净干预)、EM + Anisomycin 组(予 EM + JNK 激活剂 Anisomycin 干预),每组各 10 只。sham 组大鼠予普通饲料饲养 8 周,然后予等量(30 mg/kg)生理盐水腹腔注射 2 周后行开腹手术(未摘除双侧卵巢)。将恩格列净片用 0.5% CMC-Na 溶液配制成 2 g/L 的溶液,EM 组大鼠予恩格列净溶液 10 mg/kg、每日 1 次灌胃,连续 4 周;EM + Anisomycin 组大鼠在 EM 组处理方法基础上,经腹腔一次性注射 JNK 激活剂 Anisomycin 5 mg/kg;同时 sham 组和 EM 组予等量生理盐水(5 mg/kg)每日 1 次灌胃,连续 4 周。

(2)标本采集及处理:药物干预结束后 12 h,称取各组大鼠体重,予巴比妥钠 45 mg/kg 腹腔注射麻醉,取 5 ml 腹主动脉血于  $-20$  °C 冰箱保存。取血后麻醉过量处死大鼠,解剖左右股骨,分别进行骨生物力学分析和显微 CT 分析,后一部分置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,另一部分股骨保存于  $-80$  °C 冰箱中。

(3)血糖、血脂和骨代谢检测:采集各组大鼠尾静脉全血检测尾静脉血中空腹血糖(FPG)。提取保存于  $-20$  °C 冰箱中腹主动脉血,在 4 °C 下,3 000 r/min 速度离心 15 min,收集血清,采用 ELISA 试剂盒检测血清脂质[总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]和骨代谢指标[骨特异性转录因子(CBF- $\alpha 1$ )、I 型前胶原氨基端原肽(P I NP)、骨钙素(OC)、I 型胶原交联羧基端肽(CTX I)]水平。

(4)股骨生物力学分析:取各组大鼠股骨组织并固定于 70% 乙醇中,将股骨表面上的液体用医用纱布吸干,后将大鼠股骨放置到 OST-15 型分析仪上,设置加载速度为 2 mm/min,跨距为 20 mm。通过三点弯曲测试分析股骨的生物力学特征。根据载荷-位移曲线绘制每个生物力学特征,计算最大载荷、断裂挠度和弹性模量。

(5)Micro-CT 测定股骨显微结构:取各组大鼠股骨组织,将其迅速放入新鲜配制的 40 g/L 的多聚甲醛溶液中进行固定。在 4 °C 的环境中,固定样本 24 h 后,取出一部分组织,使用 Micro-CT 机扫描胫骨干骺端,

以观察骨组织结构。用三维重建分析大鼠骨微结构,参数包括骨矿物质密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨体积分数(BV/TV)和骨小梁数量(Tb. N)。

(6)HE 染色检测股骨组织病理学变化:取出股骨组织用 PBS 清洗,随后将样本置于 10% EDTA 溶液中,在 4 °C 环境下进行脱钙处理 20 d。后经乙醇常规脱水、二甲苯透明和石蜡包埋处理,切片连续纵向切成厚度为 5  $\mu$ m 的组织切片,将苏木素和伊红分别加入到组织切片中,染色后置于光学显微镜下,观察大鼠骨组织结构变化。

(7)蛋白质印迹法(Western blot)检测骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达:取大鼠股骨组织,提取组织中总蛋白;用 BCA 法检测总蛋白水平。将蛋白溶液的终浓度配制为 2  $\mu$ g/ml,将蛋白溶液置于热水中煮沸 10 min,后保存在  $-20$  °C 冰箱中。将 30  $\mu$ g 的蛋白样品用 200 V 电压电泳,转移蛋白样品与 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h,将一抗(1:500)加入到 PVDF 膜上,4 °C 孵育过夜;将 PVDF 膜冲洗干净后加入二抗(1:1 000),室温孵育 2 h。ECL 放光液加入到细胞中,曝光显影后用 Image Lab 软件分析条带灰度值。

3. 统计学处理:应用 Graphpad priam 8.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1.4 组大鼠体重、FPG 及血脂水平比较:4 组大鼠体重、FPG 及 TG、TC、LDL-C 水平比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。T2DOP 组大鼠体重明显低于 sham 组,FPG、TG、TC 及 LDL-C 水平均明显高于 sham 组;EM 组大鼠体重明显高于 T2DOP 组,FPG、TG、TC 及 LDL-C 水平均明显低于 T2DOP 组,TG、TC 及 LDL-C 水平均明显高于 sham 组;EM + Anisomycin 组大鼠体重明显低于 EM 组,而 FPG、TG、TC 及 LDL-C 水平均明显高于 EM 组( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.4 组大鼠骨代谢指标、骨生物力学特征及骨微结构比较:4 组大鼠骨代谢指标、骨生物力学特征及骨微结构比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。T2DOP 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP、OC 及 CTX-1 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显低于 sham 组,Tb. Sp 高于 sham 组;EM 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP、OC 及 CTX-1 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显高于 T2DOP 组,Tb. Sp 低于 T2DOP 组;

表 1 4 组大鼠体重、FPG 及血脂水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	体重 (mg)	FPG (mmol/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
sham 组	451.32 ± 24.81	5.42 ± 0.91	0.51 ± 0.08	1.06 ± 0.15	0.59 ± 0.07
T2DOP 组	326.71 ± 19.62 <sup>a</sup>	25.84 ± 2.67 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.18 <sup>a</sup>
EM 组	420.54 ± 21.35 <sup>b</sup>	10.86 ± 1.53 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.10 <sup>ab</sup>	1.34 ± 0.17 <sup>ab</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>ab</sup>
EM + Anisomycin 组	331.83 ± 20.01 <sup>c</sup>	24.61 ± 2.42 <sup>c</sup>	1.49 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.05 ± 0.21 <sup>c</sup>	1.30 ± 0.16 <sup>c</sup>
F 值	85.190	235.800	146.100	90.470	99.940
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 T2DOP 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 EM 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

表 2 4 组大鼠骨代谢指标、骨生物力学特征及骨微结构比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	CBF- $\alpha 1$ ( $\mu\text{g/L}$ )	P I NP ( $\mu\text{g/L}$ )	OC ( $\mu\text{g/L}$ )	CTX-1 ( $\mu\text{g/L}$ )	最大负荷 (N)	断裂挠度 (mm)	弹性模量 (mPa)
sham 组	68.31 ± 10.06	48.36 ± 6.91	27.32 ± 5.46	14.86 ± 1.69	123.46 ± 26.81	1.41 ± 0.25	9 012.45 ± 912.26
T2DOP 组	29.74 ± 3.51 <sup>a</sup>	20.35 ± 3.42 <sup>a</sup>	15.41 ± 2.81 <sup>a</sup>	8.31 ± 0.99 <sup>a</sup>	58.71 ± 8.92 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.10 <sup>a</sup>	4 983.72 ± 615.93 <sup>a</sup>
EM 组	59.62 ± 7.48 <sup>ab</sup>	41.27 ± 5.06 <sup>ab</sup>	23.15 ± 3.29 <sup>ab</sup>	23.15 ± 3.29 <sup>ab</sup>	97.05 ± 23.04 <sup>ab</sup>	1.26 ± 0.18 <sup>ab</sup>	7 892.36 ± 809.47 <sup>ab</sup>
EM + Anisomycin 组	30.15 ± 3.62 <sup>c</sup>	21.81 ± 3.84 <sup>c</sup>	16.82 ± 2.96 <sup>c</sup>	13.26 ± 1.45 <sup>c</sup>	59.42 ± 10.01 <sup>c</sup>	0.85 ± 0.09 <sup>c</sup>	5 014.61 ± 620.84 <sup>c</sup>
F 值	87.300	116.700	23.130	94.490	27.700	30.880	74.310
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

组别	BMD ( $\text{g}/\text{mm}^3$ )	BV/TV (%)	Tb. N ( $\text{mm}^{-1}$ )	Tb. Sp ( $\mu\text{m}$ )	Tb. Th ( $\mu\text{m}$ )
sham 组	0.28 ± 0.04	29.46 ± 3.058	3.26 ± 0.42	95.36 ± 10.72	65.86 ± 8.91
T2DOP 组	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	12.31 ± 1.67 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.18 <sup>a</sup>	249.15 ± 20.81 <sup>a</sup>	29.74 ± 3.62 <sup>a</sup>
EM 组	0.23 ± 0.03 <sup>ab</sup>	25.81 ± 2.46 <sup>ab</sup>	2.94 ± 0.27 <sup>ab</sup>	185.47 ± 17.34 <sup>ab</sup>	58.32 ± 6.84 <sup>ab</sup>
EM + Anisomycin 组	0.11 ± 0.02 <sup>c</sup>	13.06 ± 1.71 <sup>c</sup>	1.08 ± 0.19 <sup>c</sup>	250.26 ± 20.15 <sup>c</sup>	30.15 ± 3.65 <sup>c</sup>
F 值	96.200	144.600	174.200	170.100	92.800
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 T2DOP 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 EM 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

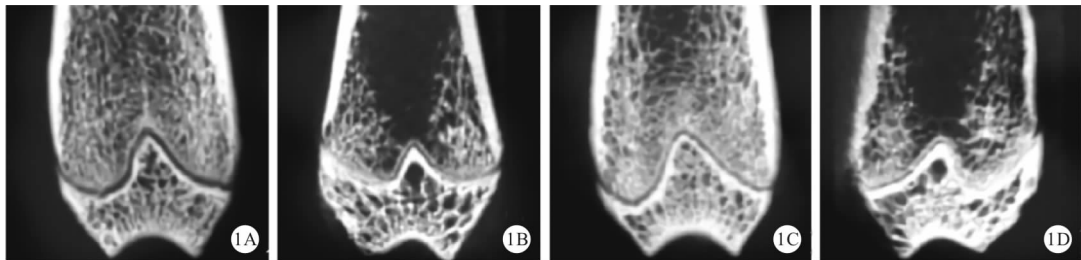


图 1 4 组大鼠股骨 Micro-CT 三维重建图 (A: sham 组, 骨组织结构正常; B: T2DOP 组, 骨密度降低、骨小梁间隙增大; C: EM 组, 骨密度增加、骨小梁间隙减小; D: EM + Anisomycin 组, 骨密度降低、骨小梁间隙增大)

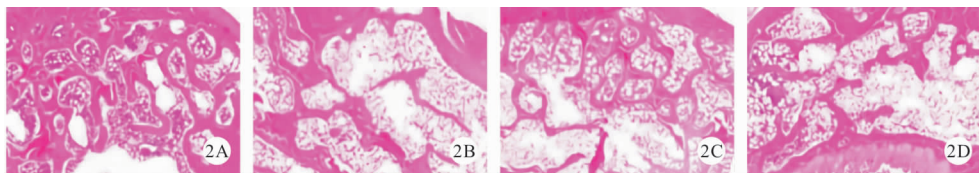


图 2 4 组大鼠股骨组织病理学检测结果 (A: sham 组; B: T2DOP 组; C: EM 组; D: EM + Anisomycin 组; HE 染色,  $\times 200$ )

EM 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP 及 OC 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显低于 sham 组, CTX-1 水平及 Tb. Sp 均高于 sham 组; EM + Anisomycin 组大鼠血清 CBF- $\alpha 1$ 、P I NP、OC 及 CTX-1 水平、股骨最大负荷、断裂挠度、弹性模量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 均明显低于 EM 组, Tb. Sp 高于 EM 组 ( $P < 0.05$ )。见表 2、图 1。

3.4 组大鼠股骨组织病理学变化及股骨组织中蛋白表达水平比较: sham 组大鼠骨小梁结构清晰、形态

完整,且骨小梁排列整齐呈网状; T2DOP 组大鼠骨小梁数量较 sham 组明显减少,且大量骨小梁断裂,各空隙明显变大; EM 组大鼠骨小梁数量较 T2DOP 组明显增加,仅有少量骨小梁断裂,可见新生骨小梁生成,且骨小梁数量明显增加、形态相对完整; EM + Anisomycin 组与 T2DOP 组大鼠骨小梁数量及形态变化相似。见图 2。4 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。T2DOP 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun

蛋白表达水平明显高于 sham 组;EM 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平明显低于 T2DOP 组;EM + Anisomycin 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平明显高于 EM 组( $P < 0.05$ )。见表 3。

**表 3** 4 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	JNK1 蛋白	P-JNK1 蛋白	c-Jun 蛋白	p-c-Jun 蛋白
sham 组	0.31 ± 0.05	0.26 ± 0.03	0.61 ± 0.07	0.54 ± 0.06
T2DOP 组	1.69 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.18 <sup>a</sup>
EM 组	0.62 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.08 <sup>b</sup>
EM + Anisomycin 组	1.65 ± 0.15 <sup>c</sup>	1.45 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.80 ± 0.20 <sup>c</sup>	1.69 ± 0.17 <sup>c</sup>
F 值	351.100	579.500	163.300	220.200
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 T2DOP 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 EM 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

糖尿病是一种以高血糖为特征的常见病,在世界范围内发病率较高<sup>[12-13]</sup>。T2DOP 是糖尿病最严重的一种并发症,常表现为患处疼痛、功能障碍、畸形甚至骨折等症状,对患者的生活质量造成严重的影响<sup>[14]</sup>。

有学者研究发现,糖尿病患者的骨折发生率比非糖尿病患者高约 50%<sup>[15]</sup>。因此,建立稳定、简便、高效的 T2DOP 动物模型,是寻找治疗 T2DOP 有效药物的重要保障。目前 T2DOP 建模的方法有 3 种,即为诱导型、自发型和转基因/基因敲除型,其中 STZ 诱导型因其相对便宜、高效、简便而被广泛应用。本研究采用 STZ 诱导并摘除卵巢,通过高血糖和雌激素缺乏共同制备 T2DOP,结果显示 T2DOP 组大鼠体重明显降低,FBG 及血脂 TG、TC 和 LDL-C 水平明显升高,BMD 明显减少,骨显微结构显著受损,呈现骨质疏松症状,提示 T2DOP 模型制备成功。

SGLT2 是肾小管上皮细胞表面的载体蛋白,其功能异常可通过导致肾小管对葡萄糖的重吸收不足引发高血糖<sup>[16]</sup>。SGLT2i 可减少肾小管重吸收的葡萄糖量,增加葡萄糖在尿液中的排泄量,并促进大量的葡萄糖从尿液排出,从而有效降低血糖水平<sup>[17]</sup>。近年来研究发现,SGLT2i 可减少肾小管重吸收的磷酸盐,尿液中磷酸盐的排泄量,从而对磷酸盐代谢异常导致的骨质疏松发挥治疗作用<sup>[18]</sup>。恩格列净是临床常用的 SGLT2i 之一,具有高选择性、高亲和力,且能够有效抑制 SGLT2 载体。本研究结果显示,EM 组大鼠 FBG 及血脂 TG、TC 和 LDL-C 水平明显降低,提示恩格列净可有效改善 T2DOP 临床症状,对 T2DOP 发挥治疗作用。CBF- $\alpha$ 1、P I NP、OC 和 CTX-1 是与骨代谢密切相关的

重要指标,王少容等<sup>[19]</sup>的研究证实,可通过检测血清中 P I NP、OC、 $\beta$ -CTx 等指标预测骨质疏松程度。本研究结果显示,EM 组大鼠血清中 CBF- $\alpha$ 1、P I NP、OC、CTX-1 水平及 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th、股骨最大负荷、断裂挠度和弹性模量均明显增加,Tb. Sp 降低,提示恩格列净可对 T2DOP 大鼠骨代谢失衡和骨微结构发挥改善作用。

JNK 是 MAPK 家族成员之一,有研究发现糖尿病患者中 JNK 信号通路被激活,其活化能够抑制胰岛素分泌,同时增强胰岛素抵抗,导致机体水平持续高表达<sup>[20]</sup>。c-Jun 是一个重要的转录因子,也是 JNK 下游分子之一。研究发现糖尿病患者中 c-Jun 表达水平升高,可介导胰岛素信号通路、脂肪代谢等<sup>[21]</sup>。近年来研究发现,JNK/c-Jun 信号通路在 T2DOP 中发挥重要作用<sup>[22]</sup>,抑制该信号通路可能是治疗 T2DOP 的新策略。本研究结果显示,T2DOP 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平明显升高,EM 组大鼠股骨组织中 JNK1、p-JNK1、c-Jun、p-c-Jun 蛋白表达水平明显降低,以上结果均提示恩格列净可抑制 T2DOP 大鼠 JNK/c-Jun 信号通路激活。因此猜测,恩格列净改善 T2DOP 大鼠骨代谢失衡和骨微结构与抑制 JNK/c-Jun 信号通路激活有关。为了验证这一猜想,本研究采用恩格列净联合 JNK 激活剂 Anisomycin 共同干预 T2DOP 大鼠,结果显示 EM + Anisomycin 组大鼠体重降低、FBG 升高,血清中 CBF- $\alpha$ 1、P I NP、OC 含量、BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 及股骨最大负荷、断裂挠度和弹性模量均降低,Tb. Sp 升高,提示 Anisomycin 可减弱恩格列净对 T2DOP 大鼠骨代谢失衡和骨微结构的改善作用。

综上,恩格列净可改善 T2DOP 大鼠骨代谢量失衡和骨微结构,对 T2DOP 大鼠发挥治疗作用,其作用机制可能和抑制 JNK/c-Jun 信号通路激活有关。由于时间和成本等因素,本研究未能单独设置高糖组以及骨质疏松组,对 JNK 信号通路变化的研究存在一定的局限性,有待在今后的研究中增加相应分组进一步完善。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang Z, Ji C, Wang YN, et al. Maresin1 suppresses high-glucose-induced ferroptosis in osteoblasts via NRF2 activation in type 2 diabetic osteoporosis[J]. Cells, 2022, 11(16):2560.
- [2] Ma H, Wang X, Zhang W, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020:9067610.
- [3] Sheu A, Greenfield JR, White CP, et al. Assessment and treatment of osteoporosis and fractures in type 2 diabetes[J]. Trends Endocrinol Metab, 2022, 33(5):333-344.
- [4] Neuen BL, Oshima M, Agarwal R, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and risk of hyperkalemia in people with type 2 diabetes: a meta-analysis of individual participant data from randomized, controlled trials[J]. Circulation, 2022, 145(19):1460-1470.

[5] Xu B, Li S, Kang B, et al. The current role of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus management[J]. Cardiovasc Diabetol, 2022, 21(1):83.

[6] 童凯, 罗红兰. 恩格列净调节 AMP 依赖蛋白激酶/蛋白激酶 B/环磷酸腺苷效应元件结合蛋白信号通路对肺动脉高压大鼠肺血管重构的影响[J]. 临床内科杂志, 2023, 40(5):338-342.

[7] Mima A. Sodium-Glucose Cotransporter 2 inhibitors in patients with non-diabetic chronic kidney disease[J]. Adv Ther, 2021, 38(5):2201-2212.

[8] 林勇, 阮丹丹, 王寅, 等. 恩格列净与利格列汀治疗 2 型糖尿病的临床效果及对患者肾功能的影响对比[J]. 中国医药, 2023, 18(4):531-535.

[9] Li G, Qi W, Li X, et al. Recent advances in c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitors[J]. Curr Med Chem, 2021, 28(3):607-627.

[10] Yung JHM, Giacca A. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in obesity and type 2 diabetes[J]. Cells, 2020, 9(3):706.

[11] Abe K, Miyakoshi N, Kasukawa Y, et al. Effects of teriparatide and low-intensity aerobic exercise on osteopenia in type 2 diabetes mellitus rats [J]. J Bone Miner Metab, 2022, 40(2):229-239.

[12] Geng T, Zhu K, Lu Q, et al. Healthy lifestyle behaviors, mediating biomarkers, and risk of microvascular complications among individuals with type 2 diabetes: A cohort study[J]. PLoS Med, 2023, 20(1):e1004135.

[13] Sasako T, Yamauchi T, Ueki K. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab J, 2023, 47(2):185-197.

[14] Zhao Y, Du Y, Gao Y, et al. ATF3 regulates osteogenic function by mediating osteoblast ferroptosis in type 2 diabetic osteoporosis [J]. Dis Markers, 2022, 2022:9872243.

[15] Akagawa M, Miyakoshi N, Kasukawa Y, et al. Effects of activated vitamin D, alfacalcidol, and low-intensity aerobic exercise on osteopenia and muscle atrophy in type 2 diabetes mellitus model rats [J]. PLoS One, 2018, 13(10):e0204857.

[16] Liu H, Sridhar VS, Boulet J, et al. Cardiorenal protection with SGLT2 inhibitors in patients with diabetes mellitus; from biomarkers to clinical outcomes in heart failure and diabetic kidney disease [J]. Metabolism, 2022, 126:154918.

[17] Korbut AI, Taskaeva IS, Bgatova NP, et al. SGLT2 inhibitor empagliflozin and DPP4 inhibitor linagliptin reactivate glomerular autophagy in db/db mice, a model of type 2 diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8):2987.

[18] Dong B, Lv R, Wang J, et al. The extraglycemic effect of SGLT-2is on mineral and bone metabolism and bone fracture [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13:918350.

[19] 王少容, 梁声强, 林淳峰. 基于血清  $\beta$ -CTx、P I NP 及 OC 的列线图模型对绝经后骨质疏松预测价值的研究 [J]. 中国妇幼健康研究, 2023, 34(5):53-59.

[20] Wang G, Zhao Z, Ren B, et al. Exenatide exerts a neuroprotective effect against diabetic cognitive impairment in rats by inhibiting apoptosis: Role of the JNK/cJUN signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2022, 25(4):111.

[21] Jiao Y, Zhang YH, Wang CY, et al. MicroRNA-7a-5p ameliorates diabetic peripheral neuropathy by regulating VDAC1/JNK/c-JUN pathway [J]. Diabet Med, 2023, 40(1):e14890.

[22] Lee KM, Lee CY, Zhang G, et al. Methylglyoxal activates osteoclasts through JNK pathway leading to osteoporosis [J]. Chem Biol Interact, 2019, 308:147-154.

(收稿日期:2023-07-21)

(本文编辑:高婷)



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2024.03.015

http://www.lcnkz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2024.03.015

## • 病例报告 •

### 食物中毒合并噬血细胞综合征一例

李紫玲 许淑云 施静

[关键词] 噬血细胞综合征; 食物中毒; 皂苷; 植物血凝素

[中图分类号] R552 [文献标识码] B

患者,女,58岁,因“发热9天”于2021年9月21日入院。患者2021年9月12日午餐食用未熟扁豆后出现高热,最高达39℃,伴乏力,无头痛、咳嗽、胸痛、皮疹、关节痛、盗汗等不适。随后出现寒战、恶心、呕吐2次,为胃内容物且无咖啡色物质,腹泻2次,为稀便且无血性物质。共餐人员亦有腹泻,但无发热、呕吐等。9月14日外院血常规示WBC计数 $2.02 \times 10^9/L$ ,中性粒细胞计数 $1.55 \times 10^9/L$ ,淋巴细胞计数 $0.34 \times 10^9/L$ ,Hb 113 g/L,PLT计数 $74 \times 10^9/L$ ,C反应蛋白(CRP)63.25 mg/L,ALT 197.7 U/L,AST 183.6 U/L;腹部CT:肝内多发囊肿,脾脏增大。外院予抗感染(阿奇霉素、头孢呋辛、环丙沙星)、护肝等治疗后,患者恶心呕吐、腹泻等症状消失,但体温仍高于39℃。为求进一步诊治遂来我院,急诊科以“食物中毒”收入ICU。既往肝囊肿史数年。已绝经,家族史无特殊。体格检查:T 40.1℃,

P 102次/分,R 20次/分,Bp 162/88 mmHg。实验室检查:血清铁蛋白(SF)8 017.5  $\mu\text{g/L}$  (15.0 ~ 150.0  $\mu\text{g/L}$ );纤维蛋白原1.88 g/L (2.00 ~ 4.00 g/L);细胞因子检测:IL-6 119.5 pg/ml (<7.0 pg/ml),IL-2R >7 500 U/ml (223 ~ 710 U/ml),IL-1 $\beta$  17.0 pg/ml (<5.0 pg/ml),肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  84.2 pg/ml (<8.1 pg/ml);女性肿瘤标志物:糖类抗原(CA)125 342.8 U/ml ( $\leq 35.0$  U/ml),余未见明显异常;风湿免疫全套、狼疮抗凝物测定、抗中性粒细胞胞浆抗体、抗肾小球基底膜抗体、自身免疫性肝炎全套均无异常;直接抗人球蛋白试验阴性;血清肥达试验阴性;血真菌(1,3)- $\beta$ -D 葡聚糖、曲霉菌半乳甘露聚糖、念珠菌甘露糖均阴性;血甲肝、戊肝 IgM 均阴性;血呼吸道合胞病毒、腺病毒、柯萨奇病毒 B 组、巨细胞病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒 IgM 均阴性;EB 病毒衣壳抗原 IgM 抗体定量 <10.0 U/ml;血浆 EB 病毒、巨细胞病毒核酸阴性;弓形虫 IgG、IgM 抗体均阴性;结核感染 T 细胞斑点试验无反应性;多次血、痰、尿及骨髓培养均阴性;全身正电子发射型计算机断层显像(PET)/CT 断层显像结果提示肝脏多发囊肿、脾脏稍大;骨髓组织学检查结果:髓过氧化物酶髓系阳性、CD34血管阳性、CD15粒系多为阳

基金项目:华中科技大学第二临床学院教学研究项目(202029)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸与危重症医学科

通讯作者:施静,E-mail: megerite@126.com