

· 论著 ·

罗格列酮对雌性大鼠骨代谢的影响

侯艳丽 季虹 王东 李新华 王庆美 黄丽芳 林鲁霞 刘延杰 臧学章 荣海钦

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)08-0665-04

摘要: 目的 观察马来酸罗格列酮对雌性大鼠骨代谢的影响。方法 3 月龄雌性 Wistar 大鼠 40 只随机分为 4 组,正常对照组(NC 组)、低剂量($3\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)罗格列酮组(Ros-1 组)、中剂量($10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)罗格列酮组(Ros-2 组)和高剂量($30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)罗格列酮组(Ros-3 组)。每日定时按照每公斤体重 6ml 灌胃,NC 组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃作为对照,干预 12 周。处死后,测定右侧股骨骨密度、血清骨代谢标记物和相关激素及细胞因子水平。结果 Ros-3 组的股骨骨密度较其他三组显著降低,反映骨形成的血清骨钙素水平在 Ros-2 及 Ros-3 组显著降低,而其他骨代谢标记物无显著变化。各组的雌二醇、睾酮、瘦素水平无差异。Ros-3 组 IGF-1 水平降低。各组炎症因子的水平无有意义的变化。结论 较大剂量的罗格列酮能减少正常雌性大鼠的骨形成,降低骨密度,对循环中雌二醇、睾酮及多数细胞因子无显著性影响。

关键词: 罗格列酮; 骨钙素; 骨密度; 雌二醇

Effects of rosiglitazone on the bone metabolism in female rats HOU Yanli, JI Hong, WANG Dong, et al. Shandong Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, China

Corresponding author: RONG Haiqin, Email: haiqinrong@126.com

Abstract: Objective To investigate the effects of rosiglitazone on the bone metabolism in female rats. **Methods** Forty 3-month-old female Wistar rats were randomly distributed into 4 groups, and were treated with rosiglitazone maleate at doses of 3, 10, and $30\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (Ros-1, Ros-2, and Ros-3), or 0.5% carboxymethylcellulose (NC) by gavage ($6\text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 12 weeks. Bone mineral density (BMD) of the right femur, serum bone metabolic markers, and related hormones and cytokines were measured after the rats were killed. **Results** BMD of the femur in group Ros-3 decreased significantly compared to that in 3 other groups. The serum levels of osteocalcin decreased significantly in groups Ros-2 and Ros-3, but no change occurred in other bone metabolic markers. There was no difference in the levels of estradiol, testosterone, and leptin among the groups. The serum level of IGF-1 decreased in group Ros-3. No significant change occurred in the inflammatory factors among the groups. **Conclusion** Rosiglitazone at a higher dose decreases bone formation and BMD in the normal female rats. Rosiglitazone has no influence in serum levels of estradiol, testosterone, and most cytokines.

Key words: Rosiglitazone; Osteocalcin; BMD; Estradiol

噻唑烷二酮类药物(Thiazolidinediones, TZDs)被广泛用于治疗 2 型糖尿病、糖耐量异常、多囊卵巢综合征等存在胰岛素抵抗的疾病。近年来, TZDs 与

骨代谢的关系引起广泛关注。大型临床研究发现 TZDs 增加女性糖尿病患者的骨折发生率,对男性患者则无明显影响^[1-3]。动物实验发现 TZDs 增加骨髓脂肪含量,减少骨形成,降低骨量^[4-6]。但这些动物实验存在一定的局限性,如,所用动物多为雄性鼠,剂量及干预时间不尽相同等。本研究,采用不同剂量的马来酸罗格列酮(Rosiglitazone maleate, Ros)干预雌性 Wistar 大鼠 12 周,观察骨代谢情况和相关激素及细胞因子的水平,探讨可能的致病机制。

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(基金编号 ZR2009CL028), 山东省医药卫生科技发展计划(基金编号 2009HW082)

作者单位: 250062 济南, 山东省内分泌与代谢病研究所, 山东省医学科学院

通讯作者: 荣海钦, Email: haiqinrong@126.com

1 材料与方法

1.1 动物实验

3 月龄雌性 Wistar 大鼠 40 只 (山东大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXR (鲁) 20090001), 适应性饲养 1 周, 平均体重为 $237 \pm 12\text{g}$ 。随机分为 4 组, 正常对照组 (NC 组)、低剂量罗格列酮组 (Ros-1 组)、中剂量罗格列酮组 (Ros-2 组) 和高剂量罗格列酮组 (Ros-3 组), 每组 10 只大鼠。Ros-1 组、Ros-2 组和 Ros-3 组分别按照 3mg/kg 、 10mg/kg 和 30mg/kg 马来酸罗格列酮的剂量由 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配置成相应浓度的悬浊液, 每日定时按照每公斤体重 6ml 灌胃, NC 组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃作为对照。马来酸罗格列酮及羧甲基纤维素钠均有南京德宝生化器材有限公司提供。大鼠喂养于塑料鼠盒内, 自由取食和饮水。试验室内室温 $18 \sim 25^\circ\text{C}$, 相对湿度 $40 \sim 60\%$, 自然光照。每周测体重及调整灌胃量, 共干预 12 周。

试验结束时, 大鼠禁食 16h 后称空腹体重, 颈静脉取血, 离心留取血清, -70°C 保存备用。10% 水合氯醛麻醉后断颈处死, 完整取出右侧股骨, 仔细剥离软组织, 用生理盐水浸湿的纱布包裹, -20°C 保存, 备做骨密度测量。

1.2 血清指标测定

表 1 各组大鼠的血糖、血脂及胰岛素水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重 (g)	GLU (mmol/L)	TG (mmol/L)	TCHO (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	INS (mU/L)
NC	304 ± 21	5.26 ± 0.76	0.81 ± 0.32	1.54 ± 0.19	0.87 ± 0.07	0.38 ± 0.06	16.61 ± 1.57
Ros-1	322 ± 17	5.43 ± 0.48	0.73 ± 0.16	1.61 ± 0.16	0.77 ± 0.15	0.38 ± 0.04	15.85 ± 1.31
Ros-2	320 ± 23	5.74 ± 0.76	0.78 ± 0.23	1.72 ± 0.16	0.77 ± 0.10	0.42 ± 0.07	15.37 ± 1.20
Ros-3	313 ± 20	5.70 ± 0.78	0.81 ± 0.16	$1.90 \pm 0.28^{**}$	$0.71 \pm 0.09^*$	$0.48 \pm 0.08^{**}$	15.83 ± 1.16

注: * $P < 0.05$ 与 NC 组比较; ** $P < 0.05$ 与 Ros-1 组比较。

实验期间, Ros-2 组的 2 只大鼠因感染死亡, Ros-1 组 1 只大鼠因颈静脉取血时大出血死亡, 未纳入最后统计。实验结束时, 各组大鼠的平均体重、血糖、血清甘油三酯及胰岛素水平均无显著性差异。大鼠的胆固醇水平各组间存在显著性差异 (见表 1)。高剂量罗格列酮组 (Ros-3) 的 TCHO 及 LDL-C 水平显著高于正常对照组 (NC) 和低剂量罗格列酮组 (Ros-1), 且 TCHO 及 LDL-C 的升高程度与罗格列酮的剂量呈现相关性 (见表 1), 说明本实验中所用的马来酸罗格列酮是具有活性的。

2.2 各组大鼠的骨密度 (图 1)

Ros-3 组股骨的 BMD 显著低于其他各组

采用生化分析仪 (日立 7180 全自动生化分析仪) 测定血糖 (GLU)、血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TCHO)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C)。血清胰岛素 (INS)、护骨素 (OPG)、骨钙素 (OCN)、I 型前胶原羧基前肽 (PICP)、抗酒石酸酸性磷酸酶-5b (TRAP)、17 β -雌二醇 (E_2)、睾酮 (T)、瘦素 (Leptin)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β) 及 IL-6 等均采用 R&D 公司生产的酶联免疫检测试剂盒测定。

1.3 骨密度测定

采用美国 Norland 公司产 pDEXA 型骨密度 (BMD) 仪 (附带小动物扫描软件) 测量右侧股骨 BMD。该仪器测定质控体模的长期变异系数 (CV) 在 $0.29\% \sim 0.35\%$ 之间。

1.4 统计学处理

所有数据处理应用 SPSS13.0 统计软件。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 实验结束时各组大鼠的体重及血糖、血脂情况 (表 1)

($0.140 \text{ vs. } 0.177, 0.163, 0.164\text{g/cm}^2$)。

2.3 各组大鼠骨代谢血清标志物的水平 (表 2)

表 2 各组大鼠骨代谢标志物的水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OPG (ng/L)	PICP (ng/L)	OCN (ng/L)	TRAP (ng/L)
NC	640.71 ± 74.96	301.61 ± 43.47	974.46 ± 77.23	6.16 ± 0.41
Ros-1	667.96 ± 44.54	286.83 ± 28.12	980.02 ± 48.42	6.43 ± 0.44
Ros-2	614.82 ± 31.28	263.06 ± 16.07	$865.86 \pm 95.50^{**}$	6.26 ± 0.40
Ros-3	630.78 ± 62.48	288.01 ± 24.15	$872.82 \pm 117.41^{**}$	6.43 ± 0.51

注: * $P < 0.05$ 与 NC 组比较; ** $P < 0.05$ 与 Ros-1 组比较。

各指标仅血清骨钙素存在组间差异, 提示较高剂量罗格列酮损害骨形成, 反映骨吸收的指标

TRAP 组间未见差异。

2.4 各组大鼠的激素及细胞因子水平(表 3)

各组大鼠的雌二醇及睾酮水平无显著性差异。

脂肪细胞来源的瘦素水平各组间无差异。高剂量组的 IGF-1 降低,炎症因子的变化不大。

表 3 骨代谢相关激素及细胞因子的水平($\bar{x} \pm s$)

组别	E ₂ (pmol/L)	T (nmol/L)	Leptin (μg/L)	IGF-1 (μg/L)	TNF-α (ng/L)	IL-1β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
NC	60.04 ± 3.03	11.19 ± 0.69	7.99 ± 0.64	21.25 ± 1.12	302.93 ± 33.61	61.85 ± 4.17	139.17 ± 11.28
Ros-1	61.72 ± 3.65	11.67 ± 0.86	7.91 ± 0.45	21.87 ± 0.51	323.55 ± 22.05	65.45 ± 4.01	145.48 ± 7.98
Ros-2	57.43 ± 2.49	10.93 ± 0.64	7.66 ± 0.18	21.10 ± 0.77	287.59 ± 35.34	56.97 ± 3.41 ^{*#}	135.29 ± 8.40
Ros-3	58.60 ± 3.42	11.90 ± 0.79	7.73 ± 0.59	20.20 ± 0.97 ^{*#}	300.18 ± 38.40	59.57 ± 4.66 [#]	138.10 ± 11.16

注: * $P < 0.05$ 与 NC 组比较; # $P < 0.05$ 与 Ros-1 组比较; ^Δ $P < 0.05$ 与 Ros-2 比较

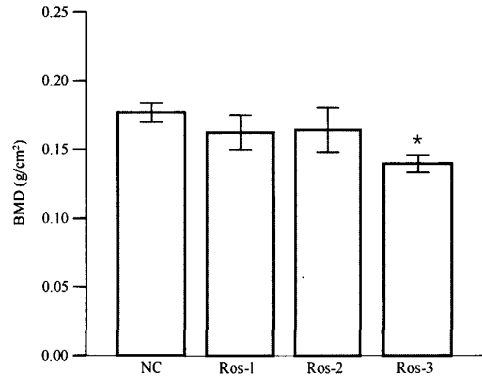


图 1 各组大鼠股骨骨密度

注:与其他三组比较 * $P < 0.05$

3 讨论

罗格列酮属噻唑烷二酮类(TZDs)抗糖尿病药,是核受体过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR γ)的高选择性、强效激动剂。PPAR γ 对于脂肪细胞分化、脂质代谢、炎症反应和肿瘤发生等都起着重要的作用,而 PPAR γ 激活后对骨的作用也成为近年来的研究热点。临床研究发现,TZDs 增加女性糖尿病患者特别是绝经后女性患者的骨折发生率^[1-3,7],但 TZDs 导致骨代谢异常、增加骨折发生率的机制尚不完全清楚。本研究用高(30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)、中(10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)、低剂量(3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)的马来酸罗格列酮干预雌性 Wistar 大鼠 12 周,发现高剂量组大鼠的股骨骨密度较其他组显著降低,而反映骨代谢的血清标志物仅有高剂量组和中剂量组的骨钙素水平降低(见图 1 和表 2)。骨钙素在基质矿化时高表达,是反映成骨细胞功能成熟的重要标志物,骨钙

素水平降低说明骨形成受损。这与以往研究^[4,6]报道的 PPAR γ 激活后作用于骨髓间质干细胞促使其向脂肪细胞分化而抑制成骨作用导致骨量减少相符。最近研究^[8]发现,TZDs 能使脂肪细胞分泌的 Wnt 信号通路的抑制因子 DKK1 增加,降低 β -连环蛋白水平;2 型糖尿病患者服用罗格列酮 90 天血 DKK1 水平升高。Wnt/ β -连环蛋白途径是成骨细胞分化的重要信号,TZDs 通过 DKK1 阻断该途径而抑制成骨促进成脂。TZDs 还可以通过增加成骨细胞和骨细胞的凋亡减少成骨^[9,10]。TZDs 对破骨细胞及骨吸收的作用结论不一。有研究发现 PPAR γ 激动剂可抑制破骨细胞生成、减少骨吸收^[11-13],但也有研究报道 TZDs 可激活破骨细胞,增加骨吸收^[14,15]。本实验中反映骨吸收的抗酒石酸酸性磷酸酶各组间无显著性差异,这与多数研究发现的罗格列酮主要影响骨形成的结论一致。

临床研究发现 TZDs 增加骨折发生率存在性别差异^[1-3],结合有些动物实验报道的 TZDs 可显著增加去卵巢鼠和老龄鼠的骨吸收^[16,17],提示性激素水平与 TZD/PPAR γ 之间可能存在着相互作用,共同对骨代谢过程产生影响。Mabilleau 等^[10]使用不同浓度的 TZDs 培养骨细胞(鼠 MLO-Y4 细胞系),无雌二醇时,较低浓度(10⁻⁸ M)的 TZDs 即可导致骨细胞凋亡,且呈浓度依赖性;加入雌二醇则可显著减少骨细胞的凋亡。可见,雌二醇在成骨过程及减少 TZDs 所致的骨丢失中起着重要作用。另一方面,催化雄激素转化为雌激素的限速酶——P₄₅₀芳香化酶受核受体系统的调节。Rubin 等研究发现 PPAR γ 的配体能抑制乳腺脂肪组织的芳香酶活性,减少雌激素的合成^[18]。但 TZDs 是否影响循环中的雌激素水平尚无直接的证据。本研究采用三种不同剂量的罗格列酮对正常雌性大鼠干预 12 周,未见各组大鼠血清雌二醇及睾酮的水平有显著差异(见表 3)。

TZDs 是否影响了骨组织局部的雌激素合成、以及 TZDs 与雌激素之间的相互作用途径有待进一步研究。

IGF-1 是较强的一个成骨刺激因子,以往研究发现 TZDs 能降低循环中和骨组织中的 IGF-1 水平^[19],本研究也发现高剂量组的 IGF-1 的水平较其他三组显著降低,这也是骨形成减少的一个因素。TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症介质是强的骨吸收刺激因子,直接或间接地作用于破骨细胞前体细胞,使其分化为破骨细胞发挥骨吸收作用。本研究中,各组的 TNF- α 、IL-6 无明显变化,仅中、高剂量组的 IL-1 β 水平稍降低(见表 3)。罗格列酮对细胞及炎症因子的影响不大,提示健康机体对 PPAR γ 激活具有极强的适应性。

由本研究可以看出,较大剂量(至少 10 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)的罗格列酮能影响正常雌性大鼠的骨密度,主要原因是减少骨形成;该剂量和时间的罗格列酮干预不会对大鼠循环中雌二醇、睾酮及多数细胞因子造成显著影响。

【参 考 文 献】

- [1] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Vittinghoff E, et al. Thiazolidinedione use and bone loss in older diabetic adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91:3349-3354.
- [2] Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med*, 2006, 355:2427-2443.
- [3] Loke YK, Singh S, Furberg CD. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ*, 2009, 180:32-39.
- [4] Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, et al. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology*, 2004, 145: 401-406.
- [5] Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology*, 2005, 146:1226-1235.
- [6] Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Grant DF, et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 2002, 143: 2376-2384.
- [7] Li H, Cui R, Cai H, et al. The effect of thiazolidinediones on bone mineral density in Chinese older patients with type 2 diabetes. *J Bone Miner Metab*, 2010, 28:77-81.
- [8] Gustafson B, Eliasson B, Smith U. Thiazolidinediones increase the wingless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis. *Diabetologia*, 2010, 53:536-540.
- [9] Soroceanu MA, Miao D, Bai X-Y, et al. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. *J Endocrinol*, 2004, 183:203-216.
- [10] Mabileau G, Mieczkowska A, Edmonds ME. Thiazolidinediones induce osteocyte apoptosis and increase sclerostin expression. *Diabet Med*, 2010, 27:925-932.
- [11] Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, et al. Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology*, 1999, 140:5060-5065.
- [12] Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, 2000, 275: 14388-14393.
- [13] Hassumi MY, Silva-Filho VJ, Campos-Júnior JC, et al. PPAR-gamma agonist rosiglitazone prevents inflammatory periodontal bone loss by inhibiting osteoclastogenesis. *Int Immunopharmacol*. 2009, 9:1150-1158.
- [14] Schwab AM, Granholm S, Persson E, et al. Stimulation of resorption in cultured mouse calvarial bones by thiazolidinediones. *Endocrinology*, 2005, 146:4349-4361.
- [15] Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*, 2007, 13:1496-1503.
- [16] Sottile V, Seuwen K, Kneissel M. Enhanced marrow adipogenesis and bone resorption in estrogen-deprived rats treated with the PPARgamma agonist BRLA9653 (rosiglitazone). *Calcif Tissue Int*, 2004, 75:329-337.
- [17] Lazarenko OP, Rzonca SO, Hogue WR et al. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. *Endocrinology*, 2007, 148:2669-2680.
- [18] Rubin GL, Zhao Y, Kalus AM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit estrogen biosynthesis in human breast adipose tissue: possible implications for breast cancer therapy. *Cancer Res*, 2000, 60:1604-1608.
- [19] Lecka-Czernik B, Ackert-Bicknell C, Adamo ML, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) by rosiglitazone suppresses components of the insulin-like growth factor regulatory system in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 2007, 148:903-911.

(收稿日期: 2011-04-13)

罗格列酮对雌性大鼠骨代谢的影响

作者：[侯艳丽](#)，[季虹](#)，[王东](#)，[李新华](#)，[王庆美](#)，[黄丽芳](#)，[林鲁霞](#)，[刘延杰](#)，[臧学章](#)，[荣海钦](#)

作者单位：[山东省内分泌与代谢病研究所, 山东省医学科学院, 济南, 250062](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)

年，卷(期)：2011, 17 (8)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201108003.aspx