

氧化应激与骨质疏松

张鲲 陈晓亮

骨质疏松是以骨组织退化、骨量减少,以及易发生骨折为特征的一种慢性骨病,破骨细胞和成骨细胞功能失衡是导致这一病理过程的直接原因。这两种细胞的分化异常在骨质疏松的发病机理中扮演重要角色,骨质疏松患者成骨细胞分化减少而破骨细胞分化增加^[1,2]。近年来氧化应激作为骨质疏松的一个危险因子已越来越受到重视。有研究表明,氧化应激状态能够抑制骨髓中成骨细胞的分化,同时刺激破骨细胞分化,促进了骨质疏松的发生发展^[3]。笔者就目前对氧化应激在骨质疏松发生发展中的作用的研究作一综述。

人体内的氧化应激状态是如何形成的呢?人体在代谢过程中不断有活性氧族(ROS)产生,主要包括超氧负离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($OH^{\cdot}$)和其他自由基。人体内的主要抗氧化防御系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、还原型谷胱甘肽等。另外,饮食中的抗氧化剂(维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、硒、番茄红素和多酚类等)为机体的抗氧化系统提供有效的辅助作用。正常情况下,活性氧族的产生与机体抗氧化防御系统处于平衡状态,当这种平衡由于吸烟、衰老、雌激素缺乏等因素而被打破时,就造成了机体内的氧化应激状态。这时细胞表现出广泛的氧化损伤:大部分细胞的分化、生长和增殖都受到抑制;同时,氧化应激通过激活许多信号转导通路如核因子(NF- κ B)、促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)、P53和热休克因子(HSF)等加速细胞衰老和死亡^[4,5]。但是,并非说ROS一定对人体有害,由功能正常的破骨细胞产生的受控制的自由基产物能够加速对钙化组织的破坏而有助于骨的改建。这在骨骼的生长发育和骨折修复过程中具有重要意义^[6]。

ROS是如何加速骨吸收的呢?下面让我们探讨氧化应激和各种相关因素对骨组织的影响。

1 氧化应激与成骨细胞

氧化应激能抑制成骨细胞前体细胞向成骨细胞

分化,抑制成骨细胞的矿化作用,诱导其死亡。Mody等^[7]通过检测成骨细胞分化早期的标记酶碱性磷酸酶(ALP)后作出结论:氧化应激抑制骨髓基质细胞系M2-10B4和成骨细胞前体细胞系MC3T3-E1的分化。而且,氧化应激抑制这些细胞系的矿化作用。Brayboy等^[8]的研究表明,高浓度的自由基能够诱导MT3T3-E1细胞的坏死。最近有关于兔骨髓基质细胞(BMSCs)和颅骨成骨细胞的研究结果显示,低剂量 H_2O_2 (0.1 mmol/L)抑制了成骨细胞分化标记物的表达,而较高剂量的 H_2O_2 (1 mmol/L)诱导了成骨细胞死亡^[9]。

氧化应激抑制成骨细胞分化和诱导成骨细胞死亡的机制还不完全清楚。在探究氧化应激与骨质疏松密切联系的机制时,研究的热点是NF- κ B。它是一种氧化应激反应转录因子,参与了基因活化,在各种有关细胞生长、发育、分化和死亡的调控活动中起重要作用。Byun等^[10]和Lee等^[11]研究TNF α 和 H_2O_2 对人骨髓基质细胞(hBMSC)的效应时发现,TNF α 和 H_2O_2 均增加了细胞内ROS水平,使得细胞内谷胱甘肽减少,活化了胱蛋白酶-3、9和-8,最终引起hBMSC的凋亡。他们发现,c-Jun氨基端激酶(JNK)和NF- κ B介导了这些促凋亡效应,由此得出结论:TNF α 和 H_2O_2 通过激活JNK和NF- κ B而导致hBMSC的凋亡。Bai等^[9]则发现氧化应激活化磷脂酶C- γ 1(PLC- γ 1)、细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)和NF- κ B信号途径同时抑制P38促分裂原活化蛋白激酶的激活。他们用20 mmol/L的PD98059(ERK上游激酶MEK1/2的抑制剂)显著逆转了 H_2O_2 导致的成骨细胞分化标记物碱性磷酸酶(ALP)、I型胶原和骨祖细胞集落形成单位(CFU-O)的下降趋势,而且也抑制了 H_2O_2 激活的NF- κ B信号途径。最近Park等^[12]发现, H_2O_2 上调Bax基因(其编码的蛋白质是一种凋亡激活子)的表达并引起线粒体膜电位的超极化,进而导致细胞死亡, H_2O_2 的这种作用也能被PD98059所阻断。这提示氧化应激能够激活ERK信号转导途径而影响成骨细胞的基因表达,从而介导了氧化应激诱导的成骨细胞死亡。因此,ERK和ERK依赖性的NF- κ B活化在抑制

成骨细胞分化和诱导成骨细胞死亡的机制中可能扮演了重要角色。

2 氧化应激与破骨细胞

ROS,如超氧负离子和过氧化氢是控制破骨细胞骨吸收作用的调节因子。由破骨细胞产生的超氧化物可能直接参与了骨的降解,因为在破骨细胞与骨的接触面间发现了超氧化物,而且,抑制破骨细胞超氧化物的产生或利用可以减少骨吸收^[13]。Lee等^[11]用RNA干预的方法抑制破骨细胞前体细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶1(Nox 1)的产生后发现,RANKL(NF- κ B受体活化因子配体)介导的ROS产生和破骨细胞的分化都完全被抑制了,这提示破骨细胞内Nox 1参与产生ROS,而ROS又能促进破骨细胞前体细胞分化。换言之,氧化应激能够刺激破骨细胞的生长分化,而破骨细胞又能反过来增加ROS的产生,如果机体的抗氧化防御机制受损,这就形成了恶性循环,导致广泛骨质疏松。

氧化应激和破骨细胞密切联系的机制:NF- κ B基因敲除小鼠因破骨细胞产生和功能受损表现出骨质硬化症,从而证明了该基因在破骨细胞生长分化中的重要作用^[14]。NF- κ B受体活化因子配体对于骨髓单核巨噬细胞系(BMM)向破骨细胞分化非常重要,它刺激BMM细胞向破骨细胞分化过程中,通过TNF受体相关因子6(TRAF 6)、Rac 1和Nox 1这个信号级联放大体系瞬间升高了细胞内ROS水平,这也提示ROS介导了破骨细胞的分化^[11]。

3 氧化应激与骨的细胞外基质

关于氧化应激对骨细胞外基质的影响的研究报道较少。目前认为氧化应激也破坏纤维连接蛋白,而纤维连接蛋白是骨细胞外基质的主要构成成分。这种糖蛋白充当成骨细胞生长的土壤,参与其迁移、黏附、增殖和分化过程。纤维连接蛋白的代谢性改变通常比其他细胞成分慢,受到各种非酶性修饰的影响,包括衰老过程中形成的氧自由基。ROS造成纤维连接蛋白分子的部分降解和修饰。这些受损的纤维连接蛋白分子失去了在骨质形成中的作用^[15]。

4 氧化应激与雌激素缺乏

目前,绝经后骨质疏松症已经成为困扰全球绝经后妇女的一个重大疾病。雌激素缺乏与绝经后骨质疏松症密切相关,那么雌激素与氧化应激之间有无关系呢?Wassmann等^[16]的最新研究结果显示,雌

激素缺乏的卵巢切除老鼠体内NADPH氧化酶活性和超氧化物释放量都增加了,而用雌激素替代治疗后很快抑制了上述现象。Muthusami等^[17]也对双侧卵巢切除后的老鼠进行研究后发现,与模拟手术对照组比较卵巢切除组老鼠体内脂质过氧化物和H₂O₂水平升高,而酶性抗氧化剂如SOD、GPx(谷胱甘肽过氧化物酶)、GST(谷胱甘肽S转移酶)水平降低。上述研究表明,雌激素缺乏能导致氧化应激,进而促进骨质疏松的发生发展。目前临床应用雌激素治疗和预防绝经后骨质疏松效果显著,但又因为伴随有很多副作用而受到很大的限制,如何发挥雌激素的抗氧化作用而避免其他副作用,还需要深入进行更多的研究。

5 氧化应激与抗氧化剂

既然氧化应激是骨质疏松的危险因子,抗氧化剂的抗骨质疏松作用自然地成为目前研究的热点。

氧化应激是抗氧化剂与促氧化剂之间的失衡,因此,人们推测抗氧化剂可能有抗骨质疏松作用。流行病学研究显示,一些抗氧化剂(如维生素C、E和 β 胡萝卜素等)可以降低患骨质疏松的危险^[18,19]。

番茄红素(lycopene)是抗氧化剂中的新宠。它是一种从西红柿等植物中提取的物质,因为其化学结构含有13个双键,其中11个是共轭双键,这决定了它具有强的还原性^[20],番茄红素的还原性是 β -胡萝卜素的2倍,是维生素E的10倍^[21]。RAO等^[22]研究了番茄红素对破骨细胞的影响后发现,无论甲状旁腺激素存在与否番茄红素都抑制了破骨细胞的骨吸收作用,而且这种抑制作用与其抑制破骨细胞ROS的合成与分泌有关。而Kim等^[23]研究显示,番茄红素刺激成骨样细胞SaOS-2的增殖,而且,对较成熟的成骨样细胞碱性磷酸酶(成骨细胞分化标记物)活性也有刺激效应,但对幼成骨样细胞无效。我们研究所用H₂O₂干预体外培养的成骨细胞模拟氧化应激状态,然后再用番茄红素干预。结果显示,番茄红素可以逆转氧化应激对成骨细胞的损伤,促进它们的增殖,并使其碱性磷酸酶表达和I型胶原分泌增加,成骨功能增强。目前,我们正在进行有关番茄红素对破骨细胞效应的研究。

除了番茄红素外,维生素C^[24,25]、维生素E^[26,27]等的抗氧化应激或抗骨质疏松作用也被很多研究证实。这些研究成果说明利用外源性抗氧化剂可以对抗氧化应激状态,这不但提示氧化应激确实在骨质疏松发生发展中扮演重要角色,而且为我们找到了

一个潜在的治疗和预防骨质疏松的方法。

综上所述,氧化应激对成骨细胞、破骨细胞、骨基质都有明显的影响,能够促进骨质疏松发生发展。而抗氧化剂具有对抗氧化应激的潜力,当体内抗氧化系统失调时适当补充外源性抗氧化剂,可以预防或缓解骨质疏松的发生发展。但是,目前这方面的研究还不多,因此有必要进行深入的基础和临床研究来阐明氧化应激和抗氧化剂在骨质疏松发生发展中的作用,为骨质疏松的防治提供更新更好的方法。

【参 考 文 献】

- [1] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* ,2003 ,423 :337-342.
- [2] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* ,2000 ,21 :115-137.
- [3] Nilam M, Farhad P, Theodore A, et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* ,2001 ,31 :509-519.
- [4] Lee YS, Chen X, Anderson JJB. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutr Res* ,2001 ,21 :1287-1298.
- [5] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* ,2002 ,192 :1-15.
- [6] Lee DH, Lim BS, Lee YK, et al. Effects of hydrogen peroxide (H_2O_2) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* ,2006 ,22 :39-46.
- [7] Mody N, Parhami F, Sarafian TA, et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med* ,2001 ,31 :509-519.
- [8] Brayboy JR, Chen XW, Lee YS, et al. The protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) against free radical damage to osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells. *Nutr Res* ,2001 ,21 :1275-1285.
- [9] Bai XC, Lu D, Bai J, et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* ,2004 ,314 :197-207.
- [10] Byun CH, Koh JM, Kim DK, et al. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* ,2005 ,20 :1125-1135.
- [11] Lee NK, Choi YG, Baik JY, et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* ,2005 ,106 :852-859.
- [12] Park BG, Yoo CI, Kim HT, et al. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* ,2005 ,215 :115-125.
- [13] Vaaraniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, et al. Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* ,2004 ,19 :1432-1440.
- [14] Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* ,1999 ,13 :2412-2424.
- [15] Hosoya S, Suzuki H, Yamamoto M, et al. Alkaline phosphatase and type I collagen gene expressions were reduced by hydroxyl radical-treated fibronectin substratum. *Mol Genet Metab* ,1998 ,65 :31-34.
- [16] Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res* ,2005 ,97 :1046-1054.
- [17] Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta* ,2005 ,360 :81-86.
- [18] Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* ,2001 ,16 :135-140.
- [19] Xiao XH, Liao EY, Zhou HD, et al. Ascorbic acid inhibits osteoclastogenesis of RAW264.7 cells induced by receptor activated nuclear factor kappaB ligand (RANKL) *in vitro*. *J Endocrinol Invest* ,2005 ,28 :253-260.
- [20] Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* ,2000 ,163 :739-744.
- [21] Agarwal S, Rao AV. Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metabol Drug Interact* ,2000 ,17 :189-210.
- [22] Rao LG, Krishnadev N, Banasikowska K, et al. Lycopene I—effect on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. *J Med Food* ,2003 ,6 :69-78.
- [23] Kim L, Rao AV, Rao LG. Lycopene II—effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. *J Med Food* ,2003 ,6 :79-86.
- [24] Mohan S, Kapoor A, Singgih A, et al. Spontaneous fractures in the mouse mutant sfx are caused by deletion of the gulonolactone oxidase gene, causing vitamin C deficiency. *J Bone Miner Res* ,2005 ,20 :1597-1610.
- [25] Macdonald HM, New SA, Golden MH, et al. Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. *Am J Clin Nutr* ,2004 ,79 :155-165.
- [26] Ima-Nirwana S, Suhaniza S. Effects of tocopherols and tocotrienols on body composition and bone calcium content in adrenalectomized rats replaced with dexamethasone. *J Med Food* ,2004 ,7 :45-51.
- [27] Behl C. Estrogen can protect neurons: modes of action. *J Steroids Biochem Mol Biol* ,2002 ,83 :195-197.

(收稿日期:2005-12-22)