

晚期氧化蛋白产物与骨质疏松症的研究进展

彭玲 陈婷 吴补领*

南方医科大学口腔医学院 南方医院口腔医疗中心, 广州 510515

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0934-05

摘要: 骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种受遗传和环境因素共同影响的代谢性疾病,其主要特点是骨量低下、骨脆性增加、易发生骨折。其发病病因多样,分子机制复杂,已成为影响人们特别是老年人生活质量的流行病之一。晚期氧化蛋白产物是一种新的氧化应激标志物,通过增加细胞活性氧释放、促使炎症因子生成,在促进衰老及老年相关性疾病发生发展中起到重要作用。本文就晚期氧化蛋白产物对骨形成主要细胞和破骨细胞的影响和作用机制,以及治疗骨质疏松症的新型抗氧化药物的研究进展做一综述。

关键词: 晚期氧化蛋白产物;氧化应激;骨质疏松症;成骨细胞;破骨细胞

The research progress of the relationship between advanced oxidation protein products and osteoporosis

PENG Ling, CHEN Ting, WU Buling

Medical Center of Stomatology, Nanfang Hospital, College of Stomatology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: WU Buling, Email: bulingwu@smu.edu.cn

Abstract: Osteoporosis (OP) is a kind of metabolic disease characterized by bone mass loss, fragility of the bone and increase of bone fracture risk, which is associated with genetic and environmental factors. Osteoporosis has become one of the common diseases affecting the living quality of the elderly for its diverse pathogenesis and complicated molecular mechanism. Advanced oxidation protein products, a kind of novel marker of oxidative stress, play an important role in aging process and age-related diseases by increasing the release of reactive oxygen and promoting the generation of inflammatory cytokines. In this paper, we are going to review the effects and mechanisms of advanced oxidation protein products on the primary cells during bone formation and osteoclasts and the research progress of new antioxidants for osteoporosis.

Key words: Advanced oxidation protein products; Oxidative stress; Osteoporosis; Osteoblasts; Osteoclasts

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种病因多元,与增龄和性别密切相关的渐进性全身性代谢性骨病。OP分为原发性和继发性两大类,前者又分为绝经后OP、老年性OP和特发性OP三类。OP的主要致病机制是骨形成和骨吸收平衡失调,导致骨脆性增加。晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPPs)作为一种尿毒症毒素和炎症介质,它能激发单核细胞呼吸爆发,刺激以肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)为主的大量促炎性细胞因子合成、释放,促发单核细胞的炎症反应,

引起全身微炎症状态。近年来,许多学者发现AOPPs可以通过多种信号通路激活破骨细胞(osteoclasts, OC)以及抑制成骨细胞(osteoblasts, OB)和骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的增殖和分化成熟,进而打破了OB骨形成和OC骨吸收之间的平衡,成为了OP的重要危险因素。目前许多学者正在积极寻找抑制体内氧化应激反应的药物治疗OP。这些重要的研究成果对OP防治新途径具有重大的临床意义。

1 氧化应激、AOPPs和OP三者的关系

氧化应激是指机体或细胞内氧自由基的消长失衡,导致活性氧类物质(reactive oxygen species, ROS)在体内蓄积的一种状态。ROS性质活泼,是极

基金项目: 南方医科大学南方医院院长基金(2014C020)

* 通讯作者: 吴补领, Email: bulingwu@smu.edu.cn

易消散的物质,因而在体内直接检测非常困难。但是在氧化应激状态下,大分子结构物质如蛋白质、脂质、DNA/RNA 等易遭受氧化损伤而丧失正常的结构和功能,其中蛋白质是氧化损伤的主要原初靶。因此通常通过检测 ROS 催化脂质、蛋白质/氨基酸和 DNA 形成的化学性质较稳定的物质。正常情况下,细胞外液中只含有少量的抗氧化酶,因此在氧化应激状态下血浆蛋白(例如白蛋白)很容易被 ROS 氧化。氧化蛋白产物水平升高,称为“晚期氧化蛋白产物”^[1]。AOPPs 作为新的尿毒症毒素和炎症介质,是测定氧化剂介导的蛋白损伤的可靠指标。

晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)是一种分子量为 3500 的细胞表面蛋白,属于免疫球蛋白超家族多配体受体,其配体包括 AGEs、两性素/高速泳动族盒 1 蛋白、S100/钙粒蛋白及 β 淀粉样肽以及近年来发现的 AOPPs^[2]。AOPPs 与 RAGE 结合后通过激活细胞内的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶能促使活性氧 ROS 生成增加,这也是 AOPPs 发挥众多生物活性的重要中间过程^[3]。因此,AOPPs 不仅是氧化应激的后果,其本身也是 ROS 来源,参与人类多种重要疾病的发生、发展。

OP 的两个重要发病因素—雌激素水平下降和年龄增长(衰老程度加剧)均能导致机体氧化应激水平升高。其它导致 OP 发生的危险因素如:吸烟、高血压、糖尿病均能提高机体的氧化应激水平。有研究表明,氧化应激可以刺激体外培养的成骨细胞前体细胞系 MC3T3-E1 产生大量的 AOPPs,且 AOPPs 能够通过激活活性氧依赖的核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)途径来抑制成骨样细胞的体外增殖和分化^[4,5]。因此,AOPPs 可能在氧化应激介导的 OP 的发病过程中发挥了极为重要的作用。

2 AOPPs 对骨形成主要细胞及 OC 的影响及作用机制

2.1 AOPPs 对 BMSCs 和 OB 增殖与分化的影响及作用机制

BMSCs 成骨分化的标记物有:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),基因的表达(包括 I 型胶原,ALP,骨钙素以及骨连接蛋白 mRNA 的表达)以及钙化结节的形成。其中 ALP 的活性和 I 型胶原 mRNA 的表达是成骨细胞较早形成的标志蛋白^[6]。2013 年, Sun N 等^[3]通过实验证明 AOPPs 对 BMSCs

ALP 活性以及 ALP 和 I 型胶原蛋白 mRNA 表达呈剂量、时间依赖性抑制,并对钙化结节形成也有抑制作用,提示 AOPPs 能够抑制大鼠 BMSCs 成骨分化,并且也能抑制大鼠 BMSCs 增殖。BALP 是血清碱性磷酸酶众多亚型之一,由 OB 分泌,被认为是反应成骨的良好标志。Tracp5b 是一种结构保守的含铁糖蛋白物质,主要由 OC 分泌,该酶具有降解骨基质中钙磷矿化底物的作用。曾纪焕等^[7]发现 AOPPs 在明显降低血浆 BALP 浓度的同时显著升高 Tracp5b 浓度。说明外源性 AOPPs 对老年大鼠骨代谢的效应是抑制骨形成的同时促进骨吸收。由此可见,AOPPs 主要是通过抑制 OB 和 BMSCs 的增殖和分化来促进 OP 的发生发展。

在作用机制方面,AOPPs 能够通过与细胞表面的 RAGE 结合引起 ROS 增多,而 ROS 的生成过多对 BMSCs 和 OB 的增殖和分化抑制作用机制主要涉及的是磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)以及 WNT 信号通路等信号转导途径。

ERK 信号通路属于 p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族,与 BMSCs 和 OB 的增殖、分化以及成骨功能有关。在氧化应激条件下,ERK1/2 可以在 ROS 的刺激下磷酸化,将信号传导到细胞内诱导 BMSCs 的凋亡。丹酚酸 B,一种强效的抗氧化剂,能够通过抑制半胱天冬酶-3 的活性显著地抑制由 ROS-ERK 信号通路介导的 BMSCs 凋亡^[8]。最近有研究报道,将骨髓中的脂肪细胞和 OB 进行共培养后,前者释放的游离脂肪酸可以抑制 OB 的分化和功能并诱导其凋亡。其主要机制是与脂肪细胞诱导 ROS 生成,进一步激活 ERK/P38 信号通路有关^[9]。与之相反,有研究表明抗氧化剂白藜芦醇可通过 ERK 途径提高 BMSCs 的增殖能力并诱导 BMSCs 向成骨细胞分化,且应用 ERK 特异性抑制剂 PD98059 后,抗氧化剂的作用明显被抑制^[10]。由此可见,氧化应激状态下,ERK 信号通路对 BMSCs 和 OB 的增殖与分化的影响是非常复杂的。

在大多数哺乳动物中,WNT 基因家族是一类具有 19 个成员保守的分泌型信号分子,它们调控了诸多的细胞行为:如细胞的命运、黏附、形状、增殖、分化和迁移。经典 WNT/ β -catenin 通路在促进 BMSCs 定向分化为 OB 的同时还可加快成熟 OB 矿化和骨

基质形成速率。稳定表达的 β -catenin 进入核内与 T 细胞转换因子 (T-cell factor, TCF)/淋巴增强因子 (lymphoid enhancing factor, LEF) 转录因子结合启动早期 OB 分化标志基因 RUNX2 表达,后者可调控 OB 的特异性基因如 ALP、骨钙蛋白、骨桥蛋白及 I 型胶原蛋白基因等表达,促进 OB 成熟^[11]。研究表明,经典 WNT/ β -catenin 通路在 BMSCs 定向分化中的调控作用,主要是通过抑制过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors gamma, PPAR γ) 的表达来阻止 BMSCs 向脂肪细胞和软骨细胞分化^[12]。而当体内氧化应激水平增高时,过多的 ROS 一方面激活 FoxO 转录和 PPAR γ 表达,抑制了 WNT/ β -catenin 通路中 TCF/LEF 的转录;另一方面也削弱 AKT 的活性,从而降低 OB 生成^[12, 13]。2012 年, Li, G 等^[14]通过实验观察到 RAGE 能够抑制小鼠 OB 前体细胞系 (MC3T3-E1) 的增殖并表明 RAGE 对 MC3T3-E1 的抑制作用是通过 WNT, PI3K 以及 ERK 信号通路来实现的。总之,经典 WNT/ β -catenin 是骨形成过程中的重要调控者, AOPPs 可能通过上调 FoxO 的表达,促进 PPAR γ 的生成来抑制 WNT/ β -catenin 通路来影响 BMSCs 和 OB 的功能。

2.2 AOPPs 对 OC 的影响及作用机制

OC 是造血细胞来源的多核巨细胞。造血干细胞生成的单核细胞贴附在骨吸收结合位点进而分化为破骨细胞,这个过程需要两个关键的破骨细胞生成因子:巨噬细胞刺激集落因子和核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)^[15]。其中 RANKL 是肿瘤坏死因子超家族,存在于 OB、骨细胞以及 T 细胞中。其受体主要存在于 OC 以及 OC 的前体细胞表面,受体与配体结合后能够激活 OC 并诱导 OC 的生成^[16]。AOPPs 对 OC 的促进作用主要涉及整合素信号通路、NF- κ B、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 等。

作为 AOPPs 的受体, RAGE 在原代培养的骨髓巨噬细胞和巨噬细胞系中有表达,并且在 OC 分化过程中其转录和蛋白水平都会上调。实验证明 RAGE 基因缺失的小鼠其骨量和骨密度增加,而骨吸收减弱^[15, 17]。其具体的作用机制可能与 RAGE 调控的整合素信号通路有关^[18]。整合素是一种细胞表面黏附分子的膜表面糖蛋白, OC 表面表达的整

合素 α v β_3 在 OC 的骨吸收中起关键作用^[19]。研究发现,整合素 α v β_3 在 OC 诱导酪氨酸磷酸化与富含脯氨酸激酶 2 以及非受体依赖型蛋白酪氨酸激酶 Src 家族中的衔接蛋白 P130^{cas} 激活中至关重要,集中在封闭带 (OC 的黏附结构) 使骨产生吸收作用^[20]。因此,我们可以认为 AOPPs 可能通过 AOPPs-RAGE-整合素 α v β_3 信号通路来影响 OC 的功能。

Nrf2 是一种氧化还原敏感的转录因子,通过抗氧化反应元件来调节多种抗氧化基因的表达。当体内 AOPPs 通过与细胞表面的 RAGE 结合而使 ROS 增多时, Nrf2 作为多种细胞保护酶 (比如血红素加氧酶、NADPH 还原酶) 的转录调控因子,其表达水平将会下调,与此同时 OC 的总数会增加^[16]。其具体的过程主要是在 Keap1 的参与下完成的。Keap1 是一种 E3 泛素连接酶,可以调节 Nrf2 的泛素化过程,是氧化应激反应的主要调节器^[21]。Keap1 能够阻止 Nrf2 易位进入细胞核从而维持 ROS 的水平^[22]。而 Nrf2 也可能通过控制细胞氧化反应基因的表达来调节细胞的氧化还原状态,从而抑制了由 RANKL 介导的 OC 的分化^[23]。

3 治疗骨质疏松症的新型抗氧化药物

最近研究发现,白花丹素能够显著降低氧化应激水平,下调细胞凋亡标记物并且保护由地塞米松介导的细胞损伤。其具体机制与白花丹素诱导的 Nrf2 信号通路有关^[24]。环氧二十碳三酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs) 是细胞色素 P450 环氧化酶催化花生四烯酸的代谢产物。实验证明 EETs 能够显著减弱骨吸收并且能够抑制 OC 的形成和活性,可能与 EETs 抑制 RANKL 诱导的 NF- κ B 的激活进而阻止 ROS 的产生有关^[25]。交感神经信号通过激活成骨细胞上的 β -肾上腺素能受体,进一步上调 RANKL 基因的表达来调节骨吸收。 α -硫辛酸能够通过抑制破骨细胞的生成来阻止由 β -肾上腺素能信号介导的骨吸收。 β 受体激动剂异丙肾上腺素能使 OC 中的 ROS 增加并上调 OC 相关基因如 NFATc, 抗酒石酸酸性磷酸酶以及组织蛋白酶 K 的表达,而 α -硫辛酸能抑制异丙肾上腺素诱导的这些基因的表达^[26]。另外有研究报道的天麻^[27]、ZXHA-TC (由没食子酸和磺胺邻二甲氧嘧啶合成的一种新型抗氧化剂)^[28] 能够促进骨形成,抑制骨吸收,具体机制还需要进一步研究。虽然以上抗 ROS 的抗氧化剂能够改善骨质疏松症的症状,但是值得

注意的是 ROS 存在于体内各种细胞中,因此抗氧化剂没有特异性,会对除了骨组织外的其他组织产生不良的影响。所以使用抗氧化剂是否是一种治疗骨质疏松症最有效的方法还有待探究。

4 结语

综上所述,在骨质疏松患者体内,通常氧化应激水平较高,可借助血清 AOPPs 水平进行监测,并且 AOPPs 水平与骨质破坏间存在密切的相关性,提示体内可能通过氧化应激作用,刺激炎症因子的产生和释放,从而影响 OB 和 OC 的分化与功能^[29]。ROS 生成增加,一方面通过抑制 WNT/ β -catenin 通路中 TCF/LEF 的转录、削弱 AKT 和 ERK 的活性,降低 OB 的成骨能力以及 BMSCs 的增殖和分化能力;另一方面通过激活整合素 $\alpha v \beta_3$ 信号通路、NF- κ B 以及下调 Nrf2 转录因子,促进 OC 的分化和生成。最终作用打破了骨修复和骨破坏之间的平衡,导致了骨质疏松症的发生和进展。虽然根据其作用机制近年来研发出来了许多新型抗 ROS 的药,但还存在特异性不够等缺点。因此对骨质疏松症中各种分子作用机制进行进一步的探索任重而道远。

【参 考 文 献】

- [1] Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, et al. Multimarker Screening of Oxidative Stress in Aging[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 2014: 562860.
- [2] Piwowar A. [Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property][J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2010, 28(164): 166-169.
- [3] Sun N, Yang L, Li Y, et al. Effect of advanced oxidation protein products on the proliferation and osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 32(2): 485-491.
- [4] Choi E M, Kim Y H. Hesperetin attenuates the highly reducing sugar-triggered inhibition of osteoblast differentiation[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2008, 24(3): 225-231.
- [5] Zhong Z M, Bai L, Chen J T. Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF- κ B pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 24(1-2): 105-114.
- [6] 刘伟,刘萌,祝劲松,等. 人骨髓间充质干细胞的体外培养、鉴定及成骨分化[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(14): 2515-2519.
Liu W, Liu M, Zhu J S, et al. In vitro culture, identification and osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(14): 2515-2519.
- [7] 曾纪煥. 晚期氧化蛋白产物对老年大鼠骨代谢影响的实验研究[D]. 南方医科大学, 2014.
Zeng J H. Effect of advanced oxidation protein products on bone metabolism in aged rats; An in vivo study[D]. Southern Medical University, 2014.
- [8] Lu B, Ye Z, Deng Y, et al. MEK/ERK pathway mediates cytoprotection of salvianolic acid B against oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow stem cells[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(11): 1063-1068.
- [9] Dong X, Bi L, He S, et al. FFAs-ROS-ERK/P38 pathway plays a key role in adipocyte lipotoxicity on osteoblasts in co-culture[J]. *Biochimie*, 2014, 101: 123-131.
- [10] Dai Z, Li Y, Quarles L D, et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(12): 806-814.
- [11] 周年,刘波,徐彭. 氧化应激与骨质疏松症的研究进展[Z]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 1485-1489.
Zhou N, Liu B, Xu P. The research progress of oxidative stress and osteoporosis[Z]. *Chin J Osteoporos*, 2014, 1485-1489.
- [12] Almeida M, Ambrogini E, Han L, et al. Increased Lipid Oxidation Causes Oxidative Stress, Increased Peroxisome Proliferator-activated Receptor - γ Expression, and Diminished Pro-osteogenic Wnt Signaling in the Skeleton[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(40): 27438-27448.
- [13] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52): 44326-44335.
- [14] Li G, Xu J, Li Z. Receptor for advanced glycation end products inhibits proliferation in osteoblast through suppression of Wnt, PI3K and ERK signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(4): 684-689.
- [15] Zhou Z, Immel D, Xi C X, et al. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(4): 1067-1080.
- [16] Callaway D A, Jiang J X. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases[J]. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33(4): 359-370.
- [17] Ding K H, Wang Z Z, Hamrick M W, et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(4): 1091-1097.
- [18] Zhou Z, Xiong W. RAGE and its ligands in bone metabolism[J]. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 2011, 3: 768-776.
- [19] 全锡师,顾建红,刘宗平. 整合素及其调控破骨细胞相关信号机制研究进展[J]. *动物医学进展*, 2013(05): 99-102.
Tong X S, Gu J H, Liu Z P. Study on Integrin and Its Signal Modulating Mechanisms of Osteoclast[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2013(05): 99-102.
- [20] Bonnette P C, Robinson B S, Silva J C, et al. Phosphoproteomic characterization of PYK2 signaling pathways involved in

- osteogenesis[J]. J Proteomics, 2010, 73(7): 1306-1320.
- [21] Jiang Z Y, Lu M C, Xu L L, et al. Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis[J]. J Med Chem, 2014, 57(6): 2736-2745.
- [22] Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, et al. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling[J]. J Biol Chem, 2013, 288(32): 23009-23020.
- [23] Hyeon S, Lee H, Yang Y, et al. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65: 789-799.
- [24] Zhang S, Li D, Yang J Y, et al. Plumbagin protects against glucocorticoid-induced osteoporosis through Nrf-2 pathway[Z]. Cell Stress Chaperones, 2015.
- [25] Guan H, Zhao L, Cao H, et al. Epoxyeicosanoids suppress osteoclastogenesis and prevent ovariectomy-induced bone loss [J]. FASEB J, 2015, 29(3): 1092-1101.
- [26] Kondo H, Takeuchi S, Togari A. beta-Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 304(5): E507-E515.
- [27] Huang Q, Shi J, Gao B, et al. Gastrodin: an ancient Chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporosis agents via reducing reactive oxygen species [J]. Bone, 2015, 73: 132-144.
- [28] Jin P, Liao L, Lin X, et al. Stimulating effect of a novel synthesized sulfonamido-based gallate ZXHA-TC on primary osteoblasts[J]. Yonsei Med J, 2015, 56(3): 760-771.
- [29] 王箭, 林启旺, 白玉玲, 等. 氧化应激和骨代谢水平与老年原发性骨质疏松症间的相互关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015(02): 192-195.
- Wang L, Lin Q W, Bai Y L, et al. The relationship between oxidative stress and bone turnover in the elder people with Osteoporosis[J]. Chin J Osteoporos, 2015(02): 192-195.

(收稿日期: 2015-12-29)