

重组骨保护素(rhOPG)药物的研究现状及应用展望

刘俊丽 张建中 施生根

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)01-0065-03

摘要: 破骨细胞分化因子(receptor activator nuclear factor kappa B ligand, RANKL)与骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是调节破骨细胞分化和骨吸收功能的关键因子。RANKL 是连接骨与免疫系统的破骨细胞生成因子,能刺激破骨细胞分化和发挥骨吸收功能;OPG 作为 RANKL 的诱饵受体,能够阻止 RANKL 与 RANK 的结合,从而抑制破骨细胞的分化和激活。应用重组骨保护素 OPG 融合蛋白可以预防和治疗骨丢失类疾病,抑制牙周炎发病过程中牙槽骨吸收,并成为目前预防微重力相关的骨损失的最有希望的药物之一。笔者对重组人骨保护素(rhOPG)基因工程药物的研究现状进行了简要的综述。

关键词: 重组骨保护素;骨吸收;研究现状;应用展望

Recombinant human osteoprotegerin: current status and prospective application LIU Junli, ZHANG Jianzhong, SHI Shenggen. Department of Pathology and Experimental Medicine, The 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Abstract: Receptor activator nuclear factor kappa B ligand(RANKL), and osteoprotegerin(OPG) are key factors in modulating osteoclast differentiation and bone resorption. RANKL is an osteoclastogenic cytokine that links bone and the immune system, and triggers osteoclast differentiation and bone resorption. OPG, which binds RANKL with higher affinity than RANK, acts as a decoy receptor for RANKL and inhibits osteoclast differentiation and activation. Recombinant human OPG fusion protein can be used to prevent and treat the disease such as bone loss, and inhibit alveolar bone resorption in periodontal disease and becomes one of the promising drugs that prevent bone loss associated with microgravity. The current status of recombinant human OPG was reviewed briefly in this article.

Key words: rhOPG; Bone resorption; Current status; Prospective application

骨保护素(OPG)是近年发现的破骨细胞局部抑制因子,已成为极具潜力的治疗骨吸收类疾病的药物。在破骨细胞分化过程中,破骨细胞分化因子(RANKL)和骨保护素的表达平衡被打破,骨组织内 RANKL 和 OPG 含量比明显升高,骨代谢平衡向骨吸收端倾斜。OPG 作为 RANKL 的诱饵受体,可阻止 RANKL 与 RANK 的结合,从而抑制破骨细胞前体的激活。注射人重组 OPG(rhOPG-Fc)的小鼠出现明显的骨量增加,且其他组织未见明显的病变,为 OPG 临床应用治疗骨吸收类疾病创造了积极的条件。

1 RANKL/RANK/OPG 是调节破骨细胞分化成熟和骨吸收功能的关键因子

脊椎动物骨骼系统的发育和内环境稳态取决于活性成骨细胞和破骨细胞的动力平衡,这种平衡受到各种调控系统的严密监视。该平衡被打破,有利于破骨前体细胞分化为破骨细胞,从而发挥骨吸收活性。近年来骨吸收机制的研究发现 RANKL/RANK/OPG 是调节破骨细胞分化成熟和骨吸收功能的关键因子^[1],它不仅在生理性骨吸收中起重要作用,在病理性骨吸收(如类风湿性关节炎、骨质疏松等)中也发挥着重要的作用^[2]。

1.1 RANKL 能刺激破骨细胞分化和发挥骨吸收功能

RANKL 在骨与免疫系统的信号调控网络中发挥桥梁作用,能刺激破骨细胞分化和发挥骨吸收功

基金项目: 306 医院院级课题资助项目(07QN10)

作者单位: 100101 北京,解放军 306 医院病理实验科

通讯作者: 刘俊丽, Email: liujunli306@sohu.com

能,属于 TNF 配体超家族成员,有膜结合型和可溶性两种形式^[3,4]。它是来源于多潜能造血破骨前体细胞分化为破骨细胞终末共同信号通路必须的细胞因子,主要由成骨/基质细胞、活化的淋巴细胞等表达。在骨吸收刺激因子 PTH、VD₃、Dex、PGE₂、IL-11、TNF- α 、IL-1 β 等的作用下,成骨细胞及骨髓基质中 RANKL 的表达增加。研究发现,RANKL 整合在成骨细胞的细胞膜上,参与破骨细胞前体向破骨细胞分化中最基本的信号传递,通过与破骨细胞前体膜上的 RANK 接触,从而调节基因的表达,促进破骨细胞后期的分化成熟^[5]。动物试验表明,RANKL 缺失或 RANK 缺失小鼠均出现骨吸收异常,发生严重的骨质硬化^[6]。

1.2 OPG 抑制破骨细胞的分化和骨吸收

OPG 是 RANKL 的天然的可溶性诱导受体,多种细胞都可表达 OPG,包括成骨/基质细胞、树突状细胞、B 淋巴细胞以及内皮细胞前体和成纤维细胞前体等。OPG 是 TNF 受体超家族成员,与其他 TNF 受体超家族成员不同之处在于它缺乏疏水的跨膜序列,人、小鼠、大鼠的 OPG 均为 401 个氨基酸,人和小鼠的 OPG 蛋白与大鼠分别有 85% 和 94% 的同源性,前面 21 个氨基酸为信号肽,翻译后被切除,形成 380 个氨基酸的成熟的 OPG 蛋白。OPG 是一种可溶性糖蛋白,有 4~5 个潜在的 N-糖基化位点。在细胞外有双体和单体两种形式。OPG 作为 RANKL 的诱饵受体,阻止了 RANKL 与 RANK 的结合,从而抑制了破骨细胞前体的激活,进而抑制破骨细胞的分化和骨吸收^[7];同时,OPG 还可与 RANKL/RANK 结合体结合形成三聚体,直接抑制 RANKL/RANK 的作用^[8]。

2 重组 OPG 融合蛋白的研究及应用

2.1 应用重组 OPG 融合蛋白可以用于预防和治疗骨丢失类疾病

OPG 对于破骨细胞的分化和活性起着核心调节作用,如 PGE₂,转化生长因子 TGF β ,骨形态发生蛋白 BMPs,甲状旁腺激素 PTH,糖皮质激素,雌激素的作用是通过调节成骨细胞系的 OPG 和 RANKL 的表达,进而调节破骨细胞的活性。目前,国外正在深入研究骨质疏松的发病机制,特别是 OPG 及其配体在分子水平上的精细的调控机制。在应用方面,则着力开发药用 OPG^[9]。

应用重组 OPG 融合蛋白可以用于预防和治疗骨丢失类疾病,如骨质疏松症、佩吉特病(变形性骨

炎)、继发性高钙血症、特发性和继发性骨坏死的进行性骨丢失、类风湿性和骨性关节炎引起的骨丢失和关节软骨损伤,溶骨性的骨肿瘤和恶性肿瘤骨转移,并且可以阻止骨与人工假体界面发生骨吸收从而预防假体松动^[10]。

2.2 应用重组 OPG-Fc 可抑制牙周炎发病过程中牙槽骨吸收

最近,通过研究发现^[11],慢性牙周炎牙龈组织中 RANKL 的 mRNA 表达水平增加,而 OPGmRNA 表达水平较弱,与正常牙周组织表现正好相反。进一步的研究发现牙周病变部位的 T 细胞中 RANKL 的表达升高,在阳性 T 细胞中 RANKL 的比例为 50%~60%。在牙周炎大鼠的过继性转移模型中,Kawai T 等在过继转移后 0、2、4 d 静脉注射 OPG-Fc,与对照组相比,处理组牙槽骨的吸收降低 90% ($N=5$; $P<0.05$),表明牙槽骨吸收是 RANKL 依赖的。该研究结果在其他牙周炎大鼠的过继性转移模型^[12]中得到了验证。进一步的研究表明许多抗原特异性的淋巴细胞也表达 RANKL (Taubman, 2004)。因此,在牙周炎大鼠的过继性转移模型中 Th1 T 细胞介导的牙周炎骨吸收是与 T 细胞表达的 RANKL 相关的,OPG-Fc 能够有效地抑制牙周炎骨吸收^[13]。

2.3 OPG 成为目前预防微重力相关性骨损失的最有希望的药物之一

至今已有许多措施被尝试用来对抗空间飞行中微重力引起的骨质丢失。保证足够的饮食摄入、或一定情况下保证足够的钙、VD、VK 和其他骨相关营养物质的摄入是必要的,但显然对于解决骨丢失问题是不够的。用于治疗常人骨质疏松的药物如口服双磷酸盐(抑制骨吸收活性)等对于空间飞行或卧床试验导致的骨质疏松并无明显疗效。目前,OPG 成为预防微重力相关性骨损失的最有希望的药物之一^[14]。据文献报道,Amgen 公司正在研究的 OPG 于 2002 年 12 月 5 日由美国探索者号太空穿梭机发送进入轨道,从而成为进入“空间实验室”的物质。这家顶尖的生物技术公司与美国国家航空和航天管理局(NASA)合作,利用太空旅行中出现的骨密度损失刺激骨质疏松加快,以评价 OPG 预防因失重而引起骨损失的能力,研究表明,含 OPG 分子的药物能有效地在微重力状态下保存骨质。

3 重组人骨保护素(rhOPG)基因工程药物的国内外研究现状

目前国外正在研发的重组骨保护素融合蛋白

(rhOPG-Fc) 药物^[7] 处于临床前研究, 是利用哺乳动物细胞 CHO 细胞表达并纯化, Fc 指包括抗体的非抗原结合部分序列的分子或序列, 由于 Fc 能够在 CHO 细胞进行糖基化, 通过糖基化一方面在蛋白药物表面增加了侧链, 增加蛋白质稳定性, 阻碍了蛋白酶对蛋白药物的降解作用, 另一方面使蛋白药物分子量增大, 减少了肾小球滤过, 所以, Fc 与 OPG 融合蛋白相比 OPG, 具有更高的稳定性, 而且在体内的半衰期更长^[15,16]。然而, 尽管 CHO 细胞表达的 rhOPG-Fc 比较接近在体情况, 但由于细胞培养条件比较复杂, 产量低、操作过程复杂, 使得其生产成本较高, 若在人体中应用则医疗费用较高。而且 rhOPG-Fc 的分子量较大, 长期使用仍有引发异常免疫反应的可能。

国内最近报道利用巴斯德毕赤酵母菌作为目的蛋白表达宿主, 采用基因重组技术获得的 rhOPG-Fc, 体外实验证明具有较强的抑制破骨细胞及骨吸收的作用^[17]。表明利用毕赤酵母表达系统可以产生具有生物活性的重组骨保护素融合蛋白, 但从药用重组融合蛋白的角度而言, Fc 不能在毕赤酵母菌进行糖基化, 并不像 CHO 细胞表达的 rhOPG-Fc 那样能够提高药物的稳定性, 延长半衰期, 所以经静脉和皮下注射后会伴有蛋白质降解, 导致活性降低, 生物利用度低, 要达到需要的血药浓度和治疗效果需要反复给药, 不仅给患者带来不便, 且易产生耐受性、耐药性及免疫原性等不良反应。

4 展望

重组人骨保护素有望在临床用于骨吸收疾病的治疗。目前国内外重组人骨保护素药物均处于临床前研究, 并无上市产品。CHO 细胞表达的 rhOPG 由于成本及费用较高, 难以为患者接受。用巴斯德毕赤酵母菌获得的基因重组技术药物存在半衰期短, 生物利用度低等不足, 因此临床上需要研制长效的重组蛋白药物^[18]。希望在不久的将来, 长效重组人骨保护素药物研制成功能为广大骨吸收类疾病的患者带来福音。

【参 考 文 献】

- [1] Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 1999, 402(6759): 304-309.
- [2] Zheng Y, Zhou H, Brennan K, et al. Inhibition of bone resorption, rather than direct cytotoxicity, mediates the anti-tumour actions of ibandronate and osteoprotegerin in a murine model of breast cancer bone metastasis. *Bone*, 2007, 40(2): 471-478.
- [3] Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression

and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275(3): 768-775.

- [4] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93(2): 165-176.
- [5] McClung MR. Inhibition of RANKL as a treatment for osteoporosis: preclinical and early clinical studies. *Curr Osteoporos Rep*, 2006, 4(1): 28-33.
- [6] Yong YK, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, 397(6717): 315-323.
- [7] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89(2): 309-319.
- [8] Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, et al. Relevance of an *in vitro* osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin biological activities. *Exp Cell Res*, 2004, 293(2): 292-301.
- [9] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997, 390(6656): 175-179.
- [10] Roudier MP, Bain SD, Dougall WC, et al. Effects of the RANKL inhibitor, osteoprotegerin, on the pain and histopathology of bone cancer in rats. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23(3-4): 167-175.
- [11] Valverde P, Kawai T, Taubman MA, et al. Potassium channel-blockers as therapeutic agents to interfere with bone resorption of periodontal disease. *J Dent Res*, 2005, 84(6): 488-499.
- [12] Teng YT, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Int*, 2000, 106(6): R59-R67.
- [13] Taubman MA, Valverde P, Han X, et al. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*, 2005, 76(11 Suppl): 2033-2041.
- [14] Rucci N, Rufo A, Alamanou M, et al. Modeled microgravity stimulates osteoclastogenesis and bone resorption by increasing osteoblast RANKL/OPG ratio. *J Cell Biochem*, 2007, 100(2): 464-473.
- [15] Derek Macmillan. Selective *in vitro* glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin. *Chemistry & Biology*, 2001, 8(2): 133-145.
- [16] Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci*, 2005, 94(8): 1626-1635.
- [17] Huang P, Wang Y, Chi ZY, et al. *In vitro* study of combination rhOPG-Fc and alendronate on inhibition osteoclast. *Chin J Surg*, 2005, 43(12): 812-816. (in Chinese).
- [18] Qi N, Ma QJ. Advances in the research of long life recombinant protein drug. *China Biotechnology*, 2006, 26(2): 79-82. (in Chinese).

(收稿日期: 2007-06-13)