

二磷酸盐细胞分子作用机制的研究进展

张众志 陈璐璐 李裕明

二磷酸盐是目前治疗骨代谢性疾病中重要的一类抗骨吸收药物,主要运用于 Paget's 病、骨质疏松症和肿瘤相关性骨病。这类化合物类似焦磷酸盐,对骨矿有高度亲和力,非水解的 P-C-P 基本结构与焦磷酸(P-O-P)显著不同,与 C 原子共价结合的两条侧链通常称为 R1 和 R2。R1 侧链、磷酸根上氧原子和钙原子螯合形成三配位体,决定二磷酸盐能否迅速结合至骨矿表面,抑制骨吸收后骨的矿化过程,过量长期摄入二磷酸盐可引起矿化障碍;R2 侧链是二磷酸盐的关键结构,不同的骨吸收抑制效应与 R2 侧链结构存在明确关联。目前二磷酸盐的作用机制仍未完全清楚,仅以二磷酸盐对骨的亲和力很难解释不同二磷酸盐骨吸收抑制强度的显著差异,这可能是此类化合物存在特异作用靶点,如细胞内某些酶或特定代谢产物,近年来细胞分子学研究使人们对此类药物的作用机制有了更多的认识。

一、对破骨细胞的作用

二磷酸盐作为一种有效的骨吸收抑制剂,主要作用于破骨细胞,影响破骨细胞内某些酶或信号传递。二磷酸盐首先在骨转换活跃区域与羟磷灰石特异结合,局部浓度逐渐升高到一定水平,并依赖于一定的酸性环境,从吸附于破骨细胞下的骨中释放,可能通过胞饮作用或钙络合吞噬作用进入破骨细胞,影响蛋白或膜转运,减少破骨细胞形成,改变细胞的形态结构,降低细胞活性,诱导细胞凋亡^[1]。体内和体外试验都观察到二磷酸盐引起破骨细胞皱状缘缺失这一形态改变,而此细胞膜皱状缘结构是破骨细胞骨吸收过程中分泌酸不可缺少的。

目前一般将二磷酸盐分为含氮和非含氮两类,它们有着不同的分子作用机制。含氮二磷酸盐骨吸收抑制主要是作用于细胞内某些酶,影响破骨细胞内甲羟戊酸途径,抑制蛋白异戊二烯化^[2];此途径生成固醇类产物及合成类异戊二烯二磷酸中间产物,如法呢基二磷酸(FPP)和牻牛儿酰牻牛儿基二磷酸

(GGPP)。这两种产物能催化一些小 GTP 结合蛋白(如 ras, rho, rac 和 rab)转录后修饰,这些带法呢基和牻牛儿酰牻牛儿基的小 GTP 结合蛋白只有被异戊二烯化后,才会定位于细胞膜,然后作为细胞内信号传递物质发挥重要作用。Frith 以 J774 巨噬细胞作为破骨细胞的替代模型,观察到含氮二磷酸盐抑制甲羟戊酸途径中蛋白的异戊二烯化,但加入法呢基二磷酸(FPP)和牻牛儿酰牻牛儿基二磷酸(GGPP)后,含氮二磷酸盐诱导的细胞凋亡能部分被减弱;并且发现含氮二磷酸盐对细胞内蛋白异戊二烯化抑制作用与骨吸收抑制有明确的关联^[3]。Fraser 等研究含氮二磷酸盐(Alendronate, Ibandronate, Pamidronate, Risedronate, Zoledronic acid)对分离的兔破骨细胞的作用,使用能诱导细胞凋亡和半胱氨酸一天冬氨酸特异蛋白酶(Caspase)活化的药物浓度,观察到细胞内标记 14C 甲羟戊酸合成法呢基和牻牛儿酰牻牛儿基蛋白被抑制;另外利用特异牻牛儿酰牻牛儿基转移酶 I 抑制剂 GGTI-298 和法呢基转移酶抑制剂 FTI-277 对比,显示主要是牻牛儿酰牻牛儿基蛋白的减少抑制了破骨细胞的形成,诱导细胞凋亡,破坏细胞内肌动蛋白环。这些结果与 Fisher 等^[4]的研究结果相似,认为含氮二磷酸盐主要是通过减少牻牛儿酰牻牛儿基蛋白形成及抑制蛋白异戊二烯化间接影响破骨细胞的骨架,抑制破骨细胞形成和活性,诱导细胞的凋亡,也即是抑制破骨细胞的骨吸收作用机理^[5]。

FFP 合成酶可能是含氮二磷酸盐作用于甲羟戊酸途径的关键靶分子。含氮二磷酸盐抑制 FFP 合成酶,减少类异戊二烯化底物 FFP 和下游产物 GGPP 形成,导致小的 GTP 结合蛋白的形成和活性受影响,而这些 GTP 结合蛋白对于细胞的形成、活性及凋亡是非常重要的^[6,7]。FFP 合成酶不但对 FFP 和 GGPP 合成有直接作用,研究也显示此酶与纤维刺激生长因子(FGF)介导的细胞内信号传导有关;通过与纤维刺激生长因子受体(FGFR)接合调节 FGF-2 介导的信号传导,影响细胞外信号调节激酶(ERK)

级联反应的下游信号作用^[8]。另外,含氮二膦酸盐也可抑制甲羟戊酸途径其他酶,如异戊二烯基(IPP)异构酶,导致异戊二烯化蛋白合成减少,抑制破骨细胞的骨吸收作用^[9]。含氮二膦酸盐影响破骨细胞内甲羟戊酸合成途径,并激活类 Caspase-3,启动依赖 Caspase 的细胞凋亡;此类二膦酸盐也抑制细胞基质金属蛋白酶(MMP)产生,下调 $\alpha 3$, $\alpha 5$ 整合素,增加护骨素的表达,对抗破骨细胞的骨吸收作用^[10]。

而非含氮二膦酸盐作用机制主要是代谢为非水解 ATP 类似物(AppCP),在细胞内堆积,抑制许多细胞内代谢性酶,起细胞生长抑制和细胞毒性作用,这是与含氮二膦酸盐完全不同的作用机制。Frith 和 Rogers 在研究含氮和非含氮二膦酸盐对破骨细胞的作用时,观察到非含氮二膦酸盐 Clodronate 能削弱含氮二膦酸盐 Alendronate 对破骨细胞内蛋白的异戊二烯化的抑制作用,在 J774 细胞也得到相同结果;而且 Clodronate 阻止 Alendronate 对细胞胞饮作用过程中液体流动的抑制作用,并减少含氮二膦酸盐的细胞摄入,也使 Alendronate 诱导的细胞凋亡减少。但在骨吸收作用上,这两种二膦酸盐未发现有直接对抗作用。尽管非含氮二膦酸盐抑制含氮二膦酸盐对破骨细胞内异戊二烯化作用,但不影响含氮二膦酸盐的骨吸收抑制作用,这可能是由于非含氮二膦酸盐本身有骨吸收抑制作用,通过对含氮二膦酸盐浆膜转运的竞争减少摄入来保持一种平衡^[7]。

二、对成骨细胞的作用

近年来研究发现二膦酸盐可作用于成骨细胞,间接地影响破骨细胞的功能,如通过调节成骨细胞几种细胞因子(IL-6, 护骨素和 RANKL)和未明确的因子来影响破骨细胞的骨吸收作用^[11-13],同时二膦酸盐也可直接影响成骨细胞的分化增殖。Gregory 利用胎儿成骨细胞(hFOB)研究二膦酸盐 Pamidronate 对成骨细胞的作用,结果显示 Pamidronate 降低 hFOB 增殖并呈药物剂量依赖关系;但总细胞蛋白,碱性磷酸酶和 I 型胶原酶都显示增加,通过矿化测定发现骨形成也有所增加。这些结果提示 Pamidronate 主要作用于 hFOB 分化阶段,使细胞成为一种更成熟状态,部分解释了二膦酸盐抑制骨吸收的骨平衡正效应^[14]。对于成骨细胞的增殖也有不同的研究结果,Irina 使用 3 种不同的二膦酸盐(Pamidronate, Olpadronate, Etidronate),均观察到成骨细胞数量增加,其机制可能与细胞外信号调节激酶(ERKs)的激活有关。ERKs 是丝裂素激活蛋白激酶(MARKs)族成员,调节细胞对外部刺激的反应,影响细胞分化和细

胞循环周期。Irina 在研究中运用一种特异 ERK 磷酸化抑制物,发现这种抑制物能减少二膦酸盐诱导的成骨细胞增生;另外也检测到二膦酸盐作用后细胞内 Ca 离子增加,而 ERK 活化也与 Ca 离子内流有关,实验中加入硝苯地平(L 型电压敏感性 Ca 通道抑制剂),二膦酸盐诱导的 ERK 激活被减弱。这些结果提示二膦酸盐诱导细胞外 Ca 离子内流激活 ERKs,导致成骨细胞增殖,影响骨代谢平衡^[15]。L GOMEZ 在研究二膦酸盐对成骨细胞的作用机制时也观察到 Ca 离子通道的作用^[16]。甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)和 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是骨重塑的重要调节因子;PTHrP 主要是缺乏分化的成骨细胞所生成,能促进成骨细胞分化成熟,而 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能抑制 PTHrP 的 mRNA 表达及 PTHrP 分泌。Gomez 的研究显示 Alendronate 既不影响 PTHrP 生成和分泌,也不影响 VitD 受体 mRNA,但 Alendronate 能消除 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导 PTHrP 生成的抑制;同时观察到细胞内 Ca 离子内流增加,Alendronate 这种作用也能被硝苯地平消除。这些结果可以部分解释二膦酸盐对成骨细胞的作用与 Ca 离子内流有关,通过增加 Ca 离子内流影响 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对 PTHrP 的抑制作用^[16],这可能也是二膦酸盐的调节骨代谢的另一种作用机制。

三、对肿瘤细胞的作用

某些肿瘤,如乳腺癌和前列腺癌易转移导致代谢性骨病,诱导局部破骨细胞介导的骨吸收增强。二膦酸盐作为一种骨吸收抑制剂,通过对破骨细胞的作用能减少代谢性骨坏死。近年来研究认为这类药物也能直接作用于肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞的侵入、黏附和迁移,诱导细胞凋亡。Sauna 在研究中利用美伐他汀(Mevastatin),一种 HMG CoA 还原酶抑制剂,发现前列腺肿瘤细胞 PC-3 细胞的侵入和迁移被抑制,而 HMG CoA 还原酶下游甲羟戊酸途径的中间产物能克服这种抑制作用,研究中显示了甲羟戊酸对于肿瘤细胞侵入和迁移的重要性;含氮二膦酸盐如 Alendronate 有相似美伐他汀的效应,对肿瘤细胞侵入的抑制也是通过甲羟戊酸途径所介导,Alendronate 影响 HMG CoA 还原酶反应阶段的下游,PC-3 前列腺肿瘤细胞内蛋白法呢基化和牻牛儿酰牻牛儿基化被 Alendronate 所削弱,而反法呢醇和牻牛儿酰牻牛儿醛却能克服 Alendronate 这种抑制作用^[17]。与之相反,非含氮二膦酸盐 Clodronate 对抗肿瘤细胞侵入和迁移却不能被反法呢醇和牻牛儿酰牻牛儿醛所逆转,所以非含氮二膦酸盐的抗肿瘤细胞作用

可能是由于二磷酸盐在细胞内代谢为非水解 ATP 类似物而影响肿瘤细胞的活性和功能。Sauna 的研究也提到肿瘤细胞产生基质金属蛋白酶(MMP)的改变,此酶对细胞的侵入和黏附有重要作用,PC-3 肿瘤细胞产生较高水平的 MMP-2 和 MMP-9,而经 Alendronate 处理过的 PC-3 细胞产生的 MMP 却没有改变,结果提示二磷酸盐的抗肿瘤细胞作用可能部分与 MMP 有关。类似二磷酸盐作用于破骨细胞内甲羟戊酸途径,小 GTP 蛋白(ras, rho 和 rab)异戊二烯化被抑制,这些 GTP 蛋白对肿瘤细胞骨架的构成,与细胞膜的结合作用,膜胞转运系统及信号传递都有不同的影响。许多研究证实 rho 族 GTP 酶在上皮细胞的迁移和肿瘤细胞的侵入过程中发挥关键作用^[18]。Olivia 研究几种不同二磷酸盐对于人类乳腺癌系细胞 MCF-7、T47D 的作用,结果显示二磷酸盐可直接作用于肿瘤细胞,通过诱导细胞死亡抑制肿瘤细胞生长,其中 MCF-7 细胞增殖的抑制作用可被 Caspase 抑制物所阻止,这可能是二磷酸盐激活 Caspase 系统而诱导细胞凋亡^[19]。

四、其他

近年来研究显示二磷酸盐也具有抗血管生成作用。血管生成在肿瘤生长、风湿性关节炎及器官移植中起重要作用,故对二磷酸盐的这种作用机制的研究也具有了显著意义。破骨细胞介导的骨吸收实际也需要充分的血管生成,与骨吸收有关的基质蛋白、唾液蛋白和骨桥蛋白能刺激血管生成^[20],这显示二磷酸盐抗骨吸收的另一种可能机制。Wood 研究一类新二磷酸盐 Zoledronic acid(ZOL)对于人脐带血管内皮细胞(HUVEC)增殖、迁移和黏附的作用,有纤维生长因子(FGF)或血管内皮生长因子(VEGF)诱导的细胞增殖能被 ZOL 所抑制,并呈剂量依赖关系;ZOL 对 HUVEC 的迁移和黏附也呈双相性调节,低浓度 ZOL 刺激细胞迁移和黏附,而较高浓度起抑制作用,这可能与二磷酸盐影响细胞整合素受体有关;低浓度增加 $\alpha V\beta 3$ 整合素细胞表面表达,而较高浓度显著降低这种表达^[21]。临床研究也有相同结果,合并骨代谢改变的肿瘤患者服用 ZOL 后,血清 VEGF 和血小板源生长因子(PDGF)明显降低^[22]。

不同结构的二磷酸盐产生不同的药物效应,研究中不同的药物浓度也有各异的结果,新的二磷酸盐不断被合成的同时,具有了更强的作用和更广泛的使用范围,人们在利用它的过程中必定会产生更多更新的认识。

参 考 文 献

- 1 Frith JC, Monkkonen J, Auriola S, et al. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation, *in vivo* of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum*, 2001, 44: 2201-2210.
- 2 Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including ras. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 1668-1678.
- 3 Frith JC, Rogers MJ. Antagonistic effects of different classes of bisphosphonates in osteoclasts and macrophages, *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 204-212.
- 4 Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption and kinase activation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 133-138.
- 5 Fraser PC, Miep HH, Robert V, et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 1467-1476.
- 6 Bergstrom JD, Bostedor RG, Masarachia PJ, et al. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 373: 231-241.
- 7 Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase *in vitro* and inhibition of bone resorption *in vivo* by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296: 235-242.
- 8 Reilly JF, Martinez SD, Mickey G, et al. A novel role for farnesyl pyrophosphate synthase in fibroblast growth factor-mediated signal transduction. *Biochem J*, 2002, 366: 501-510.
- 9 Thompson K, Dunford JE, Ebitino FH, et al. Identification of bisphosphonate that inhibits isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290: 869-873.
- 10 Green JR, Clezardil P. Mechanisms of bisphosphonates effects on osteoclasts, tumor cell growth, and metastasis. *Am J Clin Oncol*, 2002, 25: S3-9.
- 11 Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, et al. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol*, 1998, 27: 38-41.
- 12 Viereck V, Emons G, Lauck V, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 680-686.
- 13 Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, et al. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. *Br J Cancer*, 2001, 84: 951-958.
- 14 Gregory GR, Barbara G, Larry P, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in osteoblasts. *Cancer Res*, 2000, 60: 6001-6007.
- 15 Irina M, LiLian IP, Cecilia LS, et al. Extracellular signal-kinase and cal-

利维爱组有 3 例肝区不适患者,查肝功能有 2 例正常,1 例转氨酶增高,停药后肝区不适消失,两周后复查转氨酶正常,可见肝损伤呈可逆性;2 例皮肤瘙痒者,其中 1 例还出现皮疹,停药后消失;3 例阴道出血者,其中 2 例为服药一个月后少量出血,未停药,未再出血;1 例呈周期性出血(1 次/月)量似生育期月经量,行 B 超检查,提示子宫内膜 < 5 mm,诊刮送病检提示为增生期子宫内膜,未停药,到目前为止未发现明显恶化倾向。补肾中药组有 3 例出现便秘,2 例通过调整饮食结构,增加运动后好转,有 1 例需服缓泻剂后好转。

通过两组的对照研究发现,直接应用性激素治疗组在防治绝经后骨质疏松方面效果更显著,但补肾中药组在改善症状方面疗效也显著且副作用小,并兼有维持骨量的作用。对应用性激素替代治疗有

禁忌或顾虑及不能耐受性激素替代治疗副作用的人,是一种有效的治疗途径。

参 考 文 献

- 1 Lindsay R. Osteoporosis and its relationship to estrogen. *Contemp Obstet Gynecol*, 1984, 63: 201-202.
- 2 De Visser J. Endocrinological studies with (7 α , 17 β -hydroxy-7-methylnorpregn-5(10)-en-20Yn-3-one [(OrgOD14)] . *Arzneim Forsch*, 1984, 34: 1010-1011.
- 3 Kjcovic PM. Placebo controlled, cross-over study of effects of Org OD14 in menopausal women. *Reproduction*, 1982, 6: 81-82.
- 4 李永春, 王树歧, 刘汝琛, 等. 肾主骨. 见: 李永春, 主编. 中医大词典. 北京: 人民卫生出版社出版, 1984. 185-186.
- 5 林畅荣. 绝经后和老年性骨质疏松症的治疗进展. *中华老年医学杂志*, 1992, 11: 317-318.
- 6 张万钟. 绝经后骨质疏松症的诊断. *实用妇产科杂志*, 1995, 11: 236-237.

(收稿日期: 2004-03-25)

(上接第 364 页)

参 考 文 献

- 1 王文健. 肾主骨理论与中西医结合治疗骨质疏松症的研究. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4: 42-44.
- 2 肖建德, 阎德文, 刘景芳, 等. 中药龟丝补骨片对绝经后早期妇女性激素和钙调节激素的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8: 258-262.
- 3 Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, et al. Urinary excretion of pyridinium cross-links: a new marks of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner*, 1990, 21: 310.
- 4 Brown JP. Serum bone Gla protein: a specific marker for bone formation in

postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 1984, 19: 1091.

- 5 蔡桂英, 葛雪琳, 魏玲, 等. 血清骨钙素水平的观察. *中国骨质疏松杂志*, 1999, 5(2): 29-32.
- 6 Garnero P, Shih WJ, Gineyts E. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79: 1693-1700.
- 7 李芳芳, 李恩, 宋士军, 等. 补肾方剂及不同分离组份对成骨细胞增殖分化的影响. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(3): 71-73.
- 8 李芳芳, 李恩, 佟晓旭, 等. 补肾、健脾和活血化瘀方药对去卵巢大鼠骨质疏松的比较性研究. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4: 5-9.
- 9 肖建德, 肖强兵, 阎德文, 等. 中药龟丝补骨片防治大鼠类固醇性骨质疏松的实验研究. *中国骨质疏松杂志*, 2001, 7: 343-345.

(收稿日期: 2003-10-12)

(上接第 392 页)

- cium channels are involved in the proliferative effect of bisphosphonates on osteoblastic cells *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 2050-2056.
- 16 Gomez-garcia L, Esbrit P, Carreno L, et al. Alendronate interacts with the inhibitory effect of on parathyroid hormone-related protein expression in human osteoblastic cell. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 78-87.
 - 17 Sanna S, Virtanen H, Kalervo V, et al. Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *J Cancer Res*, 2002, 62: 2708-2714.
 - 18 Schmitz AP, Govek EE, Bottnar B, et al. rho GTPases: signaling, migration and invasion. *Exp Cell Res*, 2000, 261: 1-12.

- 19 Fromiguet O, Laurence L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 2211-2221.
- 20 Bellahcene A, Bonjean K, Fedarko NS, et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res*, 2000, 86: 885-891.
- 21 Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302: 1055-1061.
- 22 Daniele S, Bruno V, Giordano D, et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 2893-2897.

(收稿日期: 2004-01-06)