

二甲双胍治疗骨质疏松症的机制及研究进展

马朝霞, 刘 滇

(昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214)

摘要: 糖尿病和骨质疏松症是影响老年人健康和寿命的两大常见疾病, 糖尿病患者往往伴有骨密度降低、骨量下降、容易骨折等症状. 二甲双胍作为一种治疗 II 型糖尿病的传统口服降糖药, 在治疗骨质疏松症方面能够发挥一定的作用. 近年来, 二甲双胍在骨代谢中发挥的作用备受研究人员的关注. 基于此, 从动物模型、细胞水平和分子水平 3 个方面综述了二甲双胍治疗骨质疏松症的机制及研究进展.

关键词: 糖尿病; 骨质疏松症; 二甲双胍; 骨代谢

中图分类号: R681 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2019) 03 - 0104 - 04

DOI: 10. 14091/j. cnki. kmxyxb. 2019. 03. 022

Mechanism and Research Progress of Metformin in the Treatment of Osteoporosis

MA Zhaoxia, LIU Dian

(Medical College, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: Diabetes mellitus and osteoporosis are two common diseases affecting the health and longevity of the elderly. Diabetes patients often have bone density reduction, bone mass loss, fracture and other symptoms. Metformin, as a traditional oral medicine for the treatment of type II diabetes, also plays a role in the treatment of osteoporosis. In recent years, more and more studies have focused on the role of metformin in bone metabolism. Because of this, the mechanism and research progress of metformin in the treatment of osteoporosis has been summarized from the three aspects: animal model, cell level and molecular level.

Key words: diabetes mellitus; osteoporosis; metformin; bone metabolism

骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是以骨量降低、骨组织微结构破坏等为特征, 导致骨的脆性增加、易于骨折等的代谢性骨病. 而 II 型糖尿病 (Type II diabetes mellitus, T II DM) 患者往往伴发骨密度减低、骨量下降、容易骨折等症状^[1-2]. 二甲双胍作为一种对抗 II 型糖尿病的传统常用口服药物, 其治疗糖尿病的临床药效已得到充分肯定^[3]. 近年来, 越来越多的研究人员开始关注二甲双胍对骨代谢的影响. 因此, 本文结合相关文献, 分别从动物模型、细胞水平和分子水平 3 个方面, 综述二甲双胍治疗骨质疏松症的机制及研究进展.

1 在动物模型水平方面的研究进展

在进行疾病和药物、药理及药效研究时,

动物模型一直发挥着重要作用, 二甲双胍治疗骨质疏松症也不例外. Gao 等^[4]将 32 只雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠分为 SHAM 组 (假手术组) 和 OVX 组 (去势组), 去势 3 个月后, OVX 组再分为 OVX + 0 mg/(kg · day) 二甲双胍组、OVX + 50 mg/(kg · day) 二甲双胍组和 OVX + 100 mg/(kg · day) 二甲双胍组, SHAM 组正常饮食. 大鼠饲喂 2 个月后, 取各组大鼠的胫骨进行骨密度检测、micro-CT 检测和组织病理分析 (HE 染色). 结果显示, 和 SHAM 组相比, OVX + 0 mg/(kg · day) 二甲双胍组大鼠的骨密度下降, 骨小梁稀疏、变薄, 而饲喂二甲双胍组的大鼠, 骨密度升高, 骨小梁的连贯性和厚度都有一定程度的恢复, 并且饲喂高质量分数 [100 mg/(kg · day)] 二

收稿日期: 2018 - 11 - 07

基金项目: 昆明学院校级科研资助项目 (XJZZ1601).

作者简介: 马朝霞 (1984—), 女, 山东德州人, 讲师, 博士研究生, 主要从事细胞生物学及药理学研究.

甲双胍组比饲喂低质量分数 $[(50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{day}))]$ 二甲双胍组的大鼠恢复得好. Mai 等^[5]用 $100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{day})$ 二甲双胍饲喂 OVX 大鼠, 结果表明, 和 SHAM 组相比较, OVX 组骨密度和骨矿物含量都降低 ($P < 0.05$), 而和 OVX 组相比较, OVX + $100 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{day})$ 二甲双胍组的骨密度和骨矿物含量都升高 ($P < 0.05$). 通过胫骨近端的冯库萨 (Von Kossa) 染色对骨的钙化进行分析, 以及抗酒石酸酸性磷酸酶 (Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色研究破骨细胞的数量, 结果显示, 二甲双胍提高了 OVX 大鼠的骨小梁数量, 抑制了破骨细胞的分化. 周根祥等^[6]探讨了二甲双胍对去势大鼠胫骨生物力学的影响, 发现二甲双胍可提高去势大鼠骨密度及骨生物力学参数, 具有改善停经后骨质疏松性骨折的作用. 以上对动物模型的研究结果表明, 二甲双胍能阻止去势大鼠的骨流失.

2 在细胞水平方面的研究进展

骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 在体内或体外特定的诱导条件下, 可分化为脂肪、骨、软骨等. 而 BMSCs 的成骨分化和成脂分化相互拮抗并形成动态平衡, 当骨质疏松症发生时, 出现骨量减少及骨髓中脂肪组织增多相伴行的现象. 有研究^[7-8]发现, 多种原因引起的骨质疏松症均存在 BMSCs 成骨分化减弱, 成脂分化增强, 从而导致骨量减少和骨髓脂肪含量增多的现象, 提示 BMSCs 异常分化可能是骨质疏松症的主要原因之一. 体外培养 SD 大鼠的 BMSCs, 对其进行成骨诱导分化和成脂肪诱导分化, 并分别于实验组添加 $100 \mu\text{mol/L}$ 二甲双胍干预, 利用四甲基偶氮唑盐 (Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 检测, 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性分析, 茜素红 (Alizarin red) 染色, 油红 O (Oil red O) 染色, RT-PCR 分析等方法进行 BMSCs 增殖、成骨和成脂的检测, 得出二甲双胍对体外培养的骨向分化 BMSCs 细胞具有促增殖、促分化作用, 而对体外培养的脂向分化 BMSCs 细胞具有显著的促进增生、抑制分化作用的结论^[9-11].

除了研究二甲双胍对 BMSCs 骨向分化和脂向分化的作用外, 也有研究人员在其他类型的细胞中研究二甲双胍抗骨质疏松症的作用. Wang 等^[12]用

人类诱导多能干细胞衍生的间充质干细胞 (Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells, iPSC-MSC) 做研究, 结果显示, 二甲双胍不影响 iPSC-MSC 的生存能力, 能显著提高其 ALP 的活性, 促进矿化结节形成, 并提高成骨标志基因 *RUNX2* 和 *osterix* 的表达水平. 以上结果表明, 二甲双胍能促进 iPSC-MSC 细胞的成骨分化^[12]. 同理, 体外培养人类绒毛膜间充质干细胞 (Chorionic villous mesenchymal stem cells, CV-MSCs), 并在 CV-MSCs 培养基中分别加入成骨诱导分化液、成脂诱导分化液及 0.05 mmol/L 二甲双胍, 在加入二甲双胍的成骨诱导液中培养 7 d, 包括 *ALP*、*RUNX2* 和骨桥蛋白等成骨相关基因的表达量升高, 并促进 CV-MSCs 的矿化能力. 在加入二甲双胍的成脂诱导液中培养 14 d, 包括 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 等成脂相关基因的表达量下降. 培养 28 d 后, 加入二甲双胍的成脂诱导培养基中, 脂滴形成减少. 结果表明, 二甲双胍能够促进 CV-MSCs 的成骨分化, 抑制其成脂分化^[13].

骨骼中成骨细胞和破骨细胞的动态平衡是维持正常骨量的关键, Cortizo 等^[14]通过在两个成骨细胞样细胞 UMR106 和 MC3T3E1 中加入不同浓度 ($25 \sim 500 \mu\text{mol/L}$) 二甲双胍培养 24 h, 发现两种成骨细胞样细胞都呈现二甲双胍剂量依赖性增殖, 二甲双胍促进两种成骨细胞样细胞的成骨分化^[14]. 吕娇等^[15]通过体外培养大鼠原代下颌骨成骨细胞, 并给予不同浓度的二甲双胍进行干预, 结果表明, 在一定的浓度范围内, 二甲双胍能够提高成骨细胞的数量及碱性磷酸酶 (ALP) 的活性, 促进钙吸收和矿化结节形成, 提高成骨细胞的成骨能力. Mai 等^[5]在培养颅骨成骨细胞的上清液中加入二甲双胍来培养破骨细胞 Raw264.7, 结果二甲双胍抑制了破骨细胞 Raw264.7 的分化, 并且呈现浓度依赖性, 即二甲双胍的浓度越高, 抑制作用越强.

以上结果表明, 二甲双胍能够促进 BMSCs 细胞及其他类型 MSCs 细胞的成骨分化, 抑制成脂分化, 促进成骨细胞的分化, 抑制破骨细胞的分化, 从而在细胞层面揭示了二甲双胍治疗骨质疏松症的机制.

3 在分子水平方面的研究进展

Runt 相关的转录因子 2 (Runt-related transcrip-

tion factor 2, *RUNX2*) 是与成骨细胞分化相关的关键转录因子, MSCs 细胞可通过表达 *RUNX2* 基因来分化为成骨细胞^[16]; 作为成骨细胞成熟的标志, 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性的变化可在一定程度上反映动物的骨骼代谢状况^[17]; 核激素受体过氧化物激活受体 γ (Nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ , *PPAR γ*) 和 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding proteins α , *C/EBP α*) 是调控脂肪生成的关键转录因子, 并且 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 在同一个通路上发挥作用^[18], *PPAR γ* 的表达抑制 MSCs 的成骨细胞分化并诱导 MSCs 分化进入脂肪谱系. 二甲双胍能够在分子水平促进成骨相关基因 *RUNX2* 和 *ALP* 的表达, 抑制成脂相关基因 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达, 从而促进 MSCs 细胞的成骨分化, 抑制其成脂分化, 进而对骨质疏松症具有一定的治疗作用^[4, 9-11].

核因子 κ B 配体受体激活剂 (Receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL) 和骨保护素 (Osteoprotegerin, OPG) 是骨细胞分泌的主要细胞因子, 它们在破骨细胞的分化和功能中发挥关键的作用^[19-20]. RANKL 在破骨细胞或其前体的细胞表面与核因子 κ B (RANK) 的受体激活因子结合, 具有诱导破骨细胞分化、激活和存活的功能. OPG 是 RANKL 的竞争性抑制剂, 能够抑制破骨细胞的分化. 在小鼠颅骨成骨细胞和成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞中, 二甲双胍能够激活 OPG mRNA 和蛋白的表达, 抑制 RANKL mRNA 和蛋白的表达, 从而抑制了破骨细胞的分化, 进而抑制了骨吸收, 防止骨流失^[5].

AMP 激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是细胞和整个生物体水平的能量和体内代谢平衡的关键调节剂, AMPK 在包括骨组织的体内各种组织中广泛表达, AMPK 信号通路的激活能够促进成骨细胞的增殖、分化和矿化, 从而影响骨代谢^[21]. 在成骨样细胞 MC3T3-T1 中加入二甲双胍, 可促进细胞的矿化作用. Western blot 分析发现, 二甲双胍通过磷酸化 AMPK 来激活 AMPK 信号通路, 并呈现时间和浓度依赖性, 从而激活了成骨细胞的分化和矿化作用^[22].

以上研究结果表明, 二甲双胍能够促进成骨相关基因 *RUNX2* 和 *ALP* 的表达, 抑制成脂相关基因 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达; 二甲双胍抑制破骨细

胞激活因子 RANKL mRNA 和蛋白的表达, 能够激活 RANKL 的抑制剂 OPG mRNA 和蛋白的表达; 二甲双胍能够激活 AMPK 信号通路, 从而在分子层面揭示了二甲双胍治疗骨质疏松症的机制.

4 讨论

综上所述, 二甲双胍可以减少糖尿病患者发生骨折的风险, 对骨质疏松症治疗起到重要作用. 二甲双胍可提高骨质疏松动物模型的骨密度, 防止骨流失; 二甲双胍能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化, 抑制其成脂分化, 在促进成骨细胞的增殖、分化、矿化以及抑制破骨细胞活性等方面均能够发挥一定的作用; 二甲双胍能够促进成骨相关基因 *RUNX2* 和 *ALP* 等的表达, 抑制成脂相关基因 *PPAR γ* 和 *C/EBP* 等的表达, 并激活 AMPK 信号通路. 目前, 虽然有关二甲双胍在骨代谢中的作用研究取得了一些进展, 但是二甲双胍对骨代谢的作用机制尚需进一步深入研究.

[参考文献]

- [1] KHAZAI N B, BECK G R, UMPUERREZ G E. Diabetes and Fractures-an overshadowed association [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16 (6): 435-445.
- [2] RÄKEL A, SHEEHY O, RAHME E, et al. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2008, 34 (3): 193-205.
- [3] KIRPICHNIKOV D, MCFRLANE S I, SOWERS J R. Metformin: an update [J]. *Ann Intern Med*, 2002, 137 (1): 25-33.
- [4] GAO Y, LI Y F, XUE J, et al. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635 (3): 231-236.
- [5] MAI Q G, ZHANG Z M, XU S, et al. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112 (10): 2902-2909.
- [6] 周根祥, 高莺, 闫文婷, 等. 二甲双胍对去势大鼠胫骨生物力学影响的研究 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2017, 33 (6): 342-344.
- [7] BENAYAHU D, SHUR I, BEN-ELIYAHU S. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 79 (3): 407-415.
- [8] PINO A M, ROSEN C J, RODRIGUEZ J P. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis [J]. *Biol Res*,

- 2012, 45 (3): 279–287.
- [9] GAO Y, XUE J, LI XY, et al. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60 (12): 1695–1700.
- [10] 张海波, 梁伟之, 高莺, 等. 二甲双胍对骨向分化骨髓基质细胞增殖和分化的影响 [J]. 医学研究杂志, 2011, 40 (10): 131–133.
- [11] 张海波, 张绍军, 高莺, 等. 二甲双胍对脂向分化间充质干细胞的影响 [J]. 医学研究杂志, 2009, 38 (12): 55–57.
- [12] WANG P, MA T, GUO D, et al. Metformin induces osteoblastic differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12 (2): 437–446.
- [13] GU Q L, GU Y Z, YANG H L, et al. Metformin enhances osteogenesis and suppresses adipogenesis of human chorionic villous mesenchymal stem cells [J]. Tohoku J Exp Med, 2017, 241 (1): 13–19.
- [14] CORTIZO A M, SEDLINSKY C, MCCARTHY A D, et al. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 536 (2): 38–46.
- [15] 吕娇, 刘洪臣, 鄂玲玲, 等. 盐酸二甲双胍对大鼠下颌骨成骨细胞增殖、分化及矿化功能的影响 [J]. 中华老年口腔医学杂志, 2008, 6 (1): 47–50.
- [16] DUCY P, STARBUCK M, PRIEMEL M, et al. A cbfa 1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development [J]. Genes Dev, 1999, 13 (8): 1025–1036.
- [17] 王石颖, 闫素梅. 碱性磷酸酶在动物骨骼代谢中的研究进展 [J]. 饲料博览, 2009 (4): 14–16.
- [18] ROSEN E D, HSU C H, WANG X Z, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway [J]. Gene Dev, 2002, 16 (1): 22–26.
- [19] YASUDA H, SHIMA N, NAKAGAWA N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (7): 3597–3602.
- [20] TEITELBAUM S L. Bone resorption by osteoclasts [J]. Science, 2000, 289: 1504–1508.
- [21] KANAZAWA I, YAMAGUCHI T, YANO S, et al. Adiponectin and AMP kinase activator stimulate proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. BMC Cell Biol, 2007, 51 (8): 1–12.
- [22] KANAZAWA I, YAMAGUCHI T, YANO S, et al. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression [J]. Biochem Bioph Res Co, 2008, 375 (3): 414–419.

(上接第 103 页)

16 位单周期 CPU 模型机的设计和实现能够在学生的实训中起到示范的作用, 为进一步设计更加复杂的指令系统, 扩充 CPU 功能, 扩展内存容量, 以及下一步的流水、多周期 CPU 模型机系统等设计奠定了基础, 并对应用前景广阔的基于 FPGA 的系统设计进行了有意义的探索.

[参考文献]

- [1] 孙航. Xilinx 可编程逻辑器件的高级应用与设计技巧 [M]. 北京: 电子工业出版社, 2004.
- [2] 潘松, 黄继业, 潘明. EDA 技术实用教程 [M]. 北京: 科学出版社出版, 2010.
- [3] 张胜, 李方云, 曹家庆. 基于 VHDL 的简易 16 位模型机设计与实现 [J]. 教育教学论坛, 2018 (13): 275–278.
- [4] MIPS Technologies. MIPS32tmarchitecture for programmers: volume II set [EB/OL]. [2019–01–25]. <https://www.docin.com/p-337395071.html>.
- [5] 卜艳萍, 周伟. 汇编语言程序设计教程 [M]. 4 版. 北京: 清华大学出版社, 2016.
- [6] 王忠民, 王钰, 王晓婕. 微型计算机原理 [M]. 2 版. 西安: 西安电子科技大学出版社, 2007.
- [7] 杨晓明, 李永红, 晋玉剑, 等. 基于 CPLD 的 PIC32 单片机大容量存储系统设计 [J]. 2011, 35 (15): 78–80.
- [8] 汤书森, 马义德. 现代计算机组成原理课程特点与实验教学新模式探索 [J]. 高等理科教育, 2012 (1): 146–149.
- [9] 方恺晴, 张洪杰, 方红. 关于提升“计算机组成原理实验”课程教学质量的探讨 [J]. 实验室研究与探索, 2008, 27 (3): 97–100.