

## · 综述 ·

## GLP-1 对 2 型糖尿病患者骨骼的影响

阮莹莹 闫彩凤

**【摘要】** 2 型糖尿病患者骨折风险升高,因此在降糖治疗的同时关注降糖药物对骨骼的影响具有重要意义。研究发现,胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类药物不仅能够控制血糖,还能通过调节成骨细胞 Wnt 通路、促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化、影响破骨细胞核因子- $\kappa$ B 受体活化因子配体通路、抑制骨细胞分泌骨硬化蛋白以及其他途径改善骨代谢,提示这类药物对 2 型糖尿病患者骨质疏松的防治有重要作用。

**【关键词】** 胰高血糖素样肽-1; 2 型糖尿病; 骨形成; 骨吸收; 骨折

**基金项目:**扬州市社会发展基金(YZ2016061)

**The impact of GLP-1 on bone in patients with type 2 diabetes** Ruan Yingying, Yan Caifeng. Graduate School, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; Department of Endocrinology, Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, China

Corresponding author: Yan Caifeng, Email: yancaifeng@126.com

**【Abstract】** The risk of fractures in patients with type 2 diabetes is increased, therefore, it is important to take into account the effects of anti-diabetic therapies on bone. Studies show that glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-based therapies not only can lower blood glucose, but also improve bone metabolism by regulating Wnt pathways in osteoblast, promoting osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC), regulating receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand pathways in osteoclast, inhibiting sclerostin secretion of osteocyte, etc. It suggests that GLP-1-based therapies play an essential role in the prevention and treatment of osteoporosis in patients with type 2 diabetes.

**【Key words】** Glucagon-like peptide-1; Type 2 diabetes mellitus; Bone formation; Bone resorption; Fracture

**Fund program:** Social Development Foundation of Yangzhou City of China (YZ2016061)

2 型糖尿病 (T2DM) 是一种全身性代谢性疾病,随着疾病进展,逐渐出现多种微血管、大血管并发症。2 型糖尿病患者骨折风险升高,提示疾病本身以及降糖药物对骨骼的潜在影响<sup>[1]</sup>。因此,研究降糖药物对骨骼的作用对临床实践中的药物选择有指导意义。胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 类药物在 2 型糖尿病治疗中的应用越来越广,包括 GLP-1 受体激动剂 (GLP-1RA) 和二肽基肽酶-4 (DPP-4) 抑制剂,进一步研究发现, GLP-1 在骨骼、脂肪、心脏、脑等其他器官中具有不依赖其降糖作用的胰腺外效应<sup>[2]</sup>。本文将介绍 GLP-1 类药物在骨代谢、骨折风险方面的研究进展。

## 1 GLP-1 的生物学特性

GLP-1 是肠道 L 细胞分泌的由 30 个氨基酸残基组成的肽类激素,通过促进胰岛  $\beta$  细胞增殖,抑制胰岛  $\beta$  细胞凋亡,刺激胰岛素基因表达和胰岛素分泌,抑制胰高血糖素分泌等多种途径参与血糖调节<sup>[2]</sup>。人体自身产生的 GLP-1 在体内很快被 DPP-4 水解,其血浆半衰期不足 2 min,极大地限制了 GLP-1 的临床应用<sup>[3]</sup>。因此,通过改变天然 GLP-1 的氨基酸序列,使其不易被 DPP-4 水解,或者直接抑制 DPP-4 活性,均能增加体内 GLP-1 浓度。以利拉鲁肽为例,它是一种 GLP-1 类似物,与天然的人 GLP-1 相比,利拉鲁肽第 34 位赖氨酸被精氨酸所取代,第 26 位赖氨酸经由谷氨酸介导发生棕榈化,显著延长了其在体内的半衰期<sup>[3]</sup>。

目前国内上市的 GLP-1RA 包括艾塞那肽 (exenatide) 和利拉鲁肽 (liraglutide), DPP-4 抑制剂

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2018.04.014

作者单位:116044 大连医科大学研究生院(阮莹莹);225001 扬州,江苏省苏北人民医院内分泌科(阮莹莹、闫彩凤)

通信作者:闫彩凤,Email: yancaifeng@126.com

包括西格列汀 (sitagliptin)、维格列汀 (vildagliptin)、沙格列汀 (saxagliptin)、利格列汀 (linagliptin) 和阿格列汀 (alogliptin)。

## 2 GLP-1 促进骨形成

现已初步证实 GLP-1 具有促成骨作用。实验发现,大鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 存在 GLP-1 受体 (GLP-1R), GLP-1 与之结合后通过糖基磷脂酰肌醇 (GPIs)/肌醇磷酸多糖 (IPGs) 信号通路,下调早期成骨分化基因 runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的表达,上调成熟成骨细胞标志物骨钙素的表达,提示 GLP-1 可能促进成骨细胞的晚期分化<sup>[4]</sup>。通过对老年去卵巢大鼠模型及糖尿病 Goto-Kakizaki (GK) 大鼠模型的研究发现,Ex-4 (Exendin-4, 蜥蜴唾液中提取的 GLP-1 类似物)、利拉鲁肽均能促进其骨组织 Runx2、骨钙素、碱性磷酸酶、I 型胶原蛋白 (Col I) 的表达,并升高骨密度、改善骨小梁结构<sup>[5-6]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在成骨细胞分化、增殖过程中起重要作用。低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 是 Wnt 蛋白的共同受体,糖蛋白 Dickkopf 相关蛋白 (DKK1)、骨硬化蛋白通过竞争性结合 Wnt 蛋白受体抑制 LRP5,从而抑制 Wnt 通路。在胰岛素抵抗 (IR) 和 T2DM 小鼠模型中,LRP5/DKK1 mRNA 比值降低,而连续 3 d 皮下泵输注 Ex-4 [0.1 nmol/(kg·h)] 能使 LRP5/DKK1 mRNA 比值升高并接近于正常小鼠,同时胫骨和股骨的骨密度增加、骨小梁微结构改善<sup>[7]</sup>。荟萃分析表明,T2DM 患者血浆骨硬化蛋白水平显著高于 1 型糖尿病患者及无糖尿病人群<sup>[8]</sup>。在高糖状态下,Ex-4 能抑制大鼠 MLO-Y4 骨样细胞表达骨硬化蛋白,而 Ex-4 治疗 T2DM OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) 大鼠能使其血浆骨硬化蛋白水平下降、骨钙素浓度升高,股骨骨密度增加<sup>[9]</sup>。在去卵巢小鼠模型中同样发现,皮下注射利拉鲁肽 [0.3 mg/(kg·d)] 或 Ex-4 [10  $\mu$ g/(kg·d)] 4 周后小鼠血浆骨硬化蛋白水平降低,同时 micro-CT 和组织形态学测定均表明其骨小梁结构改善<sup>[10]</sup>。在 Zucker 糖尿病肥胖 (ZDF) 大鼠模型中,与吡格列酮单药组相比,吡格列酮联合维格列汀组血浆骨硬化蛋白水平降低、骨钙素升高、抗酒石酸碱性磷酸酶 (TRAP) 5b 降低,同时股骨骨密度增加、骨小梁结构改善<sup>[11]</sup>。上述研究说明, GLP-1 可通过影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路促进骨形成。

GLP-1 能与骨髓间充质干细胞 (BMSC) 上的

GLP-1R 结合,促进 BMSC 向成骨细胞分化。在后肢去负荷大鼠模型中,使用 Ex-4 能增加骨量、改善骨小梁结构和生物力学特性;进一步研究发现,Ex-4 与 BMSC 上的 GLP-1R 结合后,通过蛋白激酶 A (PKA)/ $\beta$ -catenin 和 PKA/磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT)/糖原合酶激酶 (GSK) 3 $\beta$  两条通路促进其向成骨细胞分化,而不被 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路抑制剂 DKK1 抑制<sup>[12]</sup>。另一项研究发现, GLP-1 能抑制 BMSC 凋亡,并通过激活 MAPK 和抑制 PKC,从而抑制 BMSC 向脂肪细胞早期分化,其中抑制 PKC 还能维持 BMSC 的增殖能力<sup>[13]</sup>。此外,人脂肪干细胞上也存在 GLP-1R, GLP-1 与受体结合后促进脂肪干细胞向成骨细胞分化,抑制其向脂肪细胞分化,而这种作用可能是通过细胞外信号调节激酶通路实现的<sup>[14]</sup>。

骨胶原生成是骨形成过程中的重要环节,在骨强度的维持中发挥重要作用。晚期糖基化终末产物 (AGE) 在骨胶原上积聚使胶原变性,导致骨强度下降。体外实验发现, GLP-1 能减少 AGE 受体在内皮细胞上的表达,从而阻断 AGE 的作用<sup>[15]</sup>。在 T2DM 小鼠中,维格列汀能抑制 AGE 形成,减少 AGE 受体在胸主动脉上表达; DPP-4 抑制剂能通过抑制 AGE/AGE 受体轴降低 AGE 对血管的损伤,提示骨骼 AGE/AGE 受体轴亦可能是 DPP-4 抑制剂作用于骨骼的靶点之一<sup>[15]</sup>。

## 3 GLP-1 抑制骨吸收

现有的研究表明, GLP-1 能抑制骨吸收。GLP-1R 基因敲除 (Glp1r<sup>-/-</sup>) 小鼠表现为破骨细胞数目增多以及骨吸收活性增强,进一步骨密度、骨组织形态学测定发现,其骨量减少、骨脆性增加<sup>[16]</sup>。用利拉鲁肽或 Ex-4 培养小鼠破骨细胞前体细胞,发现破骨细胞数量增加,但是单个破骨细胞吸收率分别下降 13% 及 20%,故 GLP-1 对破骨细胞的总体效应是抑制的<sup>[10]</sup>。由于在破骨细胞上未发现 GLP-1R,故推测 GLP-1 间接抑制骨吸收。Glp1r<sup>-/-</sup> 小鼠骨吸收标志物尿脱氧吡啶啉升高,甲状腺中降钙素 mRNA 水平降低,外源补充降钙素能缓解这种趋势;而使用 Ex-4 后,小鼠降钙素基因表达增加<sup>[16]</sup>。另一研究发现, Ex-4 能使去卵巢小鼠血浆降钙素增加 177%<sup>[10]</sup>。提示在啮齿类动物中, GLP-1 可通过降钙素间接调节骨吸收。但在人体正常甲状腺 C 细胞上, GLP-1R 表达率仅为 33%,甚至不表达<sup>[17-18]</sup>。这种啮齿类动物与人类之间的受体表达

差异可能是导致基础研究与临床研究不一致的因素之一。

核因子- $\kappa$ B 受体活化因子 (RANK) 配体 (RANKL)/RANK 通路对破骨细胞的增殖、分化起重要作用,骨保护素可与 RANKL 结合,发挥抑制 RANKL/RANK 轴、活化破骨细胞信号转导的作用。Ex-4 通过影响骨保护素/RANKL/RANK 信号通路,上调骨保护素/RANKL 比值抑制骨吸收。在 T2DM 大鼠中,持续 3 d 皮下注射 GLP-1 或 Ex-4 后,骨组织骨钙素、骨保护素 mRNA 表达增加,骨保护素/RANKL 比值上调,骨小梁结构改善,而胰岛素和甲状旁腺激素水平无明显变化,说明 GLP-1 的骨保护作用不依赖胰岛素和甲状旁腺激素<sup>[19]</sup>。在 IR 和 T2DM 小鼠模型,老年去卵巢大鼠模型中,均得到相似结果<sup>[5,7]</sup>。在高脂饲养的 Wistar 大鼠模型中, GLP-1 和 Ex-4 使骨保护素/RANKL 比值上调的同时,能逆转高脂引起的骨量减少<sup>[20]</sup>。

#### 4 GLP-1 对 T2DM 患者骨折结局的影响

目前普遍认为, T2DM 患者骨折风险增加与其骨强度下降,尤其是骨质量下降有关。与野生型小鼠相比, GLP-1R 和 GIPR 双基因敲除 (DIRKO) 小鼠的骨皮质厚度和骨外径均减小,骨胶原成熟度下降,骨生物力学性能降低,骨质量下降<sup>[21]</sup>。

但目前 GLP-1RA 对骨折风险的影响尚无一致结论。一项纳入 16 项随机临床试验 (RCT) 的荟萃分析显示, GLP-1RA 与骨折风险无关 ( $OR = 1.05$ , 95%  $CI$ :  $0.59 \sim 1.87$ ), 但进一步亚组分析发现, 利拉鲁肽组骨折风险降低 ( $OR = 0.38$ , 95%  $CI$ :  $0.17 \sim 0.87$ ), 而艾塞那肽组骨折风险增加 ( $OR = 2.09$ , 95%  $CI$ :  $1.03 \sim 4.21$ )<sup>[22]</sup>。另一项荟萃分析纳入 7 项治疗时间均在 24 周及以上的 RCT, 结果表明 GLP-1RA 并不影响骨折风险 ( $OR = 0.75$ , 95%  $CI$ :  $0.28 \sim 2.02$ )<sup>[23]</sup>。

DPP-4 抑制剂对骨折风险的影响同样存在争议。在一项配对病例对照研究中, 使用 DPP-4 抑制剂与 T2DM 患者骨折风险降低有关 ( $HR = 0.67$ , 95%  $CI$ :  $0.54 \sim 0.84$ )<sup>[24]</sup>。一项纳入 28 项 RCT 的荟萃分析 (11 880 例患者使用 DPP-4 抑制剂, 9 175 例患者使用其他降糖药, 平均随访时间 35 周) 结果表明, DPP-4 抑制剂能减少 T2DM 患者 40% 的骨折风险<sup>[25]</sup>。而近期的两篇荟萃分析结果未发现 DPP-4 抑制剂对骨折风险有影响<sup>[26-27]</sup>。

GLP-1 类药物对骨折结局影响的差异可能是来源于以下几个方面: 第一, 现有临床试验普遍存在的问题是多将骨折作为不良事件来收集, 而不是作为主要或次要终点, 且临床试验的持续时间较短, 骨折例数不足, 以及未收集所有部位的骨折数据如隐匿的椎体骨折。第二, 利拉鲁肽与艾塞那肽的药代动力学特点以及同源性存在差异。第三, GLP-1RA 的减重效应可能抵消了其对骨骼的保护作用, 现有的临床研究结果表明, 艾塞那肽虽降低体重但不影响 T2DM 患者的骨密度, 故推测, 减重可能影响骨质量<sup>[28]</sup>。第四, GLP-1RA 的消化道不良反应可能会影响部分患者对维生素 D、钙等影响骨代谢的物质吸收。最后, DPP-4 抑制剂除了在生理范围内升高体内 GLP-1 水平之外, 其他 DPP-4 的底物如肠抑胃肽、GLP-2 的水平也会升高, 而这些物质也会影响骨代谢。以上这些因素都会影响 GLP-1 类药物对骨折风险的确切作用。

综上, 作为新型降糖药, GLP-1 类药物在临床中的使用地位正逐步上升。基础研究发现, 其促进骨形成、抑制骨吸收的作用, 使得这类药物在 T2DM 患者骨质疏松的防治中具有良好的应用前景。在临床研究中, 虽然绝大多数研究结果表明 GLP-1 类药物不增加 T2DM 患者骨折风险, 但是仍然存在争议。因此, 有关 GLP-1 类药物对 T2DM 患者骨骼的影响还有待深入研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Moayeri A, Mohamadpour M, Mousavi SF, et al. Fracture risk in patients with type 2 diabetes mellitus and possible risk factors: a systematic review and meta-analysis [J]. Ther Clin Risk Manag, 2017, 13: 455-468. DOI: 10.2147/TCRM.S131945.
- [2] Cantini G, Mannucci E, Luconi M. Perspectives in GLP-1 research: new targets, new receptors [J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27(6): 427-438. DOI: 10.1016/j.tem.2016.03.017.
- [3] Nauck M. Incretin therapies: highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors [J]. Diabetes Obes Metab, 2016, 18(3): 203-216. DOI: 10.1111/dom.12591.
- [4] Nuche-Berenguer B, Portal-Núñez S, Moreno P, et al. Presence of a functional receptor for GLP-1 in osteoblastic cells, independent of the cAMP-linked GLP-1 receptor [J]. J Cell Physiol, 2010, 225(2): 585-592. DOI: 10.1002/jcp.22243.
- [5] Ma X, Meng J, Jia M, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1

- receptor agonist, prevents osteopenia by promoting bone formation and suppressing bone resorption in aged ovariectomized rats [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28 (7): 1641-1652. DOI: 10. 1002/jbmr. 1898.
- [6] Sun HX, Lu N, Luo X, et al. Liraglutide, the glucagon-like peptide-1 receptor agonist, has anabolic bone effects in diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *J Diabetes*, 2015, 7 (4): 584-588. DOI: 10. 1111/1753-0407. 12282.
- [7] Nuche-Berenguer B, Moreno P, Portal-Núñez S, et al. Exendin-4 exerts osteogenic actions in insulin-resistant and type 2 diabetic states [J]. *Regul Pept*, 2010, 159 (1-3): 61-66. DOI: 10. 1016/j. regpep. 2009. 06. 010.
- [8] Hygum K, Starup-Linde J, Harsløf T, et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY; Diabetes mellitus, a state of low bone turnover-a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Endocrinol*, 2017, 176 (3): R137-R157. DOI: 10. 1530/EJE-16-0652.
- [9] Kim JY, Lee SK, Jo KJ, et al. Exendin-4 increases bone mineral density in type 2 diabetic OLETF rats potentially through the down-regulation of SOST/sclerostin in osteocytes [J]. *Life Sci*, 2013, 92 (10): 533-540. DOI: 10. 1016/j. lfs. 2013. 01. 001.
- [10] Pereira M, Jeyabalan J, Jørgensen CS, et al. Chronic administration of glucagon-like peptide-1 receptor agonists improves trabecular bone mass and architecture in ovariectomised mice [J]. *Bone*, 2015, 81: 459-467. DOI: 10. 1016/j. bone. 2015. 08. 006.
- [11] Eom YS, Gwon AR, Kwak KM, et al. Protective effects of vildagliptin against pioglitazone-induced bone loss in type 2 diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (12): e0168569. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0168569.
- [12] Meng J, Ma X, Wang N, et al. Activation of GLP-1 receptor promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through  $\beta$ -catenin [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 6 (4): 579-591. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2016. 02. 002.
- [13] Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, et al. Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298 (3): E634-E643. DOI: 10. 1152/ajpendo. 00460. 2009.
- [14] Lee HM, Joo BS, Lee CH, et al. Effect of glucagon-like peptide-1 on the differentiation of adipose-derived stem cells into osteoblasts and adipocytes [J]. *J Menopausal Med*, 2015, 21 (2): 93-103. DOI: 10. 6118/jmm. 2015. 21. 2. 93.
- [15] Yamagishi S. Comment on: Monami et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Diabetes Care* 2011; 34: 2474-2476 [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35 (4): e33. DOI: 10. 2337/dc11-2561.
- [16] Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, et al. The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption [J]. *Endocrinology*, 2008, 149 (2): 574-579. DOI: 10. 1210/en. 2007-1292.
- [17] Gier B, Butler PC, Lai CK, et al. Glucagon like peptide-1 receptor expression in the human thyroid gland [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97 (1): 121-131. DOI: 10. 1210/jc. 2011-2407.
- [18] Waser B, Blank A, Karamitopoulou E, et al. Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas [J]. *Mod Pathol*, 2015, 28 (3): 391-402. DOI: 10. 1038/modpathol. 2014. 113.
- [19] Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, et al. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states [J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 84 (6): 453-461. DOI: 10. 1007/s00223-009-9220-3.
- [20] Nuche-Berenguer B, Lozano D, Gutiérrez-Rojas I, et al. GLP-1 and exendin-4 can reverse hyperlipidic-related osteopenia [J]. *J Endocrinol*, 2011, 209 (2): 203-210. DOI: 10. 1530/JOE-11-0015.
- [21] Mieczkowska A, Mansur S, Bouvard B, et al. Double incretin receptor knock-out (DIRKO) mice present with alterations of trabecular and cortical micromorphology and bone strength [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26 (1): 209-218. DOI: 10. 1007/s00198-014-2845-8.
- [22] Su B, Sheng H, Zhang M, et al. Risk of bone fractures associated with glucagon-like peptide-1 receptor agonists' treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Endocrine*, 2015, 48 (1): 107-115. DOI: 10. 1007/s12020-014-0361-4.
- [23] Mabilieu G, Mieczkowska A, Chappard D. Use of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *J Diabetes*, 2014, 6 (3): 260-266. DOI: 10. 1111/1753-0407. 12102.
- [24] Dombrowski S, Kostev K, Jacob L. Use of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and risk of bone fracture in patients with type 2 diabetes in Germany-A retrospective analysis of real-world data [J]. *Osteoporos Int*, 2017, 28 (8): 2421-2428. DOI: 10. 1007/s00198-017-4051-y.
- [25] Monami M, Dicembrini I, Antenore A, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and bone fractures: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34 (11): 2474-2476. DOI: 10. 2337/dc11-1099.
- [26] Fu J, Zhu J, Hao Y, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and fracture risk: an updated meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29104. DOI: 10. 1038/srep29104. DOI: 10. 1038/srep29104.
- [27] Mamza J, Marlin C, Wang C, et al. DPP-4 inhibitor therapy and bone fractures in people with type 2 diabetes-a systematic review and meta-analysis [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 116: 288-298. DOI: 10. 1016/j. diabres. 2016. 04. 029.
- [28] Li R, Xu W, Luo S, et al. Effect of exenatide, insulin and pioglitazone on bone metabolism in patients with newly diagnosed type 2 diabetes [J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52 (6): 1083-1091. DOI: 10. 1007/s00592-015-0792-2.

(收稿日期: 2017-11-22)