

飲食誘導肥胖小鼠服用口服降血糖藥物後的 骨質密度及微結構變化

周依文 曹政峰 陳榮福

高雄長庚紀念醫院內科部內分泌暨新陳代謝科
長庚大學醫學院醫學系

摘 要

本研究是為了探討飲食誘導肥胖小鼠，於服用口服降血糖藥物後骨質密度及微結構的變化。我們將小鼠分成控制組及食用高脂高糖飲食，高脂高糖飲食組再分成服用 SGLT2 抑制劑、sulfonylurea 及 metformin，並利用各種骨質指數來分析其不同處。研究發現肥胖小鼠之骨小樑數目減少，而在不同藥物之間的比較中，sulfonylurea 顯著地會減少骨體積分數和骨小樑厚度。此外，在骨頭微結構的比較，可以發現 sulfonylurea 會造成微結構的破壞及明顯負面的影響

關鍵詞：肥胖 (Obesity)
骨質密度 (Bone mineral density)
口服降血糖藥物 (Obesity)

前 言

在全球第 2 型糖尿病 (T2DM) 的盛行率急劇增加。2019 年，約有 4.63 億人患有糖尿病，相當於全球人口的 9.3%，其中有超過 90% 的糖尿病病人是屬於第 2 型糖尿病^{1,2}。近年來，脆弱性骨折被認為是 T2DM 的重要併發症。儘管與正常人群相比，糖尿病病人的骨質密度 (Bone Mineral Density, BMD) 相對於一般是正常或偏高³⁻⁵，但糖尿病合併骨折會導致更高死亡率和醫療保健支出³，如何減少第 2 型糖尿病高骨折風險是十分重要的。

多項研究報告口服降血糖藥物治療與骨折之間的關係，其中一些研究了胰島素和口

服降糖藥物治療後骨骼結構的變化。幾項涉及 thiazolidinediones (TZD) 的臨床試驗報告了 TZD 會增加骨折風險和對骨質有負面的影響^{3,6,7}。其中服用 rosiglitazone 的女性骨折率出乎意料地更高⁸。臨床試驗指出另一種 TZD 類藥物 pioglitazone 與男性和女性的骨折風險增加有關⁶。目前的相關治療指引之建議，有骨折風險或骨質疏鬆症的患者應謹慎使用 TZD 類藥物⁹。

最近，SGLT2 (sodium glucose co-transporter 2) 抑制劑的報告中，canagliflozin 之心血管評估研究發現，canagliflozin 與安慰劑相比會增加下肢截肢和骨折的風險¹⁰。然而，另外 Canagliflozin 於糖尿病和腎病變之腎臟預後

(renal outcomes) 臨床評估試驗表明，下肢截肢的風險沒有增加¹¹。相比之下，empagliflozin 和 dapagliflozin 的心血管研究顯示，對下肢截肢和骨折的影響為中性^{12,13}。目前為止，不同 SGLT2 抑制劑影響骨結構的機制尚有待釐清。

近年來，隨著骨頭影像和口服降糖藥物的進步，人們越來越有興趣了解這些藥物對骨結構的影響。因此，我們的研究旨在確定口服降糖藥對飲食誘導肥胖小鼠骨微結構的影響。

研究材料和方法

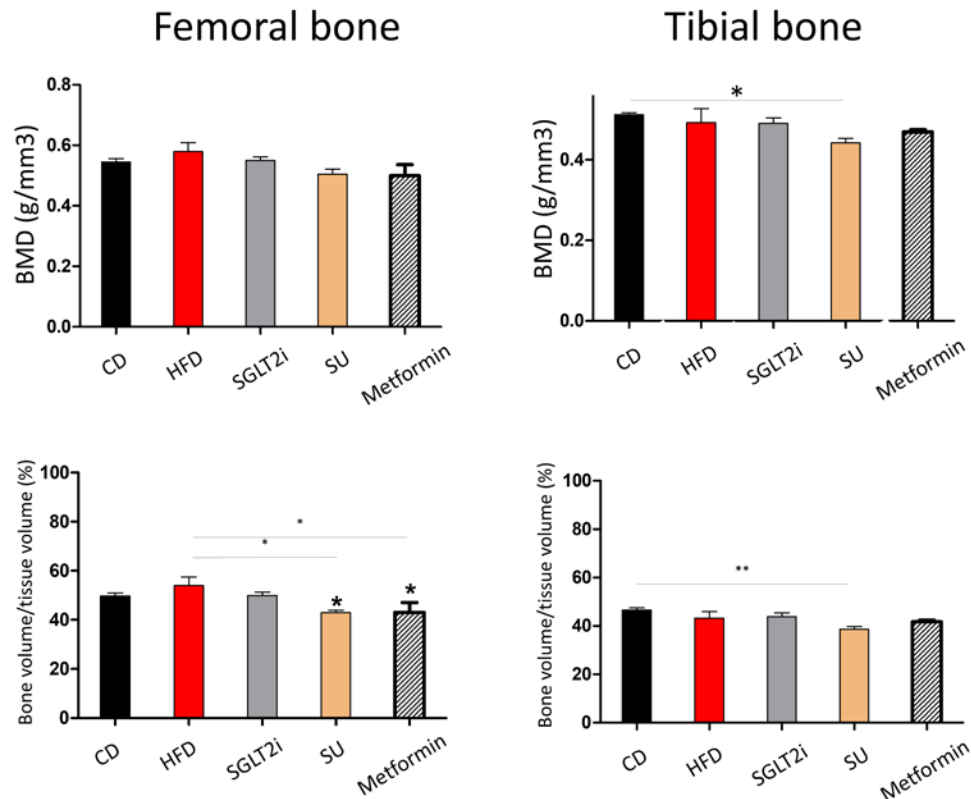
一、動物和飲食

這項研究觀察了雄性 C57BL/6J 小鼠，它們被關在 12 小時的明暗循環和溫控房間中。在 6 個月的治療過程中，小鼠可以自由獲取自來水和隨意飲食。所有小鼠都餵食一般食物 (chow diet, CD; 11% 的脂肪熱量)，為期 1 個月。然後將他們分成五組：(1) 一般食物組，(2) 高脂肪高蔗糖飲食 (High Fat/Fructose Diet, HFD; 58% 的能量為脂肪)，為期 5 個月，(3) HFD 加 SGLT2 抑制劑 (empagliflozin)，為期從第 3 個月到第 6 個月；(4) HFD 加磺脲類藥物 (Sulfonylurea, SU, Glimpiride)，為期從第 3 至第 6 個月，以及 (5) HFD 加二甲雙胍 (Metformin)，為期從第 3 至第 6 個月。飲食商業配方來自 Research Diets, Inc. (NJ, USA)，符合美國營養研究所對小鼠礦物質和維生素的要求。定期記錄體重、內臟脂肪量和皮下脂肪量。本動物實驗計畫經高雄長庚紀念醫院機構動物護理和使用委員會批准。

58% 的能量為脂肪)，為期 5 個月，(3) HFD 加 SGLT2 抑制劑 (empagliflozin)，為期從第 3 個月到第 6 個月；(4) HFD 加磺脲類藥物 (Sulfonylurea, SU, Glimpiride)，為期從第 3 至第 6 個月，以及 (5) HFD 加二甲雙胍 (Metformin)，為期從第 3 至第 6 個月。飲食商業配方來自 Research Diets, Inc. (NJ, USA)，符合美國營養研究所對小鼠礦物質和維生素的要求。定期記錄體重、內臟脂肪量和皮下脂肪量。本動物實驗計畫經高雄長庚紀念醫院機構動物護理和使用委員會批准。

二、微米級斷層掃描 (micro CT) 測量

使用微型 CT 掃描儀 (SkyScan 1076, Bruker micro CT, 比利時) 評估股骨和脛骨的小樑和皮質微結構。我們研究中使用的成像系統是台式微型 CT 掃描儀，其中 X 射線管和探測器安裝在輻射屏蔽儀器中。X 射線束被准直為錐形束照射系統，而探測器是分辨率為 1100 萬像



圖一：比較各組的小鼠股骨 (左) 和脛骨 (右) 的骨質密度 (上) 和骨體積分數 (下)，結果以平均 ± 標準差來呈現，* 代表 $p < 0.05$ ，** 代表 $p < 0.01$ 。

素的電荷耦合器件相機。用於加速電子轟擊金屬靶陽極的電勢的能量容量為 20 至 100 kV。BMD、骨體積分數 (bone volume fraction, BV/TV)、小樑厚度和數量 (trabecular thickness and number) 以及孔隙率 (porosity) 使用改進的高速 Feldkamp 算法確定。

三、統計分析

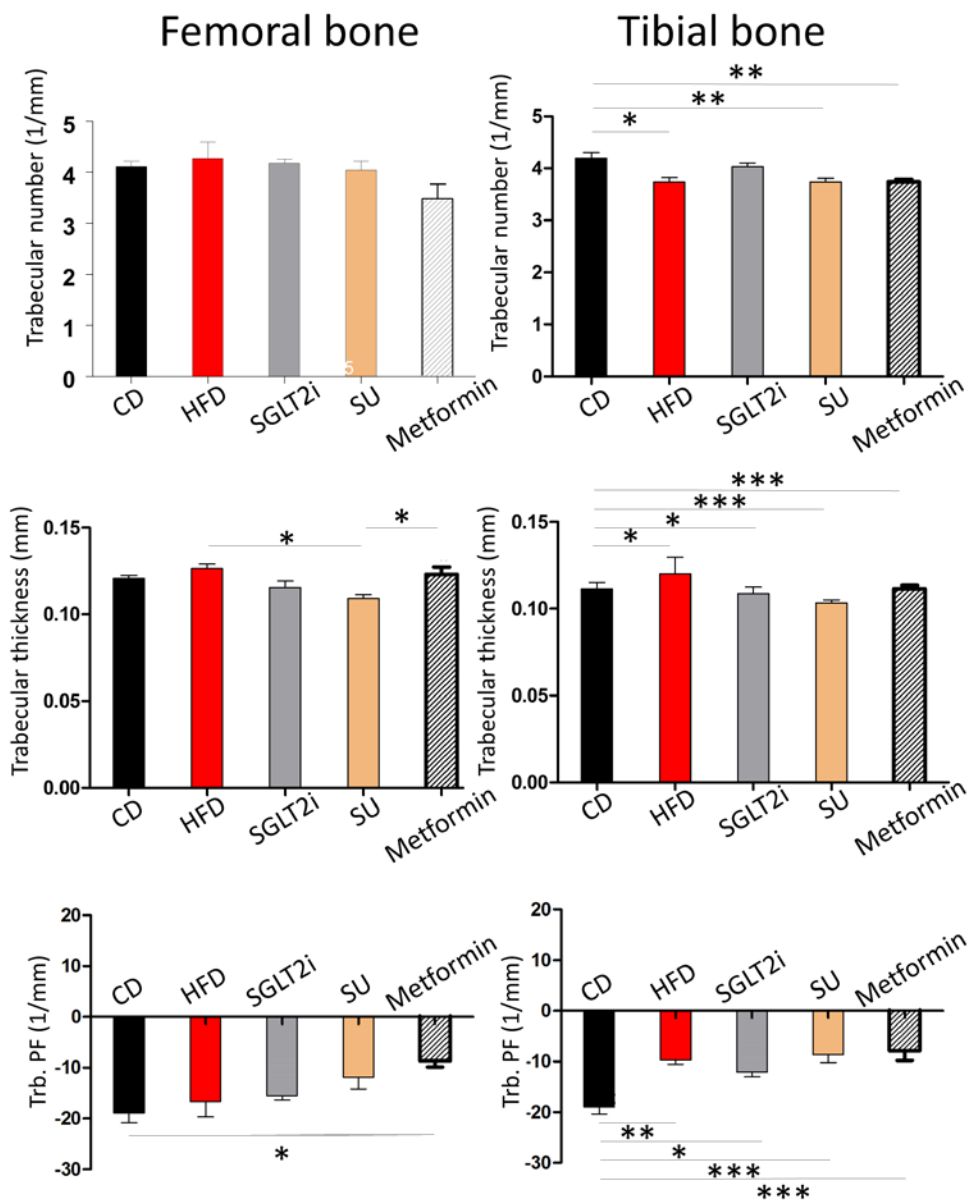
數據庫使用 Microsoft Excel 及以 GraphPad Prism 軟件繪製。所有測量值均表示為平均值 ±

SE。在所有分析中， $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 的值分別被認為具有統計學意義、非常顯著和高度顯著。為了驗證可重複性，所有實驗至少進行了 3 次。

結果

一、高脂高糖飲食 (HFD) 對小鼠骨骼結構的連續變化

在研究結束時，HFD 和 CD 組的股骨和脛骨的 BMD 和 BV/TV 相似 (圖 1)。然而，相



圖二：比較各組小鼠股骨 (左) 和脛骨 (右) 的骨小梁數量 (上)、厚度 (中) 與小樑骨模式因子 (下)，結果以平均 ± 標準差來呈現，* 代表 $p < 0.05$ ，** 代表 $p < 0.01$ ，*** 代表 $p < 0.001$ 。

對於 CD 組，HFD 組之脛骨小樑數量顯著減少 (圖 2)。在 HFD 組中觀察到小樑厚度、小樑骨模式因子 (trabecular bone pattern factor) 和結構模型指數 (structural model index) 增加 (圖 2 和圖 3)。HFD 組和 CD 組之間的總孔隙率 (total porosity)、閉合孔隙率 (close porosity)、開放孔隙率 (open porosity) 和連通性密度 (connectivity density) 則無差異 (圖 3 和圖 4)。

二、服用口服降糖藥後之骨結構和微觀結構變化

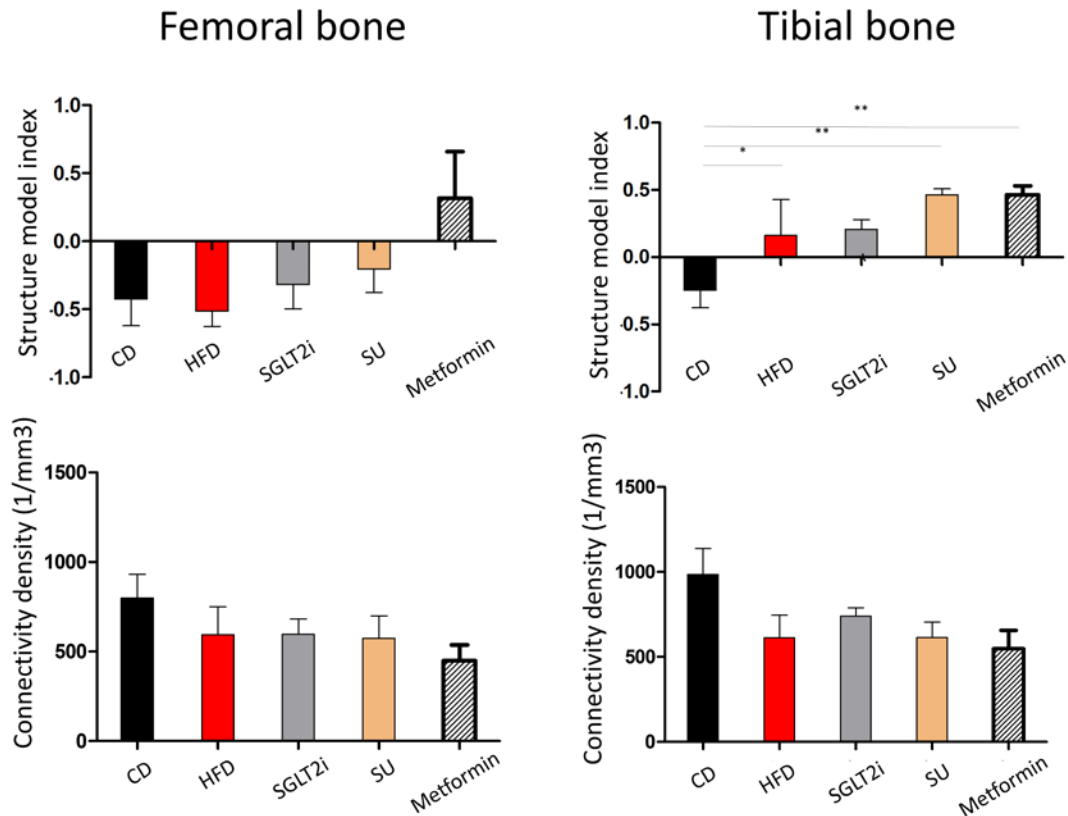
SU 組的脛骨 BMD 顯著低於 CD 組 (圖 1)，而在股骨中未觀察到差異。SU 組與 CD 組相比，脛骨 BV/TV 減少。與 HFD 組相比，SU 和二甲雙胍組顯示股骨的 BV/TV 降低 (圖 1)。此外與 CD 組相比，這些組的小樑數量和脛骨厚度均有所減少 (圖 2)。與 CD 組相比，SGLT2i 組脛骨小樑厚度減少 (圖 2)。另一方面，SU 組之股骨骨小樑厚度比 HFD 組顯著減少 (圖 2)。二甲雙胍組，股骨骨小樑模式因子

高於 CD 組，而 SU 組、二甲雙胍組和 SGLT2i 組之脛骨骨小樑模式因子高於 CD 組 (圖 2)。與 CD 組相比，SU 組和二甲雙胍組的脛骨結構模型指數增加 (圖 3)。與 HFD 組相比，二甲雙胍組的股骨總孔隙率和開放孔隙率增加 (圖 4)。此外，SU 組與 HFD 組相比，脛骨總孔隙率增加 (圖 4)。同樣，與 CD 組相比，SU 組增加了脛骨的開放孔隙率 (圖 4)。各組之間的閉合孔隙率和連通密度沒有統計學上之差異。

討 論

我們的研究結果顯示，即使 BMD 相同，HFD 組脛骨的骨微結構比 CD 組減少得更多。有趣的是，在 SU 組和飲食誘導的肥胖小鼠中，脛骨的小樑骨微結構和 BMD 顯著降低。

較低的小樑骨模式因子通常代表小樑格子的連接性更好，反之亦然¹⁴。與板狀骨小樑結構相比，較高的結構模型指數代表骨小樑結構具有更圓柱形、桿狀特徵，這與更大的骨質流

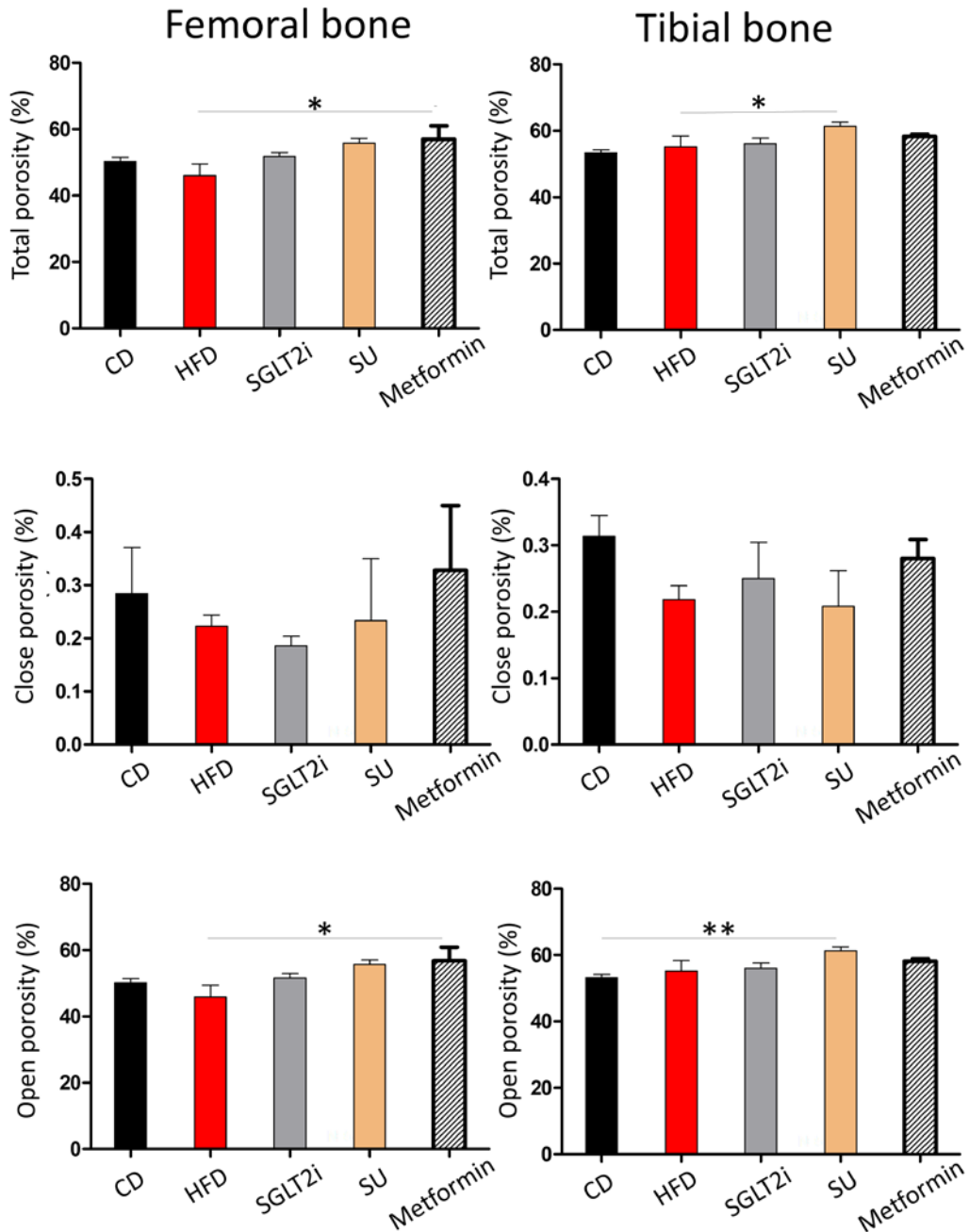


圖三：比較各組小鼠股骨 (左) 和脛骨 (右) 的結構模型指數 (上) 和連通性密度 (下)，結果以平均 ± 標準差來呈現，* 代表 $p < 0.05$ ，** 代表 $p < 0.01$ 。

失有關^{15,16}。在我們的研究中，與 CD 組相比，餵食 HFD 的小鼠更肥胖，骨小樑數量更少，脛骨中的骨小樑結構模型指數更高。這代表 HFD 導致較差的骨微結構。HFD 和 CD 組之間的 BMD 相似，表明 HFD 不會損害骨礦化。

過去，高脂肪飲食引起的肥胖被認為有益於骨骼健康，因為骨量較高，從而導致機械刺

激並降低骨折風險¹⁷。然而，一些研究發現在脛骨中，高脂肪飲食 12 週後，骨小樑 BV/TV、BMD 和數量顯著減少。此外，結構模型指數和小樑間距增加，而小樑厚度沒有變化¹⁸。HFD 誘導的肥胖對骨強度的負面影響，也可以通過骨髓脂肪的增加來解釋，因為骨髓脂肪會引起炎症，導致骨吸收現象增加¹⁹。脂肪細胞



圖四：比較各組小鼠股骨 (左) 和脛骨 (右) 的總孔隙率 (上)、閉合孔隙率 (中) 和開放孔隙率 (下)，結果以平均 ± 標準差來呈現，* 代表 p < 0.05，** 代表 p < 0.01。

誘導的促炎環境與肥胖相關細胞因子 (如 tumor necrosis factor, TNF- α 和 interleukin-6, IL-6) 的增加有關, 從而誘導 RANK-RANKL 信號通路。這會刺激生成破骨細胞^{19,20}。此外, TNF- α 和 IL-6 會阻礙成骨細胞的發育^{19,20}。而體重增加導致脛骨近端的 BV/TV 和連接密度不顯著降低, 而小樑數量、小樑厚度和結構模型指數沒有顯著影響²¹。這些結果顯示肥胖對骨微結構產生有害影響。我們的研究發現, HFD 組脛骨小樑數量減少, 這與之前的研究結果一致。此外, 同組的 HFD 組小樑厚度、小樑骨模式因子和結構模型指數均有所增加。總體而言, 我們的結果確認了 HFD 對骨微結構有負面影響, 但部份骨參數與先前研究的不一致, 這可能是由於各種研究中 HFD 的組成和百分比、飲食干預的年齡、飲食調整的持續時間和肥胖程度的差異。

過去的多項研究顯示二甲雙胍對骨骼有益。二甲雙胍通過調節去卵巢大鼠的 osteoblast markers core binding factor 1 (Cbfa1) 和 LDL 受體相關蛋白 -5 (LDL receptor-related protein 5), 顯著改善受損的骨密度和質量²²。另一項研究表明, 二甲雙胍與 rosiglitazone 合併口服給藥, 可以防止大鼠骨再生、幹骺端小梁面積以及成骨細胞和骨細胞密度的降低²³。二甲雙胍可以通過下調胰島素抵抗, 降低肥胖小鼠的脂肪生成來維持骨密度、拮抗骨質流失和保護骨微結構²⁴。而我們的研究發現磺脲類顯著破壞了骨骼結構。

T2DM 患者骨折的風險增加^{25,26}。有證據顯示, 口服降糖藥可以造成骨密度的降低。越來越多的臨床研究證據證實, TZD 類藥物通過誘導 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ)²⁶⁻²⁸ 降低骨密度, 導致患有第二型糖尿病的停經後婦女的骨折風險增加。一項多中心研究發現, 二甲雙胍可能會降低空腹骨轉換指標, 從而對第二型糖尿病患者的骨骼產生有益影響。這一結果與之前的流行病學研究一致, 這些研究表明服用二甲雙胍的患者骨折風險降低^{29,30}。多項研究還發現, 它還可以增強基質細胞分化成骨細胞的³¹, 並且抑制破骨細胞活性³², 以及減少骨細胞凋亡³³。然而,

仍有一些研究結果發現二甲雙胍不會影響骨格^{34,35}。因此, 需要進一步研究以確定二甲雙胍在骨代謝中的潛在作用。

又者, 某些研究發現, 磺脲類藥物的使用與骨折風險增加有關³⁵。然而, 磺脲類藥物的臨床效應尚未確定, 因為也有一些研究表明它降低了骨折的風險^{29,36}。但是我們的研究發現, 磺脲類藥物顯著破壞了飲食誘導肥胖小鼠的骨骼結構, 當然我們需要更多的研究來確定磺脲類藥物對 T2DM 患者骨結構的影響。另一方面, canagliflozin 心血管評估研究試驗發現骨折和截肢的風險顯著增加³⁷。而在我們的研究結果中, empagliflozin 對骨骼結構具有中性影響。因此, 需要確定 SGLT2 抑制劑的可能作用。需要進一步的研究來確定這些藥物對骨骼結構的長期影響。

與一般食物組相比較, 高脂肪高蔗糖飲食組之脛骨的骨微結構下降更多。在 SU 組中觀察到對骨微觀結構的更多不利影響。當然本研究有幾個局限性。首先, 肥胖小鼠和糖尿病小鼠的發現可能不同。其次, 由於本研究僅關注骨骼結構, 因此未檢查骨轉換標記。第三, 我們的研究持續時間僅為 6 個月。骨骼結構的變化僅在 12 個月後確定。儘管抗糖尿病藥物並未顯著逆轉高脂肪高蔗糖飲食對骨微結構的不利影響, 但我們的研究結果卻也顯示, 二甲雙胍和 empagliflozin 對骨骼健康的影響是中性的。

誌謝

本研究由高雄長庚紀念醫院 (計畫編號: CMRPG8F0941, CMRPG8F0942, 和 CMRPG8H1211) 支持。感謝高雄長庚紀念醫院生物統計中心提供之統計諮詢服務, 使本研究得以順利完成。

利益衝突

本研究及作者群並無涉及任何利益衝突關係。

參考文獻

1. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030

- and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract* 2019;157:107843.
- Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of type 2 diabetes—global burden of disease and forecasted trends. *J Epidemiol Glob Health* 2020;10(1):107-11.
 - Moseley KF. Type 2 diabetes and bone fractures. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19(2):128-35.
 - Leslie WD, Rubin MR, Schwartz AV, Kanis JA. Type 2 diabetes and bone. *J Bone Miner Res* 2012;27(11):2231-37.
 - Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *J Bone Miner Res* 2009;24(4):702-9.
 - Viscoli CM, Inzucchi SE, Young LH, Insogna KL, Conwit R, Furie KL, et al. Pioglitazone and risk for bone fracture: safety data from a randomized clinical trial. *J Crin Endocrinol Metab* 2017;102(3):914-22.
 - Billington EO, Grey A, Bolland MJ. The effect of thiazolidinediones on bone mineral density and bone turnover: systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 2015;58(10):2238-46.
 - Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 2006;355(23):2427-43.
 - Association AD. 4. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* 2020;43(Suppl 1):S37.
 - Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, et al. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2017;377(7):644-57.
 - Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, et al. Canagliflozin and renal outcomes in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2019;380(24):2295-306.
 - Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2015;373(22):2117-28.
 - Furtado RH, Bonaca MP, Raz I, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and previous myocardial infarction: subanalysis from the DECLARE-TIMI 58 trial. *Circulation* 2019;139(22):2516-27.
 - Tian L, Yu X. Fat, sugar, and bone health: A complex relationship. *Nutrients* 2017;9(5):506.
 - Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1468-86.
 - Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano H-JA, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. *Sports Med* 2014;44(1):37-53.
 - Malvi P, Piprode V, Chaube B, et al. High fat diet promotes achievement of peak bone mass in young rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;455(1-2):133-38.
 - Scheller EL, Khoury B, Moller KL, et al. Changes in skeletal integrity and marrow adiposity during high-fat diet and after weight loss. *Front Endocrinol* 2016;7:102.
 - Savvidis C, Tournis S, Dede AD. Obesity and bone metabolism. *Hormones* 2018;17(2):205-17.
 - Wang T, He C. TNF- α and IL-6: The Link between Immune and Bone System. *Curr Drug Targets* 2020;21(3):213-27.
 - Cao JJ, Gregoire BR. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. *Nutr Res* 2016;36(4):320-27.
 - Gao Y, Li Y, Xue J, Jia Y, Hu J. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol* 2010;635(1-3):231-36.
 - Sedlinsky C, Molinuevo MS, Cortizo AM, et al. Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol* 2011;668(3):477-85.
 - Wang C, Li H, Chen SG, et al. The skeletal effects of thiazolidinedione and metformin on insulin-resistant mice. *J Bone Miner Metab* 2012;30(6):630-37.
 - Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—A meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18(4):427-44.
 - Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *J Bone Miner Res* 2009;24(4):702-9.
 - Dormuth CR, Carney G, Carleton B, Bassett K, Wright JM. Thiazolidinediones and fractures in men and women. *Arch Intern Med* 2009;169(15):1395-402.
 - Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, Jick SS, Jick H, Meier CR. Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med* 2008;168(8):820-25.
 - Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde LJD. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia* 2005;48(7):1292-99.
 - Melton III LJ, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla SJ. Research M. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *J Bone Miner Res* 2008;23(8):1334-42.
 - Gao Y, Xue J, Li X, Jia Y, Hu J. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. *J Pharm Pharmacol* 2008;60(12):1695-700.
 - Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375(3):414-19.
 - Felice JI, Schurman L, McCarthy AD, Sedlinsky C, Aguirre JI, Cortizo AM. Effects of fructose-induced metabolic syndrome on rat skeletal cells and tissue, and their responses to metformin treatment. *Diabetes Res Clin Pract* 2017;126:202-13.
 - Jeyabalan J, Viollet B, Smitham P, Ellis SA, Zaman G, Bardin C. The anti-diabetic drug metformin does not affect bone mass in vivo or fracture healing. *Osteoporos Int* 2013;24(10):2659-70.
 - Napoli N, Strotmeyer ES, Ensrud KE, et al. Fracture risk in diabetic elderly men: the MrOS study. *Diabetologia*

2014;57(10):2057-65.

36. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Sugimoto T. Relationship between treatments with insulin and oral hypoglycemic agents versus the presence of vertebral fractures in type 2 diabetes mellitus. *J Bone Miner Metab* 2010;28(5):554-60.

37. Mahaffey KW, Neal B, Perkovic V, et al. Canagliflozin for primary and secondary prevention of cardiovascular events: results from the CANVAS program (Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study). *Circulation* 2018;137(4):323-34.

The Interval Change of Bone Marrow Density and Bone Microstructure after Oral Antidiabetic Drug Treatment in Diet-induced Obesity Mice

Yvonne Ee Wern Chiew, Cheng-Feng Tsao, and Jung-Fu Chen

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine,
Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital;
College of Medicine, Chang Gung University*

This study aimed to identify the effects of oral antidiabetic drugs on bone microstructure in diet-induced obese mice. Male C57BL/6J mice were fed a chow diet (chow diet, CD; 11% energy as fat) for 1 month and were divided into five groups: (1) CD, (2) high-fat high-sucrose diet (HFD; 58% energy as fat), (3) HFD with SGLT2 inhibitors (SGLT2i; empagliflozin), (4) HFD with sulfonylurea (SU; glimepiride), and (5) HFD with metformin. Various bone parameters were compared and analyzed. After intake of oral antidiabetic agents, BMD of the femur decreased in the SU group (in comparison with CD), along with the tibia's BV/TV, trabecular number, and thickness. The SU group (in comparison with HFD) had lower BV/TV and less trabecular thickness in the femur but had greater total porosity of the tibia. The metformin group (in comparison with CD) had a lower trabecular thickness and number of the tibia and a higher structure model index. Compared with the HFD group, it had decreased BV/TV but increased total and open porosity of the femur. The trabecular thickness of the tibia in the empagliflozin group decreased (in comparison with CD group). No significant changes (empagliflozin vs. HFD) in other bone parameters were noted. The tibia bone microarchitecture was more damaged in the HFD group than in the CD group. SU significantly decreased trabecular bone microarchitecture and BMD. (*J Intern Med Taiwan* 2021; 32: 289-296)