

· 论 著 ·

二甲双胍对去卵巢大鼠骨质疏松症的影响及机制研究

苏珊^{1,2} 杨芸瑞^{1,2} 李红利² 王丽婷² 甄东户^{2*}

1.兰州大学第一临床医学院,甘肃 兰州 730000

2.兰州大学第一医院内分泌科,甘肃 兰州 730000

中图分类号: R587.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 12-1749-06

摘要: 目的 以雌二醇为对照,观察二甲双胍(metformin, MF)对去卵巢大鼠骨密度及骨矿含量的影响,并从细胞、分子水平探究 MF 可能的骨保护机制。方法 将 60 只雌性 SD 大鼠随机均分 4 组:假手术(SHAM)组、去卵巢(OVX)组、去卵巢+二甲双胍(OVX+MF)组和去卵巢+雌二醇(OVX+E2)组。分组灌胃给药 60 d 后测量大鼠右侧胫骨骨密度和骨矿含量;分离培养各组大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)并诱导其向成骨细胞分化,用 MTT 法测定细胞活性及增殖能力;测定各组碱性磷酸酶(ALP)活性、矿化结节数目、钙含量以及 I 型胶原(collagen type I)、骨钙素(OC)、骨保护素(OPG)、NFκB 受体的配体(RANKL)、白细胞介素-6(IL-6)基因表达水平。结果 与 OVX 组相比,OVX+MF 组和 OVX+E2 组成骨细胞的增殖能力与 ALP 活性明显增强,骨密度、骨矿含量以及钙沉积量显著增加(P 均 <0.05),且两组 collagen type I、OC、OPG mRNA 的表达水平显著升高,而 RANKL、IL-6 mRNA 表达明显受到抑制;但 OVX+MF 组去卵巢大鼠成骨细胞的增殖能力、ALP 活性、钙沉积量、collagen type I、OC、OPG mRNA 表达水平低于 OVX+E2 组,RANKL、IL-6 mRNA 表达高于 OVX+E2 组(P 均 <0.05);与 SHAM 组比较,OVX+MF 组的 collagen type I、OC、OPG mRNA 的表达水平更高($P<0.05$)。结论 二甲双胍可能通过 OPG/RANKL/RANK 信号通路促进 BMSCs 向成骨细胞分化,有效逆转去卵巢大鼠骨质疏松的状态,这种潜在的骨保护作用可能会改善糖尿病引起的骨质疏松。

关键词: 二甲双胍;雌二醇;骨质疏松;骨髓间充质干细胞

The impact and mechanism of metformin on osteoporosis in ovariectomized rats

SU Shan^{1,2}, YANG Yunrui^{1,2}, LI Hongli², WANG Liting², ZHEN Donghu^{2*}

1.The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2.Department of Endocrinology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

* Corresponding author: ZHEN Donghu, Email: zhdh8279@163.com

Abstract: Objective To observe the effect of metformin on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats, and explore the mechanism of bone protection at the cellular and molecular levels compared with estradiol. **Methods** Sixty female SD rats were distributed randomly into four groups: SHAM group, OVX group, OVX+MF group and OVX+E2 group. Bone mineral density and bone mineral content of right tibia of rats were detected after 60 days of drug administration; separated and cultured the BMSCs and induced them to differentiate into osteoblasts, MTT Assay was used to determine the cell activity and proliferation ability; the ALP activity, mineralized nodule formation, calcium content and gene expression levels of collagen type I, OC, OPG, RANKL, IL-6 mRNA were also measured. **Results** Compared with OVX group, the proliferation ability, ALP activity, bone mineral density, bone mineral content and calcium deposition of osteoblasts were significantly enhanced in OVX+MF group and OVX+E2 group ($P<0.05$), moreover, the expression levels of collagen type I, OC and OPG mRNA in the two groups were significantly increased, while the expressions of RANKL and IL-6 mRNA were significantly inhibited. However, the proliferation ability, ALP activity, calcium deposition, expression levels of collagen type I, OC, OPG mRNA in OVX+MF group were lower than OVX+E2 group, and the expression of RANKL, IL-6 mRNA were higher than OVX+E2 group ($P<0.05$). In addition, compared with SHAM group, the expression levels of collagen type I, OC, and OPG mRNA in the OVX+MF group were

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1606RJZA347,1308RJZA254);中央高校基本科研业务费专项资金重点项目(2022142zrk012);甘肃省卫生行业科研计划(GSWSKY-2014-27);兰州大学第一医院院内基金(1dyyn2015-22)

* 通信作者: 甄东户, Email: zhdh8279@163.com

higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Metformin may promote the differentiation of BMSCs into osteoblasts via OPG/ RANKL/ RANK signaling pathway, and effectively reverse the state of osteoporosis in ovariectomized rats, this potential osteoprotective effect of metformin may improve the osteoporosis caused by diabetes.

Key words: metformin; estradiol; osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells

二甲双胍 (metformin, MF) 被广泛应用于 2 型糖尿病、代谢综合征、非酒精性脂肪肝病等以胰岛素抵抗为主的疾病的治疗^[1]。随着对 MF 进一步深入研究,研究者发现 MF 除具有降糖作用外,还可促进骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 向成骨细胞分化,增加成骨细胞数目,促进骨形成,此外 MF 通过激活钙调蛋白激酶和转化生长因子活化激酶,抑制 RANKL 的表达以及破骨细胞的分化,从而发挥骨保护作用^[2-3]。但其作用机制错综复杂,目前 MF 对骨代谢影响的具体机制仍未完全明确。因此本研究以去卵巢大鼠模拟骨质疏松症,以雌二醇为对照,观察 MF 对去卵巢大鼠骨密度及骨矿含量的影响,并从细胞和分子水平探讨 MF 可能的骨保护机制,为临床上预防和治疗骨质疏松症提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 月龄 SPF 级雌性健康 SD 大鼠 60 只,体重 200~300 g,适应性喂养 1 周。

1.2 方法

1.2.1 去卵巢大鼠模型的建立及骨密度和骨矿含量的测定:60 只 3 月龄雌性健康 SD 大鼠被随机均分 4 组:假手术 (SHAM) 组、去卵巢 (OVX) 组、去卵巢+二甲双胍 (OVX+MF) 组和去卵巢+雌二醇 (OVX+E2) 组。OVX 组、OVX+MF 组和 OVX+E2 组行双侧卵巢摘除建立骨质疏松模型,SHAM 组仅切除双侧卵巢旁等量脂肪。术后 1 周起 OVX+MF 组按 100 mg/(kg·d) 灌胃 MF,OVX+E2 组按 0.1 mg/(kg·d) 灌胃 17- β 雌二醇,其它各组灌胃等量蒸馏水,按体重变化调整药量,连续给药 60 d 后通过引颈法处死大鼠。分离各组大鼠胫骨,用双能 X 线骨密度仪 (DEXA, prodigy 型,美国 GE LUNAR 公司) 测定右侧胫骨骨密度和骨矿含量。

1.2.2 大鼠 BMSCs 的分离、培养:无菌条件下分离 4 组大鼠双侧股骨和胫骨,在含有抗生素的 α -MEM 溶液中浸泡 10 min 后冲洗骨髓腔,800 r/min 离心细胞悬液,5 min 后用普通培养液重新接种。接种后第 3 天,用 PBS (pH 7.2~7.4) 缓慢冲洗掉未贴壁

的细胞,培养基每周更换 2 次,细胞基本铺满瓶底时,用 0.25 % 胰酶消化,以 1:2 进行传代培养。选取生长较好的第 3、4 代细胞行后续实验。

1.2.3 诱导各组大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化:各组大鼠传代细胞以 5.0×10^4 个/孔密度接种于 24 孔板,用基础成骨诱导培养基培养 15~21 d 后,收集细胞行下一步实验。

1.2.4 细胞增殖功能测定和细胞荧光染色:将各组细胞以 1.0×10^4 个/孔密度接种在 96 孔板,成骨诱导液培养 6 d 后,用 MTT 法测定细胞活性及增殖能力;培养结束后用 PBS 冲洗细胞,室温下用钙黄绿色素 AM 荧光探针培养细胞 10 min。

1.2.5 碱性磷酸酶活性测定:将各组细胞以 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板,成骨诱导液培养 7 d,用 PBS 清洗细胞层,溶解于 0.5 mL 的 0.1 % Triton X-100 中,使用 Bradford 法测定细胞提取物蛋白含量。

1.2.6 矿化结节形成和钙含量的测定:将各组细胞以 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板,培养 28 d 后, PBS 洗两次并用 95 % 乙醇原位固定,1 % 茜素红染色,镜下计数钙化结节数目。钙含量测定方法参考文献[4]。

1.2.7 RNA 提取以及 Real-time PCR 测定:将各组细胞以 5×10^5 个/孔密度接种于 6 孔板,成骨诱导液培养 21 d 后,荧光定量实时 PCR 测定成骨细胞表面基因: collagen type I、OC、OPG、RANKL、IL-6, GAPDH 作为看家基因 (引物序列见表 1)。反应结束后用双 CT 法进行 PCR 相对定量计算。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 统计软件行析因设计的方差分析并采用 Dunnett 法两两比较,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 二甲双胍对去卵巢大鼠骨密度和骨矿含量的影响

与 SHAM 组比较,OVX 组的骨密度和骨矿含量显著降低,OVX+MF 组与 OVX+E2 组的骨矿含量低于 SHAM 组 (P 均 < 0.05),而骨密度与 SHAM 组无显著差异 ($P > 0.05$);OVX+MF 组与 OVX+E2 组的

表 1 引物序列

Table 1 Primers Sequence

基因	前引物	后引物
OC	5'-CTCCTGAGAGTCTGACAAAGCCTT-3'	5'-GCTGTGACATCCATTACTTGC-3'
Col I	5'-TCTCCACTCTTCTAGGTTCCCT-3'	5'-TTGGGTCATTTCCACATGC-3'
OPG	5'-GCCTGCACCAAGTGAATG-3'	5'-TGTCGTTAAAACACGATCAAAAT-3'
RANKL	5'-TGTCGTTAAAACGAGCATCAAAAT-3'	5'-TTTCGTGCTCCCTCCTTCA-3'
IL-6	5'-TCCTACCCCAATTCCAATGG-3'	5'-GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTGA-3'
GAPDH	5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

骨密度和骨矿含量均显著高于 OVX 组,且 OVX+E2

组高于 OVX+MF 组($P<0.05$)。见图 1。

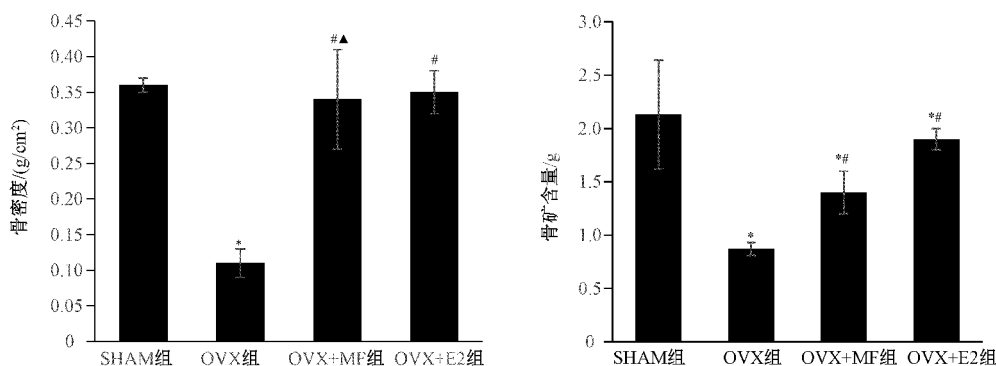


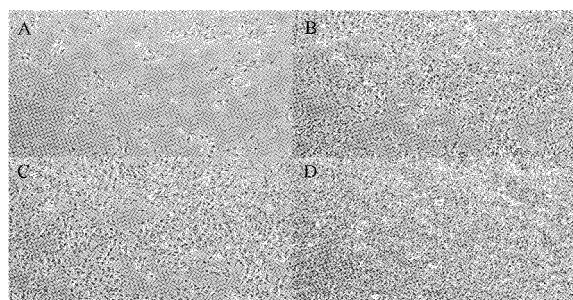
图 1 各组大鼠骨密度和骨矿含量

注:与 SHAM 组比较,* $P<0.05$;与 OVX 组比较,# $P<0.05$;与 OVX+E2 组比较,▲ $P<0.05$ 。

Fig.1 Bone mineral density and bone mineral content of rats in each group

2.2 大鼠 BMSCs 诱导分化为成骨细胞的形态学观察

倒置相差显微镜下,大鼠 BMSCs 经差速贴壁后于 2~3 h 内贴附于培养瓶底(图 2 A),接种 3 d 后细胞呈现不同形态并向外伸展出生长突,部分细胞借突起相互连接(图 2B);随后生长突相互连接融合成片(图 2C),成骨细胞持续重叠生长,10~12 d 后出现散在的致密团块,中央区域逐渐变暗,透光不佳,最终形成结节(图 2D)。

图 2 大鼠 BMSCs 诱导分化为成骨细胞的形态($\times 100$)

A:细胞培养后 1 d;B:细胞接种后 3 d;C:细胞接种后 5 d;D:细胞接种后 12 d。

Fig. 2 Morphological differentiation of rat BMSCs into osteoblasts ($\times 100$)

A:1 day after cell culture; B:3 days after cell inoculation; C:5 days after cell inoculation; D:12 days after cell inoculation.

2.3 大鼠 BMSCs 在诱导培养基中的生长曲线

接种后 1~3 d 内,传代大鼠 BMSCs 细胞增殖缓慢,随后细胞增殖速度逐渐增快,第 6 天达到顶峰,此后逐渐减慢(图 3)。

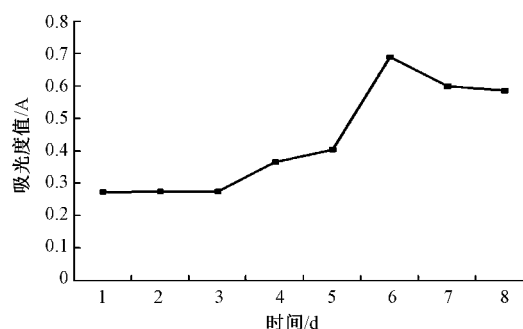


图 3 大鼠 BMSCs 的生长曲线

Fig.3 The growth curve of rats BMSCs

2.4 大鼠 BMSCs 诱导分化为成骨细胞后矿化结节的形成

在矿化诱导液的培养下,大鼠 BMSCs 分化为成骨细胞并呈重叠生长,逐渐形成大小不一的结节,随着胶原沉积和基质矿化,最终形成密度不均透光性差的矿化结节(图 4)。

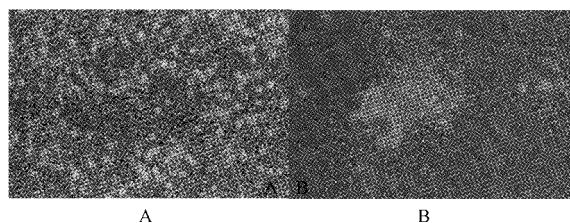


图4 矿化结节形成的鉴定

A: 骨细胞钙化中(诱导后 14 d); B: 骨细胞钙化形成(诱导后 28 d)。

Fig.4 Identification of mineralized nodule formation

A: osteoblasts are calcifying (14 days after induction); B: osteocyte calcification is formed (28 days after induction).

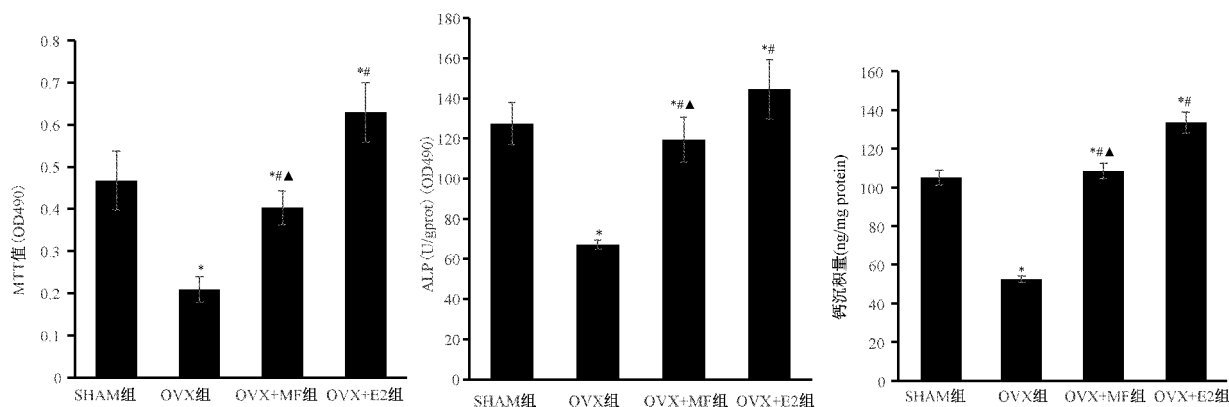


图5 大鼠成骨细胞的增殖能力、ALP活性及钙沉积量的变化

注:与 SHAM 组比较, * $P < 0.05$; 与 OVX 组比较, # $P < 0.05$; 与 OVX+E2 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

Fig.5 Changes in cell proliferation, ALP activity and calcium deposition in osteoblasts of rats

2.6 各组大鼠 BMSCs 的形态变化

细胞培养 3 d 后各组均呈现出成骨细胞的典型形态:多边形、三角形和梭形(绿色细胞)。在图 6B (OVX 组)中可看到明显增多的呈现红色荧光的死亡细胞,而在图 6A (SHAM 组)中几乎看不到死亡细胞;与图 6B (OVX 组)比较,图 6C (OVX+E2 组)与图 6D (OVX+MF 组)中死亡细胞数目减少,细胞呈现融合趋势。

2.7 各组大鼠成骨细胞矿化结节的形成

在矿化诱导液培养 21 d 后,镜下观察,图 7A (SHAM 组)成骨细胞多层重叠生长并随着胶原和钙盐沉积,形成数量较多的矿化结节;而在图 7B (OVX 组)成骨细胞钙化明显受到抑制,细胞没有显著融合,未见显著的矿化结节;但在图 7C (OVX+E2 组)与图 7D (OVX+MF 组)中,成骨细胞重叠生长逐渐形成矿化结节,结节数量较多,周围有较多钙盐沉积。

2.8 各组大鼠成骨细胞的基因表达变化

与 SHAM 组比较,OVX 组中 collagen type I、

2.5 各组大鼠 BMSCs 分化为成骨细胞后细胞增殖能力、ALP 活性与钙沉积量的变化

与 SHAM 组比较,OVX 组成骨细胞增殖能力、ALP 活性明显被抑制,钙沉积量明显减少 ($P < 0.05$);与 OVX 组比较,在给予 MF 和雌二醇干预后显著增强了大鼠成骨细胞增殖能力和 ALP 活性,钙沉积量显著增加 ($P < 0.05$);且 OVX+E2 组成骨细胞增殖能力、ALP 活性、钙沉积量高于 OVX+MF 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

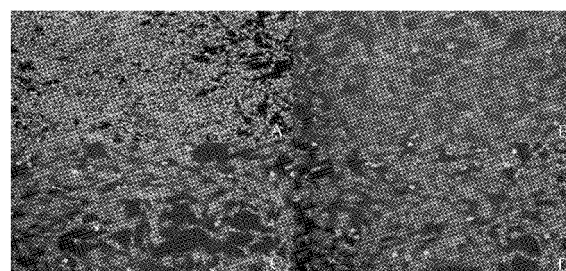


图6 荧光染色大鼠的 BMSCs

A: SHAM 组; B: OVX 组; C: OVX+E2 组; D: OVX+MF 组。

Fig.6 Fluorescent staining of BMSCs

A: SHAM group; B: OVX group; C: OVX+E2 group; D: OVX+MF group.

OC、OPG mRNA 表达水平显著降低, RANKL、IL-6 mRNA 表达显著增强,而 OVX+MF 组 collagen type I、OC、OPG、RANKL、IL-6mRNA 的表达水平均高于 SHAM 组 ($P < 0.05$);与 OVX 组相比,OVX+E2 组、OVX+MF 组明显增加了 collagen type I、OC、OPG mRNA 的表达水平,并抑制了 RANKL、IL-6mRNA 的表达 ($P < 0.05$);与 OVX+E2 组比较,OVX+MF 组

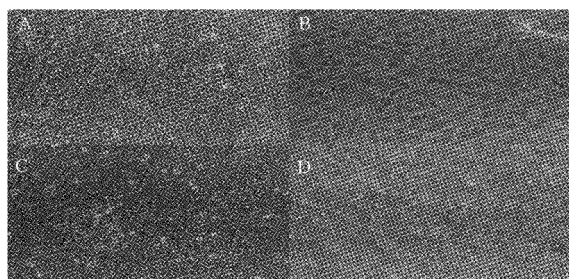


图7 镜下成骨细胞矿化结节的形成 A:SHAM 组; B:OVX 组;C:OVX+E2 组;D:OVX+MF 组。

Fig.7 The formation of mineralized osteoblasts nodules under the microscope A: SHAM group; B: OVX group; C: OVX+E2 group; D: OVX+MF group.

collagen type I、OC、OPG mRNA 表达水平低于 OVX+E2 组,且 RANKL、IL-6mRNA 的表达高于 OVX+E2 组($P<0.05$)。见图 8。

3 讨论

MF 是 2 型糖尿病患者的首选用药,可通过多种机制影响骨代谢:一方面通过 AMPK-mTORC2 和 AKT-mTORC1 信号轴调节 SIRT6 和 OCT4 的表达,促进成骨前细胞的增殖和分化^[5];另一方面通过 AMPK/Runx2/Cbfa1 通路诱使大鼠胫骨 BMSCs 向

成骨细胞分化,刺激矿化结节的形成^[6];此外还能减少晚期糖基化终末产物的产生,逆转和改善高糖对成骨细胞功能的损伤^[7]。临床研究^[8]发现 MF 可降低糖尿病患者骨折发生风险,本研究以去卵巢大鼠模拟骨质疏松症,以雌二醇为对照进一步探究 MF 抗骨质疏松的作用机制。

OPG/RANKL/RANK 通路是影响骨代谢最主要的途径^[9]。骨吸收因子刺激成骨细胞膜表达 RANKL 分子,后者与破骨细胞膜上的 RANK 结合后,诱导破骨细胞膜上肿瘤坏死因子受体相关因子与 RANK 的胞内区结合并激活下游多种细胞内信号传导通路,上调促骨吸收因子的表达,促进破骨细胞分化成熟,增强骨吸收活性^[10]。而由成骨细胞生成的 OPG 可竞争性与 RANKL 结合,阻止这些信号转导途径,负性调节破骨细胞的生成^[11]。雌激素缺乏会使 OPG/RANKL 比例失调,破骨细胞活性增强,诱使发生骨质疏松^[12]。本研究中,去卵巢大鼠 BMSCs 向成骨细胞的分化受到抑制,collagen type I、OC、OPG mRNA 表达明显受到抑制,而 RANKL、IL-6 mRNA 表达水平明显增加,给予雌二醇干预后,去卵巢大鼠的 collagen type I、OC、OPG mRNA 表达显著增强,而 RANKL、IL-6mRNA 表达明显减弱,由此导

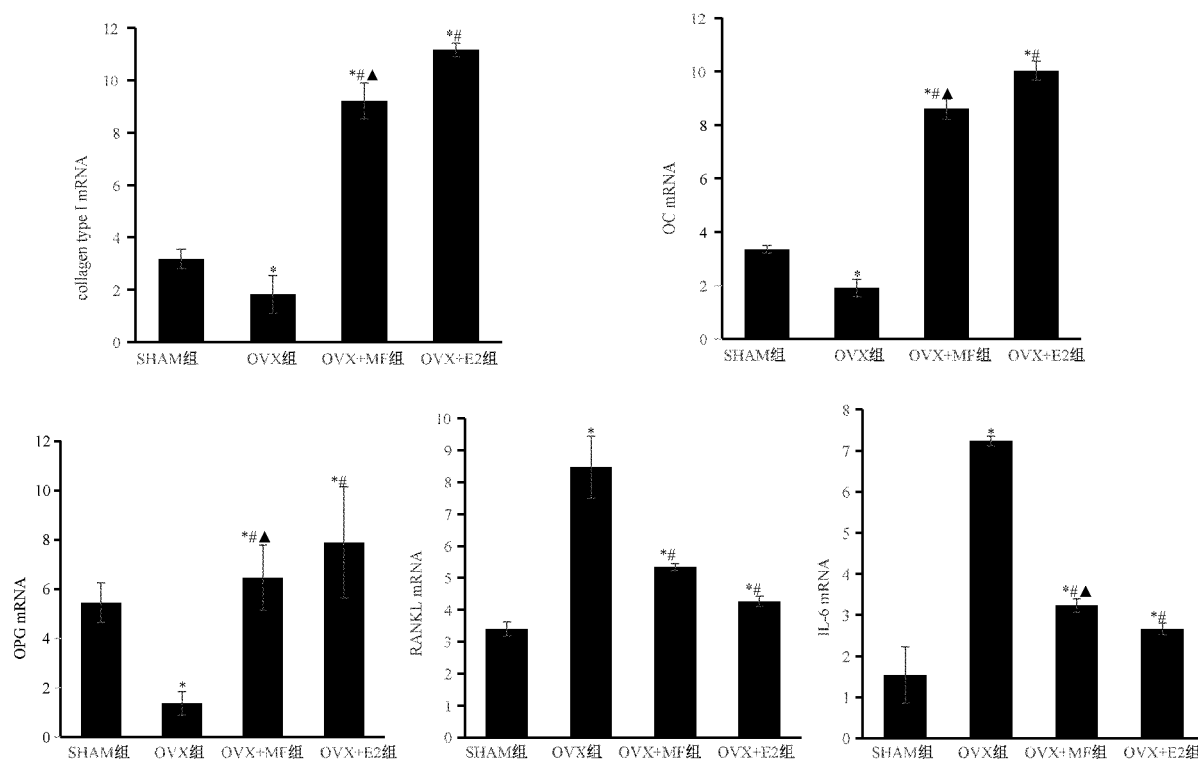


图8 各组大鼠成骨细胞的基因表达

注:与 SHAM 组比较,* $P<0.05$;与 OVX 组比较,# $P<0.05$;与 OVX+E2 组比较,▲ $P<0.05$ 。

Fig.8 Gene expression of osteoblasts in each group

致其骨密度以及骨矿含量也显著增加,雌二醇显著逆转了去卵巢大鼠的骨质疏松;用 MF 干预去卵巢大鼠 BMSCs 后, collagen type I、OC、OPG mRNA 表达显著增强, RANKL、IL-6 mRNA 表达明显减弱, 且 MF 对 collagen type I、OC、OPG mRNA 的表达表现出强于正常对照组的特性, 提示 MF 通过 OPG/RANKL/RANK 通路增加成骨细胞活性, 抑制破骨细胞分化, 发挥骨保护作用, 尤其在增强成骨细胞活性方面有优势。体外培养 SD 大鼠的 BMSCs 并给予 100 $\mu\text{mol/L}$ MF 孵育 21 d 后发现, BMSCs 中促成骨基因表达增加而促成脂基因表达减少, 且 MF 显著促进矿化结节的沉积, 阻断胞质脂滴的形成, 提示 MF 可诱使 BMSCs 成骨分化而抑制其脂向分化^[13]。在本研究中亦发现 MF 可进一步诱导去卵巢大鼠 BMSCs 向成骨细胞分化, 显著增强 ALP 活性和成骨细胞的钙化能力, 并增加其骨密度和骨矿含量, 虽然 MF 的作用弱于雌二醇, 但仍能有效改善去卵巢大鼠骨质疏松的状态。

本研究的不足之处在于未进行 MF 不同剂量的对比, 不能排除剂量对研究结果的影响; 此外, MF 对骨代谢影响可能与动物的种系、年龄、体重以及体内激素水平和炎症状态等有关, 因此仍需要大量的基础和临床研究进一步证实 MF 对骨代谢的影响。

总之, 本研究结果表明, MF 不仅增加了去卵巢大鼠的骨密度和骨矿物含量, 增强了成骨细胞增殖和钙化能力以及 ALP 活性, 还可经由 OPG/RANKL/RANK 途径诱导 BMSCs 向成骨细胞分化, 阻碍破骨细胞的成熟。尽管 MF 的抗骨质疏松作用逊于雌二醇, 但其在促进成骨细胞基因表达活性方面有优势, MF 潜在的骨保护作用可能会改善糖尿病所引起的骨质疏松症。

【参 考 文 献】

- [1] 赵丹, 修锐. 二甲双胍临床应用研究概述[J]. 药物流行病学杂志, 2010, 19(3): 164-166.
- [2] Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, et al. Metformin decreases reactive oxygen species, enhances osteogenic properties of adipose-derived multipotent mesenchymal stem cells in vitro, and increases bone density in vivo[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 9785890.
- [3] Lee YS, Kim YS, Lee SY, et al. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts[J]. *Bone*, 2010, 47(5): 1-937.
- [4] Xiao ZS, Quarles LD, Chen QQ. Effect of asymmetric dimethylarginine on osteoblastic differentiation[J]. *Kidney Int*, 2001, 60(5): 1699-1704.
- [5] Mu W, Wang Z, Ma C, et al. Metformin promotes the proliferation and differentiation of murine preosteoblast by regulating the expression of sirt6 and oct4[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 129: 462-474.
- [6] 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.
- [7] 甄东户, 汤旭磊, 成建国, 等. 二甲双胍减轻糖基化终末产物对成骨细胞功能损害的观察[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(7): 549-552.
- [8] Starup-Linde J, Gregersen S, Frost M, et al. Use of glucose-lowering drugs and risk of fracture in patients with type 2 diabetes[J]. *Bone*, 2017, 95: 136-142.
- [9] 谭敏, 杨颜瑜, 熊琴, 等. OPG/RANKL/RANK 信号通路在骨质疏松症患者骨重建中作用机制的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(43): 111-114.
- [10] Park-Min KH. Mechanisms involved in normal and pathological osteoclastogenesis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(14): 2519-2528.
- [11] Fan F, Shi P, Liu M, et al. Lactoferrin preserves bone homeostasis by regulating the RANKL/RANK/OPG pathway of osteoimmunology[J]. *Food Funct*, 2018, 9(5): 2653-2660.
- [12] 智信, 陈晓, 苏佳灿. 绝经后骨质疏松症发病机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(11): 1510-1513.
- [13] Ying G, Jing X, Xiaoyu L, et al. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. *J pharm pharmacol*, 2008, 60(12): 1695-1700.

(收稿日期: 2020-03-19; 修回日期: 2020-05-12)