◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Sep; 31(9): 1193-1199

依伏卡塞衍生物对糖尿病性骨质疏松的改善和促成骨作用

陈美轩[1]，刘　凯[2]，徐　源[1]，华　圆[2]，郭怡洵[1]，张　恺[3]，张　岩[1]

[1]上海中医药大学附属龙华医院脊柱病研究所，上海 200032；
[2]仁合益康集团有限公司，石家庄 050035，河北；
[3]河北医科大学药学院，石家庄 050017，河北

摘要　**目的：**评估钙敏感受体（CaSR）激动剂依伏卡塞衍生物对糖尿病小鼠骨质疏松的改善作用及其促成骨作用。**方法：**C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组、模型组、依伏卡塞衍生物组。采用高脂饮食结合腹腔低剂量注射链脲佐菌素（30 mg/kg）的方法，建立 2 型糖尿病（T2DM）小鼠模型。治疗组每天灌胃给予以 0.5%CMC-Na 为溶剂的依伏卡塞衍生物（0.6 mg/kg），其余组给予等量 0.5%CMC-Na 溶液，连续 6 周，给药期间以 2 周为间隔动态监测小鼠体质量和空腹血糖。检测各组小鼠血清钙（Ca）、磷（Pi）含量，采用微焦点定量 CT（Micro-CT）检测小鼠骨密度和骨微结构，通过三点弯曲生物力学检测小鼠股骨中段力学参数，使用 HE 染色、ALP 染色检测骨组织形态学与成骨细胞，并通过 Western blot 检测 CaSR 下游分子及成骨相关分子的蛋白表达。**结果：**依伏卡塞衍生物干预后，小鼠血清中 Ca、Pi 含量明显降低（P<0.05）；Micro-CT 检测分析显示，小鼠胫骨近端骨密度明显增加（P<0.05），骨小梁间隙明显减小（P<0.001），骨小梁厚度明显增加（P<0.05），并且，骨小梁面积百分比明显增加（P<0.05）；生物力学测试表明，小鼠股骨中段的最大载荷、最大变形和弹性变形都显著增加（P<0.05）；相对于模型组，给药组的成骨细胞数量显著增加（P<0.01）；Western blot 结果显示，依伏卡塞衍生物显著升高 T2DM 小鼠骨组织 p-ERK/ERK 表达比值（P<0.001），上调 Runx2 和 COL-Ⅰ的蛋白表达（P<0.05）。**结论：**新一代拟钙剂依伏卡塞衍生物通过直接作用于骨骼 CaSR，进而激活其下游 ERK/Runx2/COL-Ⅰ信号通路，发挥促成骨作用，改善糖尿病性骨质疏松。

关键词　糖尿病性骨质疏松；依伏卡塞衍生物；骨骼；成骨分化

中图分类号：R965.2
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)09-1193-07
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.09.005

钙敏感受体（calcium-sensing receptor, CaSR），是一种对钙离子高度敏感的 G 蛋白偶联受体，主要在甲状旁腺和肾脏中高表达，同时也广泛分布于骨骼，维持人体内钙平衡[1]。在高糖环境下，骨微环境中的钙离子稳态常遭到破坏，骨质量严重下降，骨折风险显著增加[2]。研究发现，高糖环境中成骨细胞表面的 CaSR 表达受抑，导致骨组织对矿化信号的感知力减弱[3]，这可能是糖尿病性骨质疏松（diabetic osteoporosis, DOP）骨形成动力不足的核心环节之一。目前已发现，拟钙剂（CaSR 激动剂）在临床上通过系统性抑制甲状旁腺激素（PTH）水平可间接发挥骨保护作用[4]，另有一项荟萃分析发现拟钙剂的使用显著降低了骨折发生率[5]，而其对骨组织局部 CaSR 信号及其下游的调控作用尚未被充分挖掘。基础研究已证实，成骨细胞表达有功能性钙敏感受体，因此，探讨拟钙剂对骨组织的直接药理作用，正在成为该领域一个新的研究热点。本课题旨在研究新一代拟钙剂依伏卡塞衍生物能否通过直接激活成骨细胞表

2026-03-20 收稿　2026-05-12 修回
河北省创新能力提升计划项目——高水平人才团队建设专项（244A7615D）；河北省慢性肾病治疗药物开发重点实验室（SZQ202506）；河北省高等学校科学研究产学研合作项目（CXZX2025017）；上海中医药大学附属龙华医院“龙医学者”临床科技创新计划（KC2026009）；科技创新基础研究项目（CX202512）
陈美轩，女，硕士，研究方向：药理学。
E-mail: 15103225033@163.com
张恺，共同通信作者，教授，博士生导师，研究方向：药物化学。
E-mail:18100956@hebmu.edu.cn
张岩，通信作者，研究员，博士生导师，研究方向：药理学。
E-mail: medicineyan@aliyun.com

面的 CaSR来改善骨代谢，从而为 DOP 的治疗提供新思路。

1　材料与方法

1.1　实验动物　16 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 27 只，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司，饲养于上海中医药大学附属龙华医院 SPF 级实验动物房（湿度 55%，温度 25 ℃）。本项研究由上海中医药大学附属龙华医院伦理委员会审核与批准（批准号：LHERAW-26024）。

1.2　药物与试剂　依伏卡塞衍生物（名称：RHYK1005，批号：182-3-240925-1，相对分子质量：392.47，由仁合益康集团新药研发河北有限公司研发合成部提供，化合物结构如 Fig.1）；链脲佐菌素（streptozotocin，STZ）（V900890，Sigma）；钙（Ca）试剂盒（0150-250，STANBIO LABORATORY）；磷（Pi）试剂盒（C006-2-1，南京建成生物工程研究所）；苏木素（G1004，Servicebio）；伊红（G1002，Servicebio）；苏木素分化液（G1039，Servicebio）；苏木素返蓝液（G1040，Servicebio）；p-ERK1/2 一抗（4370T，Cell Signaling），ERK1/2 一抗（4695T，Cell Signaling），Runx2 一抗（ab236639，Abcam），COL-Ⅰ一抗（66761-1-Ig，Proteintech），β-tubulin 一抗（10094-1-AP，Proteintech）；山羊抗兔 IgG（H+L）（A0208，碧云天生物技术有限公司）、山羊抗小鼠 IgG（H+L）（A0216，碧云天生物技术有限公司）；RIPA 裂解液（强）（P0013B，碧云天生物技术有限公司）；BCA 蛋白浓度测定试剂盒（P0012S，碧云天生物技术有限公司）；无蛋白快速封闭液（PS108P，雅酶）；特超敏 ECL 发光液（MA0186-2，MeilunBio）。

1.3　仪器　血糖仪（稳悦）；生物力学检测仪[ElectroForce3200，美国 TA（BOSE）]；全片扫描仪（VS200，日本 Evident）；组织脱水机（TP1020，德国 Leica），石蜡包埋机（EG1150，德国 Leica）和转轮式切片机（RM2135，德国 Leica）；酶标仪（Cytation3，美国 Bio Tek）；纯水仪（W3T262974，德国 ThinkLab）；高速冷冻离心机（75002445，美国 Thermo Fisher Scientific）；蛋白印迹电泳系统（731BR01657，美国 Bio-Rad）；凝胶成像系统（ChemicDoc，美国 Bio-Rad）；显微 CT 成像系统（Quantum GX2，美国 PerkinElmer）。

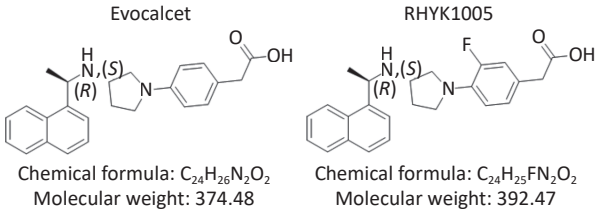


Fig.1　Chemical structures of evocalcet and its derivative

1.4　动物分组与模型制备　27 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组：正常对照组（Control）、模型组（Model）、依伏卡塞衍生物组（Evo-D）。通过先高脂饮食 5 周，再连续 4 d 腹腔注射 STZ 30 mg/kg 进行 2 型糖尿病（T2DM）造模[6]。1 周之后，治疗组每天灌胃给予以 0.5%CMC-Na 为溶剂的依伏卡塞衍生物（0.6 mg/kg），其余组给予等量 0.5%CMC-Na 溶液，连续给药 6 周。给药期间，以 2 周为间隔，动态监测小鼠体质量和空腹血糖（Fig.2）。正常对照组小鼠以低脂饲料[LFD（10%Kcal），D12450J，Research Diets Inc]喂养，其余两组小鼠以高脂饲料[HFD（60%Kcal），D12492，Research Diets Inc]喂养。

1.5　血清收集　小鼠用戊巴比妥钠（70 mg/kg）腹腔注射麻醉，眼球取血。收集血液后，4 ℃ 静置 3 h，3 000 r/min 离心 10 min；血清分装于 EP 管中，−80 ℃ 冻存备用。

1.6　骨标本收集　取小鼠双侧的股骨和胫骨。右股骨用浸湿生理盐水的纱布包裹，用作生物力学检测；左股骨−80 ℃ 冻存，用作 Western blot 检测。两侧胫骨放入组织固定液中，右胫骨用作微焦点定量 CT（Micro-CT）检测，左胫骨经脱钙处理

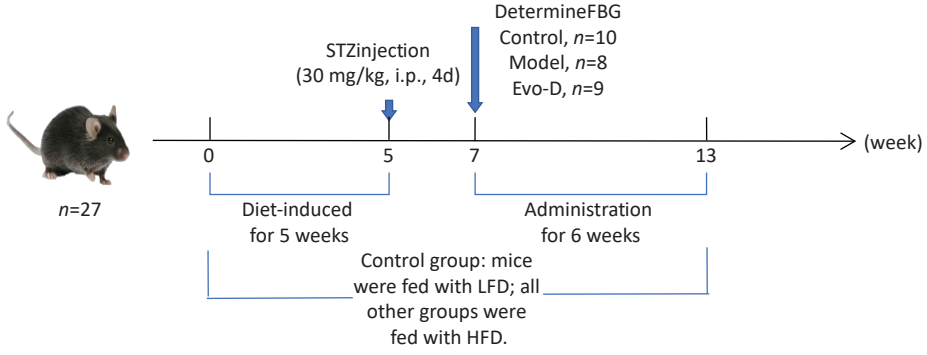


Fig.2　Experimental timeline

后制备石蜡切片，用作组织形态染色。

1.7　血清 Ca、Pi 含量检测　血清中 Ca、Pi 含量分别采用钙测定试剂盒（比色法）和磷测定试剂盒（磷钼酸法）测定，检测步骤按照试剂盒说明书进行操作。

1.8　Micro-CT 扫描和三维重建　通过高分辨率 Micro-CT 系统，对小鼠胫骨近端进行显微结构分析；采用固定阈值法对骨小梁结构进行识别，并重建三维显微结构图像；使用配套内置分析软件定量评估以下骨微结构参数：（1）骨密度（BMD）；（2）骨体积分数（BV/TV）；（3）骨小梁数量（Tb.N）；（4）骨小梁间隙（Tb.Sp）；（5）骨小梁厚度（Tb.Th）；（6）骨小梁连通性（Conn.D）。

1.9　股骨力学检测　将右股骨样本置于生物力学检测仪支撑点上，以横截面为准，设置中段生物力学性能检测参数为支撑跨距 3.26 mm，加载速率 0.2 mm/min，在股骨中段施加垂直载荷直至断裂；过程实时记录载荷-变形曲线，并获得以下生物力学参数：（1）最大载荷（N）；（2）弹性载荷（N）；（3）最大应力（MPa）；（4）弹性应力（MPa）；（5）最大变形（mm）；（6）弹性变形（mm）；（7）弹性模量（MPa）。

1.10　胫骨组织形态染色　左胫骨剔除软组织后，使用中性缓冲福尔马林（10%）固定 24 h；EDTA 溶液（10%）脱钙至针尖可无阻力刺入，流水冲洗 1 h；梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋，制备 3 μm 切片，进行 HE 染色、ALP 染色，通过全片扫描仪观察胫骨近端骨小梁、成骨细胞。

1.11　Western blot 实验　使用 RIPA 裂解液将左股骨研磨提取蛋白，BCA 法检测蛋白浓度，煮沸变性后−20 ℃ 保存；等量的蛋白样本经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，转至 PVDF 膜上；应用快速封闭液室温封闭 15 min，再经目的蛋白一抗 4 ℃ 摇床孵育过夜，第二天使用山羊抗兔或小鼠 IgG-辣根过氧化物酶二抗，室温孵育 1 h；通过凝胶成像系统检测目的蛋白，采用 Image J 图像分析软件进行灰度值分析，以 β-tubulin 为内参校正蛋白表达水平。

1.12　统计学方法　实验数据采用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析及图表绘制，统计结果采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）进行表示。所有数据采用 *t* 检验进行统计分析，$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　DOP 小鼠体质量与空腹血糖变化　药物治疗期间各组小鼠体质量逐渐增加。模型组小鼠在治疗第 6 周时，体质量明显高于非糖尿病组（Fig.3A，$P<0.05$）。模型组小鼠在治疗第 0、2、4、6 周时，空腹血糖水平明显高于非糖尿病组（Fig.3B，$P<0.01$）。相较于模型组，衍生物组小鼠在实验期间，体质量和空腹血糖水平均无显著变化。

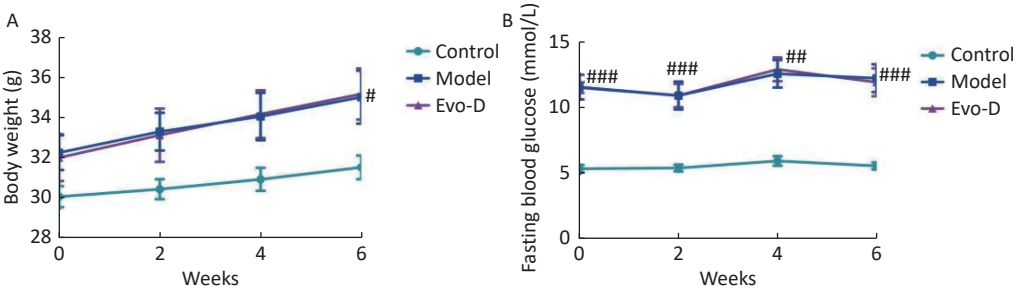


Fig.3　Changes in body weight and fasting blood glucose of mice

A: body weight; B: fasting blood glucose; $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$, compared with control group.

2.2　Evo-D 降低 DOP 小鼠血清中 Ca、Pi 含量　模型组小鼠血清 Ca（Fig.4A，$P<0.001$）、Pi（Fig.4B，$P<0.01$）水平均明显高于非糖尿病组。相比于模型组，衍生物组血清 Ca、Pi 水平均显著降低（$P<0.05$）。

2.3　Evo-D 改善 DOP 小鼠骨密度和骨微结构　从 Micro-CT 三维重构图可以看出（Fig.5A），模型组小鼠胫骨近端松质骨变得稀疏，经过衍生物干预后得到改善。如 Fig.5B 所示，模型组小鼠骨密度低于正常对照组，Evo-D 组骨密度较模型小鼠显著升高（$P<0.05$）。糖尿病小鼠骨体积分数和骨小梁厚度均显著低于正常对照组（$P<0.01$），骨小梁连通密度和骨小梁数量也均显著低于非糖尿病组（$P<0.05$），而骨小梁间隙显著高于正常对照组（$P<0.01$）。相比于模型组，经 Evo-D 干预给药后，小鼠骨小梁厚度明显增加（$P<0.05$），骨小梁间隙显著减小（$P<0.001$）。

2.4　Evo-D 提高 DOP 小鼠骨强度　如 Fig.6 所示，模型组小鼠较正常对照组，股骨中段的最大载荷、弹性模量显著减小（$P<0.001$），最大应力明显

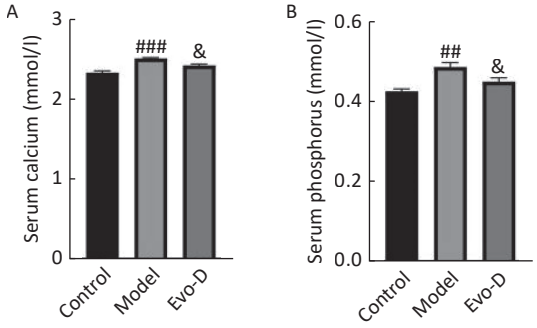


Fig.4 Ca and Pi levels in serum of mice

A: serum calcium level; B: serum phosphorus level; $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.001, compared with control group; $^{\&}P$<0.05, compared with model group.

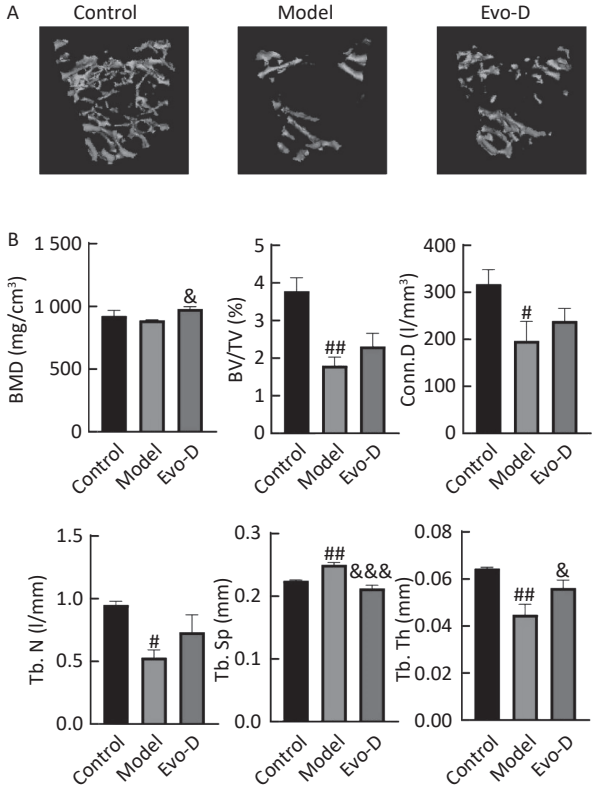


Fig.5 Bone mineral density, structural parameters, and three-dimensional architecture of trabecular bone at the proximal tibia

A: 3D structure of trabecular bone; B: biological parameters of trabecular bone $^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01, compared with control group; $^{\&}P$<0.05,$^{\&\&\&}P$<0.001, compared with model group.

降低(P<0.01)，弹性载荷和弹性变形显著减少(P<0.05)。衍生物给药组小鼠较模型组，最大载荷、最大变形和弹性变形显著提高且差异具有统计学意义(P<0.05)。

2.5 Evo-D 增加 DOP 小鼠骨小梁面积百分比

与正常对照组相比，模型组小鼠骨小梁数量减少、间隙增大、排列稀疏、网织结构破坏明显，骨

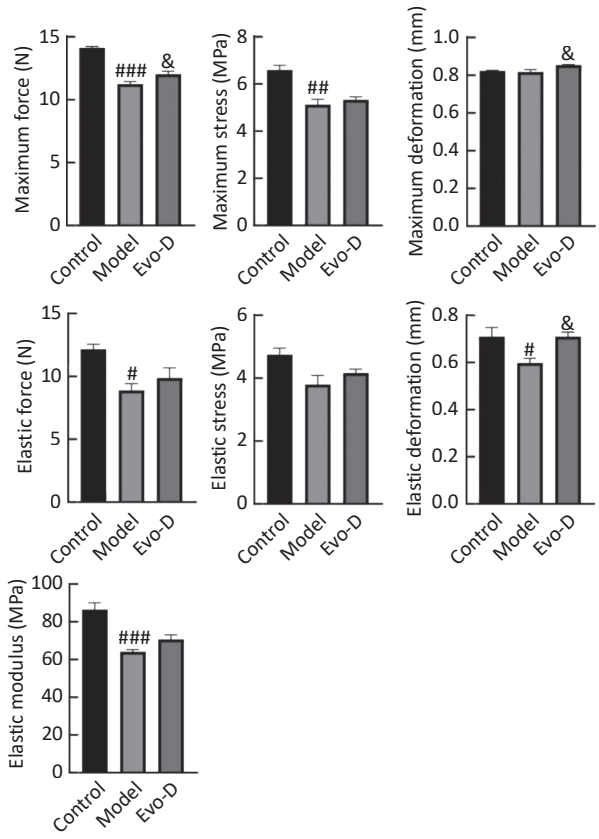


Fig.6 Mechanical parameters of the mid-shaft femur

$^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01, $^{\#\#\#}P$<0.001, compared with control group; $^{\&}P$<0.05, compared with model group.

髓腔内脂肪空泡增多(Fig.7A)，定量结果显示骨小梁面积百分比较正常对照组显著降低(Fig.7B, P<0.001)，在衍生物干预后，DOP 小鼠骨小梁面积百分比显著升高(P<0.05)。

2.6 Evo-D 改善 DOP 小鼠胫骨近端成骨细胞数量

ALP 染色(Fig.8A)定量结果表明，相比于正常对照组，模型组小鼠胫骨近端 ALP 染色阳性的成骨细胞数量显著减少(Fig.8B, P<0.001)。经依伏卡塞衍生物 Evo-D 干预给药后，DOP 小鼠成骨细胞数量显著增加(P<0.01)。

2.7 Evo-D 上调 DOP 小鼠成骨分化相关蛋白表达

应用 Western blot 检测 CaSR 下游信号蛋白与促成骨因子的表达水平(Fig.9A-C)。与正常对照组相比，模型组骨组织 ERK1/2 蛋白磷酸化水平明显下调(Fig.9D, P<0.001)，Evo-D 能够提高 DOP 小鼠骨组织 p-ERK1/2 与 ERK1/2 表达比值(P<0.001)。相较正常对照组，DOP 小鼠骨组织中 Runx2、COL-Ⅰ蛋白表达显著降低(P<0.01)，Evo-D 显著上调 Runx2 表达(P<0.05)及 COL-Ⅰ表达(P<0.05)。

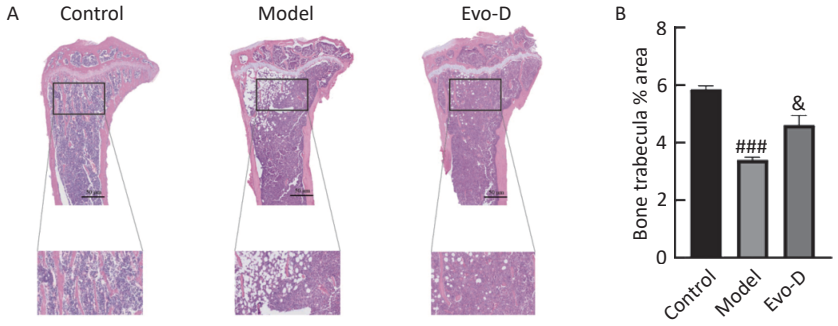


Fig.7　HE staining of the proximal tibia

A: HE staining; B: area percentage of trabecular bone; $^{###}P$<0.001, compared with control group; $^{\&}P$<0.05, compared with model group.

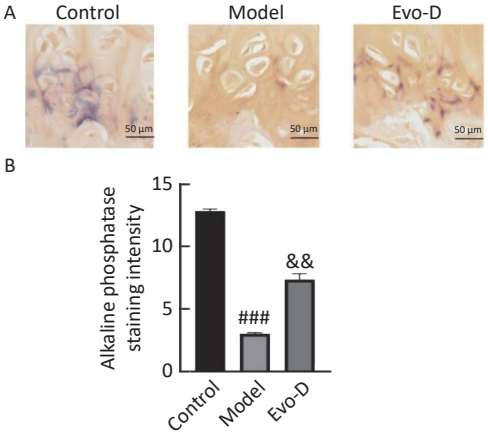


Fig.8　ALP staining of the proximal tibia

A: ALP staining; B: ALP staining-positive intensity; $^{###}P$<0.001, compared with control group; $^{\&\&}P$<0.01, compared with model group.

3　讨论

DOP 是一种持续威胁糖尿病患者骨骼健康的主要并发症，表现为骨微结构异常和骨骼强度降低[7]。研究显示[8]，高达 69.6% 的 2 型糖尿病患者合并骨质疏松症。针对这一庞大的患病群体，如何有效预防及逆转骨微结构的破坏，已成为当前临床防治工作中亟待解决的问题。在高糖环境下，机体长期处于慢性代谢应激状态，产生大量的氧化应激产物、糖基化终产物，并分泌多种促炎细胞因子[9]。这种复杂的糖毒性微环境会抑制成骨细胞活性与矿化能力[10]。

CaSR 参与系统性钙稳态的调节，拟钙剂作为 CaSR 的激动剂或正向变构调节剂，能够有效抑制甲状旁腺激素的释放，同时促进钙离子从肾脏排

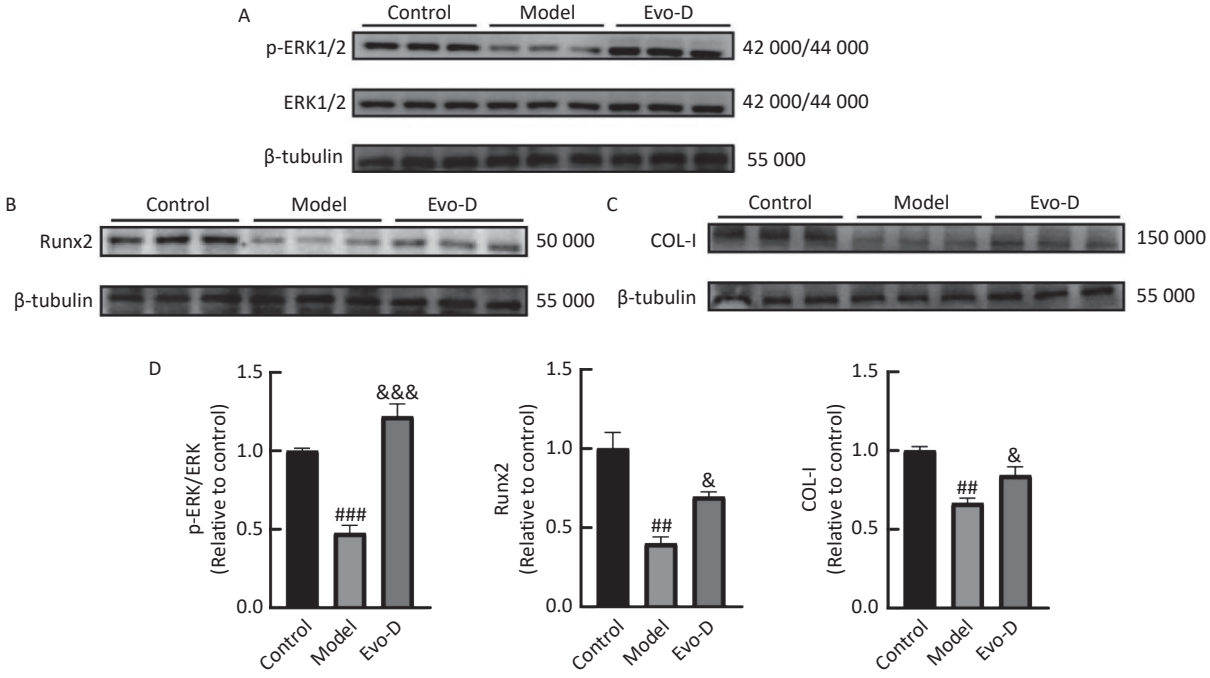


Fig.9　Protein expression of osteogenic factors in femur

A-C: immunoblotting detection; D: quantitative expression of proteins; $^{##}P$<0.01, $^{###}P$<0.001, compared with control group; $^{\&}P$<0.05, $^{\&\&\&}P$<0.001, compared with model group.

出[11]，这也是本研究中拟钙剂依伏卡塞衍生物干预后，DOP 小鼠血清钙水平下降的主要原因，提示该依伏卡塞衍生物对 2 型糖尿病出现的高血钙现象有较好的获益。

CaSR 信号通路的调控在骨形成过程中发挥着重要作用[12]，因此可作为治疗某些骨骼和矿物质代谢异常疾病的靶点[13]，提供潜在的治疗策略。有研究表明，成骨细胞的增殖与分化以及骨基质的生成，都高度依赖于 CaSR 的介导作用[14]。因此，以激活 CaSR 为研究方向，增强骨重塑过程，从而有效降低糖尿病患者的骨折风险并改善其生活质量，有望为临床逆转糖尿病引起的骨形成障碍提供新途径。

ERK1/2 作为丝裂原活化蛋白激酶家族的重要成员，其磷酸化水平可反映 CaSR 的活性[15]，是成骨细胞分化和基质合成的关键调节者[16]。在 DOP 小鼠中该蛋白的磷酸化表达水平下降，说明高糖环境下 CaSR 敏感性降低可能是成骨形成障碍的原因之一。ERK1/2 通过磷酸化促进下游信号 Runx2 的表达，增强其转录活性并启动多种成骨相关靶基因的表达，从而在骨形成与细胞外基质矿化过程中发挥着关键的调控作用[17-18]。比如，在机械牵拉诱导成骨模型中，使用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 处理细胞后，Runx2 表达受到抑制，最终导致成骨分化受阻[19]。COL-Ⅰ是骨基质的主要结构成分，其表达上调表示骨基质合成增加[20]。实验结果证实，依伏卡塞衍生物干预后，小鼠骨组织 ERK1/2 磷酸化水平升高，促使 Runx2 信号上调，最终引起 COL-Ⅰ的表达增加，这一系列增强的成骨信号促使骨密度提高、骨小梁增加、力学强度增强，从而骨量和骨质量得到显著改善。

综上，本研究表明新一代拟钙剂依伏卡塞衍生物能够通过直接作用于骨组织 CaSR，进而激活 ERK/Runx2/COL-Ⅰ信号通路，发挥促成骨作用，从而改善高糖诱导下的骨质疏松症。本文通过探究新一代拟钙剂依伏卡塞衍生物防治 DOP 的作用与机制，旨在为其在 DOP 靶向性治疗的临床应用提供一定实验依据。

参考文献

[1] Hannan FM, Kallay E, Chang W, et al. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and non-calcitropic diseases [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 15(1): 33-51.

[2] Upadhyay P, Kumar S. Diabetes and bone health: a comprehensive review of impacts and mechanisms [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2025, 1(5): e70062.

[3] Shahen VA, Schindeler A, Rybchyn MS, et al. Rescue of high glucose impairment of cultured human osteoblasts using cinacalcet and parathyroid hormone [J]. Calcif Tissue Int, 2023, 112(4): 452-462.

[4] 左力, 甘良英. 拟钙剂治疗维持性血液透析患者继发性甲状旁腺功能亢进症的中国专家共识 (2024 版) [J]. 中国血液净化, 2024, 23(10): 721-735.

[5] Wakamatsu T, Yamamoto S, Matsuo K, et al. Effectiveness of calcimimetics on fractures in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism: meta-analysis of randomized trials [J]. J Bone Miner Metab, 2024, 42(3): 316-325.

[6] Racine KC, Iglesias-Carres L, Herring JA, et al. The high-fat diet and low-dose streptozotocin type-2 diabetes model induces hyperinsulinemia and insulin resistance in male but not female C57BL/6J mice [J]. Nutr Res, 2024, 131: 135-146.

[7] Chen Y, Zhao W, Hu A, et al. Type 2 diabetic mellitus related osteoporosis: focusing on ferroptosis [J]. J Transl Med, 2024, 22(4): 409.

[8] International Osteoporosis Foundation. Facts and statistics[EB/OL]. (2024)[2026-08-21]. https://www.osteoporosis.foundation/facts-statistics[reference:3][reference:4].

[9] Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 119.

[10] Sha NN, Zhang JL, Poon CC, et al. Differential responses of bone to angiotensin II and angiotensin(1-7): beneficial effects of ANG(1-7) on bone with exposure to high glucose [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 320(1): E55-E70.

[11] Trivedi R, Mithal A, Chattopadhyay N. Recent updates on the calcium-sensing receptor as a drug target [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(2): 178-186.

[12] Cianferotti L, Gomes AR, Fabbri S, et al. The calcium-sensing receptor in bone metabolism: from bench to bedside and back [J]. Osteoporos Int, 2015, 26(8): 2055-2071.

[13] Nemeth EF, Shoback D. Calcimimetic and calcilytic drugs for treating bone and mineral-related disorders [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013, 27(3): 373-384.

[14] Goltzman D, Hendy GN. The calcium-sensing receptor in bone--mechanistic and therapeutic insights [J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(5): 298-307.

[15] Mingione A, Maruca K, Chiappori F, et al. High parathyroid hormone concentration in tenofovir-treated patients are due to inhibition of calcium-sensing receptor activity [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97: 969-974.

[16] Wang X, Wang G, Liu L, et al. The mechanism of a chi-

tosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 39322.
[17] Greenblatt MB, Shim JH, Glimcher LH. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2013, 29: 63-79.
[18] Park KR, Lee JY, Cho M, et al. Ziyuglycoside I upregulates RUNX2 through ERK1/2 in promoting osteoblast differentiation and bone mineralization [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(4): 883-900.
[19] Fan X, Rahnert JA, Murphy TC, et al. Response to mechanical strain in an immortalized pre-osteoblast cell is dependent on ERK1/2 [J]. J Cell Physiol, 2006, 207(2): 454-460.
[20] Kim DS, Bae SK, Kwak YJ, et al. Osteogenic potential of osteolforte: Gene and protein-level evaluation in human bone marrow stromal cells [J]. Curr Issues Mol Biol, 2025, 47(8): 588.

Evocalcet derivative attenuates diabetic osteoporosis and promotes osteogenesis

CHEN Meixuan[1], LIU Kai[2], XU Yuan[1], HUA Yuan[2], GUO Yixun[1], ZHANG Kai[3], ZHANG Yan[1]

[1] Spinal Disease Research Institute, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; [2] Renheyikang Group Co., Ltd, Shijiazhuang 050035, Hebei, China; [3] College of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

ABSTRACT **AIM**: To evaluate the ameliorative effect of calcium-sensing receptor (CaSR) agonist evocalcet derivative on osteoporosis in diabetic mice and its stimulative effect on osteogenesis. **METHODS**: The C57BL/6 mice were randomly divided into a normal control group, a model group, and an evocalcet derivative group. A type 2 diabetes mellitus (T2DM) mouse model was established by a high-fat diet combined with intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin (30 mg/kg). The mice in the treatment group were daily administered with an evocalcet derivative (0.6 mg/kg, i.g.) in 0.5% CMC-Na solution, while the mice in other groups were administered with an equal volume of 0.5% CMC-Na solution for 6 weeks. During the administration period, the body weight and the fasting blood glucose levels of the mice were dynamically monitored at 2-week intervals. Serum calcium (Ca) and phosphorus (Pi) levels were measured in each group. Micro-CT was used to detect bone mineral density and bone microstructure, and a three-point bending biomechanics test was performed to detect the mechanical parameters at the mid-shaft of the mice femur. HE staining and ALP staining were respectively used to detect bone histomorphology and osteoblasts, and Western blot was carried out to measure the protein expression of CaSR downstream molecules and osteogenic-related molecules. **RESULTS**: After intervention with an evocalcet derivative, serum Ca and Pi levels in mice were significantly reduced (P<0.05). Micro-CT showed a significant increase in bone mineral density (P<0.05) and in trabecular thickness (P<0.05), and a significant decrease in trabecular bone separation (P<0.001); moreover, the area percentage of trabecular bone was dramatically enhanced (P<0.05) at the proximal end of the mice tibia. Biomechanical tests showed a significant elevation in maximum load, maximum deformation, and elastic deformation (P<0.05) at the diaphysis of the mice femur. As compared to the model group, the drug treatment induced a significant increase (P<0.01) in the number of osteoblasts. The Western blot results showed that the evocalcet derivative elevated the expression ratio of p-ERK/ERK (P<0.001) and upregulated protein expression (P<0.05) of Runx2 and COL-Ⅰ in the bone tissue of T2DM mice. **CONCLUSION**: The new generation calcimimetic agent evocalcet derivative could directly act on CaSR in bone, followed by stimulating its downstream ERK/Runx2/COL-Ⅰ signaling pathway, thereby improving diabetic osteoporosis by exerting its osteogenic effect.

KEYWORDS diabetic osteoporosis; evocalcet derivative; bone; osteoblastic differentiation