

## 脂糖代谢疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001877

## 二甲双胍对骨矿盐代谢作用机制初探

武凌鸽, 李乃适

(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院内分泌科、国家卫生健康委员会内分泌重点实验室, 北京 100730)

**【摘要】**二甲双胍作为一种治疗 2 型糖尿病经典的口服降糖药物,近年部分研究表明其对骨矿盐代谢有着积极作用,但作用机制十分复杂,包括通过多种途径诱导成骨细胞分化、减少破骨细胞数目、逆转高血糖直接或间接引起的骨细胞及成骨细胞凋亡等。本文拟对该领域近期进展作一简要综述。

**【关键词】**二甲双胍;骨矿盐代谢;2 型糖尿病;AMP 依赖的蛋白激酶;晚期糖基化终产物

**【中图分类号】**R589.5

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2018-10-01

## Mechanism of action of metformin in bone mineral metabolism

Wu Lingge, Li Naishi

(Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College; Key Laboratory of Endocrinology of National Health Commission)

**【Abstract】**Metformin, as a classic oral hypoglycemic agent for the treatment of type 2 diabetes, has been shown to have a positive effect on bone mineral metabolism in recent years, but its mechanism of action is very complicated, including inducing osteoblast differentiation, reducing the number of osteoclasts, and reversing the apoptosis of osteocytes and osteoblasts directly or indirectly induced by hyperglycemia. This article reviews the research advances in this field.

**【Key words】**metformin; bone mineral metabolism; type 2 diabetes; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; advanced glycation end product

据世界卫生组织调查显示,糖尿病的负担正在增加,全球约有 4.22 亿人受到影响,其中 2 型糖尿病占大多数<sup>[1]</sup>,且患病率随着年龄增长不断升高。骨质疏松也是老年人群的重要常见慢性病,对于女性加上绝经等因素后就更需要社会关注。随着我国社会老龄化程度越来越严重,人们越来越关注糖尿病与骨质疏松性骨折之间的关系<sup>[2]</sup>。部分临床研究报道,骨质疏松症是与糖尿病相关的慢性并发症之一<sup>[3-5]</sup>。与非糖尿病人群相比,糖尿病患者的骨折风险更高<sup>[6-7]</sup>,其中病理生理作用机制尚未彻底阐明,而某些降糖药物应用可能对骨代谢产生影响。二甲双胍作为一种广泛用于 2 型糖尿病患者的经典药物,近来部分临床研究表明其对骨质疏松症患者有增加骨密度的作用<sup>[8-12]</sup>;同时部分基础研究也表明其对成骨细胞有直接作用,增强其增殖、分化和矿化<sup>[13]</sup>。本研究回顾了近期相关文献,归纳了目前二甲双胍影响骨代谢的可能分子机制,以期对糖尿病所致骨质疏松相关药物研究及临床治疗提供帮助。

## 1 二甲双胍通过 AMPK 信号传导途径对刺激成骨作用

自 2001 年 Zhou 等发现二甲双胍可通过激活 AMP 依赖的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)降低肝葡萄糖生成水平,改善外周胰岛素敏感性和葡萄糖在肝脏和外周组织的摄取<sup>[14-17]</sup>,相关研究逐渐增多。近期 Kanazawa 等<sup>[18]</sup>的 1 项细胞实验提示 AMPK 能够调节成骨细胞分化:实验中脂联素和 5-氨基咪唑-4-羧基-1-β-D-核糖核苷酸都能激活 AMPK,刺激成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞的分化和矿化,提示 AMPK 可能在骨组织中具有重要功能。

## 1.1 二甲双胍激活 AMPK 通路促进成骨转录因子 Runx2 表达

Kanazawa 等<sup>[18]</sup>证实 MC3T3-E1 成骨细胞系中浓度为 50.0 μmol/L 的二甲双胍可以显著增加 I 型胶原、骨钙素表达,提高碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的活性,并诱导内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达,促进细胞矿化;而 AMPK 抑制剂 Ara-A 则使 eNOS 和 BMP-2 的表达量明显降低。说明浓度为 50.0 μmol/L 的二甲双胍可激活 AMPK 信号通路,增加 eNOS 和 BMP-2 的表达,促进成骨细胞的生成。但 Kasai 等<sup>[19]</sup>的研究发现在 MC3T3-E1 成骨细胞系中,当二甲双胍浓度达到 2 mmol/L 时,显著抑制核心结合因子(Runx2)以及骨钙素、骨涎蛋白(bone sialo-

**作者介绍:**武凌鸽, Email: 1078758181@qq.com,

研究方向:内分泌及代谢性疾病。

**通信作者:**李乃适, Email: LNS@medmail.com.cn。

**基金项目:**创新药物全过程临床评价示范性技术平台建设资助项目(编号:2018ZX09734006)。

**优先出版:**http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181029.1709.006.html (2018-10-31)

protein, BSP)、骨桥蛋白等成骨细胞分化标志物表达,这一现象表明大剂量二甲双胍诱导成骨细胞中持续的 AMPK 磷酸化,从而抑制成骨细胞增生、分化和矿化。因此,目前相关研究提示小剂量二甲双胍可激活 AMPK 通路并促进成骨细胞分化转录因子 Runx2 表达,进而促进成骨细胞增生、分化、矿化;但大剂量二甲双胍作用则相反。这一现象还需进一步深入探讨。

另外,Jang 等<sup>[20]</sup>发现二甲双胍处理上调了 MC3T3E1 细胞中 USF-1 mRNA 的表达水平,AMPK 腺病毒过表达系统(Ad-AMPK)增加成骨基因,如小异二聚体伴侣(small heterodimer partner, SHP)、Runx2 和上游刺激因子-1(upstream stimulatory factor-1, USF-1)的表达,并且 Ad-siSHP 处理抑制 SHP 表达,证实 AMPK 活化通过 USF-1 参与二甲双胍诱导 SHP 表达。二甲双胍以剂量依赖的方式诱导野生型小鼠中关键成骨基因,如 Runx2、ALP 和 BSP,以及 SHP 的表达<sup>[20]</sup>,而在 SHP 无效小鼠中不能发挥该作用,进一步证实 SHP 通过刺激 Runx2 转录活性从而促使成骨细胞分化。

综上所述,小剂量二甲双胍能短暂激活 AMPK 信号通路,启动成骨细胞特异性基因 Runx2 的表达,促进成骨细胞增生;而大剂量二甲双胍则持续激活 AMPK 信号通路,产生相反的作用。更有研究发现二甲双胍可通过 AMPK/USF-1/SHP 调节级联反式激活 Runx2 来刺激成骨细胞分化。

#### 1.2 二甲双胍活化 AMPK 从而预防同型半胱氨酸诱导的骨细胞凋亡

近期研究发现二甲双胍激活 AMPK 除促进 Runx2 因子表达外,还可以降低同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平,从而进一步降低其诱导的骨细胞凋亡,对骨起保护作用。

Takeono 等<sup>[21]</sup>发现 Hcy 通过显著增加 NADPH 过氧化物酶(Nox)从而诱导 MLO-Y4 细胞凋亡,而这种表现可以被二甲双胍抑制;并且可以被 Ara-A 显著逆转。而进一步加入 AICAR (AMPK 激活剂)可抑制 Hcy 诱导的 Nox1 和 Nox2 mRNA 的上调,但不影响 Nox4 或超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase 1, SOD1)的 mRNA 表达。这些发现表明,二甲双胍通过激活 AMPK 降低 Hcy 诱导的细胞凋亡,并且 Hcy 增加 Nox1 和 Nox2 的表达水平,而对 Nox4 或抗氧化酶(SOD1 和 SOD2)表达没有影响。以上实验结果表明二甲双胍可能通过激活 AMPK 通路降低 Hcy 水平而阻止其诱导的骨细胞凋亡,理论上具有预防骨质疏松的效果。

### 2 二甲双胍通过下调晚期糖基化终产物受体逆转骨损害作用

在糖尿病患者和老年人群中,晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)较其他人群明显增多<sup>[22]</sup>。AGEs 在骨组织内的堆积可抑制成骨细胞分化,促进骨髓基质干细胞和成骨细胞凋亡以及破骨细胞增生<sup>[23-24]</sup>。Schurman 等<sup>[25]</sup>的研究表明,AGEs 降低 UMR106 和 MC3T3E1 两种成骨细胞 ALP 活性,并且诱导成骨细胞凋亡,而二甲双胍可明显改善这一现象。进一步实验证实在 MC3T3E1 和 UMR106 成骨细胞中,AGEs 增加了晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)蛋白表达;而与 500  $\mu\text{mol/L}$  二甲双胍共同孵育时,2 种成骨细胞系中 AGEs 诱导的 RAGE 上调被消除,由此证明二甲双胍逆转 AGEs 致骨损害

作用可能由于其下调 AGEs 受体引起。Tolosa 等<sup>[26]</sup>的研究中同样证实了糖尿病小鼠骨髓浆细胞 RAGE 表达增加,并且二甲双胍可以阻止糖尿病相关的 RAGE 表达上调。因此以上研究表明,二甲双胍在降低血糖的同时,还可改善由 AGEs 堆积引起的成骨作用减弱,从而对糖尿病患者起到阻止骨量流失的作用。

### 3 二甲双胍通过抑制 RANKL/OPG 从而抑制破骨细胞活性

骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子  $\kappa\text{B}$  配体(RANKL)的受体活化剂是主要由成骨细胞分泌的细胞因子,并且在破骨细胞的分化和功能中起关键作用。RANKL 与破骨细胞或其前体的细胞表面上的核因子  $\kappa\text{B}$ (RANK)的受体活化剂结合,起到诱导破骨细胞分化、活化和存活的作用,而 OPG 是 RANKL 的受体,竞争性 RANK 结合,抑制破骨细胞分化、成熟,诱导其凋亡提前发生<sup>[27-28]</sup>。Mai 等<sup>[29]</sup>的研究表明,二甲双胍增强了去卵巢大鼠成骨细胞中 OPG mRNA 的表达,降低 RANKL mRNA 和蛋白的表达,进一步研究发现二甲双胍可以明显降低破骨细胞数目。这些发现表明,二甲双胍可能通过直接下调 RANKL 表达或通过增加其内在抑制剂 OPG 来减弱 RANKL 信号传导,从而进一步抑制破骨活性。Liu 等<sup>[30]</sup>的研究在大鼠牙根尖周病变中发现,在二甲双胍治疗过程中,RANKL 阳性和破骨细胞数量减少,而 OPG 阳性细胞数量增加,使 RANKL/OPG 比率降低,从而破骨细胞和骨吸收区域的数量减少。因此,以上研究说明二甲双胍通过上调 OPG 表达来下调 RANKL 信号传导,从而抑制破骨细胞分化,对骨代谢起正性调节作用。

### 4 二甲双胍通过对某些代谢产物的调节影响骨代谢

Li 等<sup>[31]</sup>的研究中通过代谢组学的方式分析高血糖小鼠的骨髓间充质干细胞中代谢物的变化,在高血糖环境下被上调的代谢物包括属于三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TAC)和糖酵解的琥珀酸盐、乌头酸盐、柠檬酸盐等,通过二甲双胍恢复到正常水平,表明二甲双胍正在重置代谢途径。另外还观察到在高血糖环境中二甲双胍可使谷氨酸、天冬氨酸、富马酸、氧代戊二酸、苹果酸和乳酸等代谢物降低至正常水平以下,表明这些代谢物的稳态控制在高血糖中是有缺陷的,并且二甲双胍干预后可以重新建立其平衡。尤其是高血糖环境中谷氨酸和琥珀酸盐水平的急剧升高可以被二甲双胍恢复至正常水平。

另一项研究<sup>[32]</sup>发现上述代谢产物中,TAC 循环重要中间代谢产物琥珀酸通过与破骨细胞谱系细胞上的特异性受体 SUCNR1 结合,通过 NF- $\kappa\text{B}$  信号传导刺激破骨细胞生成,并且这一现象在 SUCNR1 KO 小鼠中无法观察到。而二甲双胍与琥珀酸盐通过在 NF- $\kappa\text{B}$  信号传导途径上彼此拮抗,调节破骨细胞生成,从而减少破骨细胞的数目,对骨起保护作用。

通过代谢组学分析显示,二甲双胍高血糖环境下主要干预的代谢途径为 TAC 循环及尿素循环,并且琥珀酸和谷氨酸是其主要作用目标。其中琥珀酸可以增加破骨细胞数目,进而对骨有破坏作用,二甲双胍可以降低琥珀酸水平,从而发挥其对骨代谢的积极作用。

## 5 展 望

二甲双胍干预对骨矿盐代谢作用的分子机制非常复杂,可能具有不同的作用靶点。除了通过 AMPK 经典通路诱导成骨细胞分化及通过抑制 RANKL/OPG 抑制破骨细胞活性等作用以外,干预代谢产物而影响骨代谢也是众多重要机制之一。我国所面临的老年化社会问题将越来越严峻,2 型糖尿病和骨质疏松症(尤其是绝经后妇女)将是最常见的疾病组合之一。二甲双胍对 2 型糖尿病的治疗和预防作用已经得到证实,如果对骨质疏松症也有治疗或预防作用,则二甲双胍的推广使用将对老年医学的意义十分重要,有待于进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global report on diabetes[R/OL]. World Health Organization, 2016. <http://www.who.int/iris/handle/10665/204871>.
- [2] Barrett-Connor E, Holbrook T L. Sex differences in osteoporosis in older adults with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. JAMA, 1992, 268(23): 3333-3337.
- [3] Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, et al. Bone loss and bone turnover in diabetes[J]. Diabetes, 1995, 44(7): 775-782.
- [4] Suzuki K, Sugimoto C, Takizawa M, et al. Correlations between bone mineral density and circulating bone metabolic markers in diabetic patients[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 48(3): 185-191.
- [5] Patel S, Hyer S, Tweed K, et al. Risk factors for fractures and falls in older women with type 2 diabetes mellitus[J]. Calcif Tissue Int, 2008, 82(2): 87-91.
- [6] Rakel 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.
- [7] Khazai NB, Beck GR Jr, Umpierrez GE. Diabetes and fractures: an overshadowed association[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009, 16(6): 435-445.
- [8] Napoli N, Strotmeyer ES, Ensrud KE, et al. Fracture risk in diabetic elderly men; the MrOS study[J]. Diabetologia, 2017, 57(10): 2057-2065.
- [9] Colhoun HM, Livingstone SJ, Looker HC, et al. Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs[J]. Diabetologia, 2012, 55(11): 2929-2937.
- [10] 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 Biophys Res Commun, 2008, 375(3): 414-419.
- [11] van Lierop AH, Hamdy NA, Van Der Meer RW, et al. Distinct effects of pioglitazone and metformin on circulating sclerostin and biochemical markers of bone turnover in men with type 2 diabetes mellitus[J]. Eur J Endocrinol, 2012, 166(4): 711-716.
- [12] Zinman B, Haffner SM, Herman WH, et al. Effect of rosiglitazone, metformin, and glyburide on bone biomarkers in patients with type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(1): 134-142.
- [13] Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, et al. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 536(1-2): 38-46.
- [14] Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action[J]. J Clin Invest, 2001, 108(8): 1167-1174.
- [15] Musi N, Hirshman MF, Nygren J, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(7): 2074-2081.
- [16] Bailey CJ, Turner RC. Metformin[J]. N Engl J Med, 1996, 334(9): 574-579.
- [17] Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update[J]. Ann Intern Med, 2002, 137(1): 25-33.
- [18] 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 Biology, 2007, 8: 51.
- [19] Kasai T, Bandow K, Suzuki H, et al. Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity[J]. J Cell Physiol, 2009, 221(3): 740-749.
- [20] Jang WG, Kim EJ, Bae IH, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2[J]. Bone, 2011, 48(4): 885-893.
- [21] Takeno A, Kanazawa I, Tanaka K, et al. Activation of AMP-activated protein kinase protects against homocysteine-induced apoptosis of osteocytic MLO-Y4 cells by regulating the expressions of NADPH oxidase 1 (Nox1) and Nox2[J]. Bone, 2015, 77: 135-141.
- [22] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.
- [23] Franke S, Siggelkow H, Wolf G, et al. Advanced glycation end-products influence the mRNA expression of RAGE, RANKL and various osteoblastic genes in human osteoblasts[J]. Arch Physiol Biochem, 2007, 113(3): 154-161.
- [24] Kume S, Kato S, Yamagishi S, et al. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(9): 1647-1658.
- [25] Schurman L, McCarthy AD, Sedlinsky C, et al. Metformin reverses deleterious effects of advanced glycation end-products (AGEs) on osteoblastic cells[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008, 116(6): 333-340.
- [26] Tolosa MJ, Chuguransky SR, Sedlinsky C, et al. Insulin-deficient diabetes-induced bone microarchitecture alterations are associated with a decrease in the osteogenic potential of bone marrow progenitor cells: preventive effects of metformin[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2013, 101(2): 177-186.
- [27] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997, 89(2): 309-319.
- [28] Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 234(1): 137-142.
- [29] Mai QG, Zhang ZM, 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.
- [30] Liu L, Zhang C, Hu Y, et al. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin[J]. J Endod, 2012, 38(7): 943-947.
- [31] Li X, Guo Y, Yan W, et al. Metformin improves diabetic bone health by re-balancing catabolism and nitrogen disposal[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0146152.
- [32] Guo Y, Xie C, Li X, et al. Succinate and its G-protein-coupled receptor stimulates osteoclastogenesis[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15621.

(责任编辑:唐秋姗)