糖原合成酶激酶-3 抑制剂在骨质疏松性疾病治疗中的作用研究进展

李理 李百川 王仁崇 唐经励 覃永保 李兵*

广西医科大学第四附属医院/柳州市工人医院, 广西 柳州 545005

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1188-07

摘要: 骨质疏松症是一种全身性代谢性疾病,其主要特征为骨密度降低,易引发骨质疏松性骨折等疾病。糖原合成酶激酶-3抑制剂能够抑制糖原合成酶激酶-3活性,从而促进 Wnt 信号转导通路及其下游基因、蛋白的表达,主要通过促进骨髓间充质干细胞、成骨细胞增殖和分化的同时抑制破骨细胞活性,共同调节骨细胞微环境来实现对骨质疏松性疾病的治疗。现就糖原合成酶激酶-3抑制剂在骨质疏松性疾病治疗过程中的作用研究进展做一综述。

关键词: 骨质疏松症;糖原合成酶激酶-3抑制剂;Wnt 信号转导通路

Research progress of the treatment on osteoporotic disease with glycogen synthase kinase-3 inhibitor

LI Li, LI Baichuan, WANG Renchong, TANG Jingli, QIN Yongbao, LI Bing

The Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University / Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou 545005, Guangxi, China

Corresponding author: LI Bing, Email: drlibing@139.com

Abstract: Osteoporosis is a systemic metabolic disease. Its main character is the reduction of bone mineral density, which easily leads to osteoporotic fractures. Glycogen synthase kinase-3 inhibitor can inhibit glycogen synthase kinase-3 activity, thereby promoting the expression of Wnt-channel and its downstream genes and proteins. It mainly promotes the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and osteoblasts, while inhibits the activity of osteoclasts. It regulates bone cell microenvironment to achieve the treatment of osteoporotic disease. Now we review the research progress of glycogen synthase kinase-3 inhibitor in the treatment of osteoporotic disease.

Key words: Osteoporosis; Glycogen synthase kinase-3 inhibitor; Wnt signaling transduction pathway

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)的发生是由于骨代谢失衡逐渐导致的骨骼完整性的破坏、骨量的减少、骨质的破坏、骨密度的变化、正常骨生长和骨吸收之间的平衡代谢失调所引起,骨密度降低、骨组织细微结构破坏、骨的力学性能下降及骨脆性增加为其主要特征^[1,2]。一般来说,骨骼通过破骨细胞去除衰老部分,再由成骨细胞形成的新骨替代,完成骨骼的再造循环,正常情况下两者保持平衡,若骨吸收总量超过骨形成,则导致骨质疏松^[3]。长期的科学研究发现 Wnt 信号转导通路在调控骨细胞分化、骨量的增减方面发挥了重要作用,糖原合成酶激酶-3

(Glycogen synthase kinase-3, GSK-3)抑制剂能够激活 Wnt 通道,促进其下游基因及蛋白的表达,调节骨髓间充质干细胞、成骨细胞及破骨细胞的代谢,促进骨形成速率,为 OP 治疗提供新的方向^[4,5]。本文就 GSK-3 抑制剂的生物学效应及其在骨质疏松性疾病治疗中的作用研究进展做一综述。

1 Wnt 信号转导通路

1.1 Wnt 信号转导通路的作用机制

Wnt 信号转导通路是一个由多种分子参与、相互影响、相互制约和协同作用的复杂体系,是胚胎发育、调控细胞生长的关键途径。Wnt 信号转导通路可分为 3 条: Wnt/ β -catenin 通路,也称经典的 Wnt 信号通路(Canonical Wnt pathway), Wnt/钙离子(Wnt/ Ca^{2+})通路和 Wnt 细胞极性(Planar cell

基金项目: 国家自然科学基金(81260273), 广西壮族自治区自然科学基金(2013GXNSFAA019269)

* 通讯作者: 李兵, Email: drlibing@139.com

polarity, PCP) 通路, Wnt 蛋白主要通过 Wnt/ β -catenin 通路参与骨骼的重建和骨细胞的生长过程^[6]。Wnt/ β -catenin 通路作用机制为: Wnt 蛋白与细胞膜受体卷曲蛋白(Frizzled Fz) 和辅助受体脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (Lipoprotein receptor related protein 5/6, LRP5/6) 结合, 活化 Fz 受体, 通过骨架蛋白(Dishevelled, Dv) 和络蛋白激酶(Casein kinase 1, CK1) 传递信号, 活化由轴蛋白(Axin)、结肠腺瘤性息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC) 和糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 组成的复合物, 激活细胞内信号通路。在 Wnt 信号未被激活时, GSK-3 β 磷酸化 β -catenin, β -catenin 经泛素/蛋白酶体途径降解, 而当 Wnt 信号激活时, 蛋白复合物解离不发生磷酸化, β -catenin 在胞浆中积聚并转位入核, 与转录因子 T 细胞因子/淋巴细胞增强因子 (T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF) 结合启动靶基因如 c-myc, cyclin D1 的转录, 促进细胞的增殖及分化^[7]。

1.2 Wnt 信号转导通路在骨质疏松性疾病治疗中的作用

OP 可分为 I 型骨质疏松症和 II 型骨质疏松症, Wnt/ β -catenin 通路已经被证实与骨形成和重建有关, 信号通路传导发生紊乱时, 产生许多骨骼性或非骨骼性疾病, 例如 Wnt/ β -catenin 信号通路的共同受体 LRP5 的功能丧失突变及功能获得性突变分别导致骨质疏松症假神经胶质瘤综合征 (Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, OPPG)^[8,9] 和高骨密度症 (High bone mass, HBM)^[10]。不管是哪种类型的 OP 都与 Wnt/ β -catenin 信号通路有着密切的联系, 激活 Wnt 信号转导通路调控其下游基因、蛋白表达, β -catenin 含量增多在胞浆内聚集转入并作用于胞核, 使其表达碱性磷酸酶、CnX43 等, 促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞^[11,12], 还可以促进成骨细胞增殖和分化^[13], 成骨细胞可通过上调 OPG/RANKL 的比例来调节破骨细胞的代谢共同增加骨的形成速率^[14]。Wnt 信号途径的启动通过其配体与 Frizzled 和 LRP5 受体结合而激活, 通过转基因鼠表达使其在骨组织中的 LRP5 功能获得性突变, 或者鼠缺乏抗 sFRP1 均可使其骨密度提高和成骨细胞的凋亡抑制^[15]。

1.3 Wnt 信号转导通路中潜在的抗骨质疏松药物靶点

Wnt/ β -catenin 信号转导通路是重要的细胞信号转导途径, 与 OP 的发生有着密切的联系, 通路中

存在多种蛋白及细胞因子共同拮抗通路信号的发生, 根据其发生作用的部位可以分为细胞外拮抗剂和细胞内拮抗剂。细胞外拮抗剂有 Dkk1、Sost、Wise、sFRPs、Wif1、Cerberus 蛋白等, 细胞内拮抗剂有 GSK-3 β 、Axin、APC、CKIa 等。Wnt/ β -catenin 拮抗剂可以抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 导致通路表达异常, 通路所涉及的靶位或因子有望成为开发新的抗骨质疏松药物的潜在作用位点, 进一步研究 Wnt/ β -catenin 信号通路拮抗剂, 设计出阻断这些关键靶点的药物, 可为骨质疏松的治疗提供一种新的途径。在选择药物靶点时, 需要重点考虑靶点的类型、细胞定位、通路中靶点的作用以及通路中靶点的选择性等, 目前抗骨质疏松药物主要以 Wnt 信号、 β -catenin 表达、 β -catenin/TCF 复合物的形成及其介导的转录为靶点进行研究。Sclerostin 是由 Sost 基因编码的一种分泌性蛋白, 研究表明 Sclerostin 能抑制经典 Wnt 信号通道途径进而抑制了成骨细胞的分化, 正是基于上述认识, 抗-Sclerostin 单克隆抗体 (Scl-Ab) 得以开发, Padhi 等开展首个抗 Sclerostin 单克隆抗体 (AMG 785) 的临床人体试验用于治疗 OP^[16]。

β -catenin 是 Wnt 信号通路中心调控分子, 调节 β -catenin 在胞内的稳定及其在胞内的累积是 Wnt 信号通路中最关键的环节之一。许多 GSK-3 的小分子抑制剂 (LiCl、Chit99021 和 LY603281-31-8 等) 可使 GSK-3 的底物 β -catenin 免受降解, β -catenin 在胞内大量累积并转入核, 即而启动靶基因的表达, 促进体外成骨细胞发育及体内的骨形成, 所以 GSK-3 抑制剂作用于骨细胞, 成为骨质疏松性疾病治疗研究的一个重点方向。

2 糖原合成酶激酶-3

2.1 糖原合成酶激酶-3 的生物学特性及分布

糖原合成酶激酶-3 (Glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 是普遍存在于真核细胞中的一种多功能苏氨酸/丝氨酸激酶, 最早在 20 世纪 70 年代末被发现和鉴定^[17]。GSK-3 参与肝糖原合成酶、胰岛素、Wnt/ β -连环蛋白、Hedgehog 以及 Notch 等多条细胞信号传导通路的调节, 其作用主要包括调节糖原的合成代谢、细胞的增殖与分化及基因表达。GSK-3 主要有 2 种亚型: GSK-3 α 和 GSK-3 β , 相对分子质量分别为 51 和 47ku, 其中 GSK-3 β 是细胞内多种信号通路的重要成分, 不仅参与胰岛素信号通路调节, 还参加 Wnt 信号通路和 NF- κ B 信号通路等的调

节^[18]。GSK-3 基因有高度保守型,从果蝇到人类 GSK-3 激酶结构域序列上保持着 90% 以上同源性。GSK-3 α 和 GSK-3 β 基因有 85% 同源性,在催化结构域高达 93% 的同源性,二者分别位于 19q13.2 和 3q13.3。GSK-3 β 对底物的识别与一般激酶不同,GSK-3 β 底物一般要求有共同的 S/TXXXXS/T(P) 序列,其中 X 为任意氨基酸,底物磷酸化的发生首先在另一个激酶的作用下使底物 S/TXXXXS/T(P) 序列上 C 端的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化,磷酸化后的起始位点引导 GSK-3 进一步使底物磷酸化,形成多位点磷酸化结构域。GSK-3 不同底物需要的起始磷酸化的激酶也不同,但不是所有底物都要起始磷酸化,例如 β -catenin 磷酸化就不需要先被磷酸化。GSK-3 β 可以磷酸化多种底物,包括参与代谢和信号调节的蛋白、结构蛋白和各种转录因子,例如糖原合成酶、微管相关蛋白和 β -catenin 等。此外,GSK-3 β 还影响多种转录因子如 AP-1, β -catenin, CREB, Myc 和 NF- κ B 等的基因表达。研究发现,细胞液中的 GSK-3 可以下调 β -catenin 和 Gli 蛋白水平,分别参与调控 Wnt/ β -catenin 信号通路和 Hedgehog 信号通路,影响骨的代谢^[19]。

GSK-3 β 活性受多种机制调节,GSK-3 β 磷酸化是研究的调节机制之一,GSK-3 β Ser-9 磷酸化后其活性降低,已经发现多种激酶参与 GSK-3 β Ser-9 磷酸化的修饰调节,例如 Akt (PKB)、PKC、PKA、胰岛素样生长因子-1 和 EGF 等。GSK-3 β 与不同的蛋白形成蛋白复合体也是调节 GSK-3 β 活性的方式之一,目前研究得较多的是 GSK-3 β 结合蛋白介导的蛋白复合体的形成,包括 GSK-3 结合蛋白(GSK-3 binding protein,GBP)、轴素(axin)、axil 和 conductin 等。另外 GSK-3 β 还能被 Wnt 信号和一些精神药物如碳酸锂和丙戊酸等一些小分子抑制剂调节。

2.2 糖原合成酶激酶-3 抑制剂

GSK-3 作为信号传导途径的主要调控酶,已经成为受到广泛关注的药物靶点,寻找 GSK-3 抑制剂

也成为目前研究的热点。目前开发的 GSK-3 抑制剂在化学结构上存在差异很大,主要有小分子 ATP 竞争型抑制剂和非 ATP 竞争型抑制剂。小分子 ATP 竞争型抑制剂共同特点是多数小分子疏水的杂环化合物,相对分子质量一般小于 600,多数通过与 GSK-3 β Ser-9 磷酸化位点 ATP 竞争型地结合抑制 GSK-3 活性,这些化合物多数通过疏水相互作用和 2~3 个氢键与 GSK-3 结合。目前发现的 ATP 竞争型抑制剂主要有 Paullon、靛玉红、马来酰胺、嘧啶、吡嗪等^[20];非 ATP 竞争型抑制剂的作用机制还不清楚,主要包括无机离子抑制剂、TDZD 类化合物等^[21](表 1)。关于 GSK-3 抑制剂的报道大多是 ATP 竞争型抑制剂,该类抑制剂作用于 GSK-3 的 ATP 结合位点,体外活性一般较好(纳摩尔级),但是由于该 ATP 结合位点在 500 多种激酶中具有高度保守性,所以 ATP 竞争型抑制剂的选择性较差。CHIR99021 是迄今最有效、最具特异性的 GSK-3 抑制剂,对 GSK-3 α 、 β 亚基直接奇效,产自 CHIRON 公司,属于 ATP 竞争型抑制剂,能抑制糖原合成酶和葡萄糖的摄取,增强骨骼肌对葡萄糖的转运,增加胰岛素敏感性,用于治疗糖尿病^[22]。GSK-3 非竞争型抑制剂作用于 GSK-3 特有的底物结合位点或变构位点,与 ATP 竞争型抑制剂相比,有更好的选择性。其中锂离子(Li⁺)是第一个发现的 GSK-3 无机离子抑制剂,直接与 GSK-3 上的 ATP 依赖的敏感性催化位点结合,或者间接促进 GSK-3 α 、 β 亚基上的丝氨酸磷酸化,从而抑制 GSK 蛋白的作用。Li⁺ 促进丝氨酸磷酸化有三条途径:激活 PKA,激活 PI3-kinase-依赖性 Akt,激活蛋白激酶 C- α ;Li⁺ 可以分解 β -抑制蛋白-2-pp2A-Akt 复合体,使 Akt 去磷酸化失活,从而促进 GSK-3 的丝氨酸磷酸化,使其受到抑制;最后 Li⁺ 可通过解除 PP-1 上的 inhibitor-2 复合体的抑制作用来干扰 GSK 的作用。Li⁺ 目前已经作为 GSK-3 抑制工具药广泛应用,临床上常常作为双向情感障碍精神疾病的治疗药物^[23]。

表 1 糖原合成酶激酶-3 抑制剂的分类

Table 1 Category of glycogen synthase kinase-3 inhibitor

分类	名称
ATP 竞争型抑制剂	Paullones、Indirubin(靛玉红类)、Maleimides(马来酰胺类)、Pyrimidines(嘧啶类)、Pyridines(吡啶类)、Aloisines 吡嗪(对二氮杂苯)、Hymenialdisine(HD)、三唑类、3-亚胺基-2-吡啶酮类衍生物等
非 ATP 竞争型抑制剂	Li 离子、TDZD(thiadiazolidinones)、M1 受体激动剂、AF102B 和 AF150、肽类化合物 p24、GBP、L803、丙戊酸等

2.3 糖原合成酶激酶-3 抑制剂在骨质疏松性疾病治疗中的作用

糖皮质激素能激活 GSK-3 β 的活性,促使 GSK-3 β 易于磷酸化并使 β -catenin 降解,所以糖皮质激

素能破坏成骨作用,某种程度上诱导骨质疏松中成骨细胞的减少。相反 GSK-3 抑制剂能抑制 GSK-3 β 的活性,使 β -catenin 在体内聚集促进骨细胞生长,上文提到已研发针对 GSK-3 的特异性抑制剂。体内抑制 GSK-3 β ,组蛋白脱乙酰酶以及蛋白酶体使 Wnt 信号增强并促使向成骨细胞分化,具有骨合成代谢活性。动物模型试验中 GSK-3 小分子抑制剂能够增加骨量,改善骨机械性能并减少骨折发生率^[24]。动物实验证明 LiCl 可以通过抑制 GSK-3 β 促进小鼠骨形成并增加小鼠骨量,崔猛以尾吊大鼠为研究对象用灌胃的方法给予 GSK-3 抑制剂 LiCl,分别于第 1 天和第 15 天使用双能 X 线骨密度测量仪测定大鼠左股骨骨密度;第 15 天处死大鼠取左胫骨近心端进行组织包埋切片,HE 染色,进行骨组织计量学测量;对大鼠右股骨进行三点弯曲实验,测量骨力学指标;采用 Western blot 观察骨组织中 β -catenin 蛋白的表达。结果显示骨密度、骨量、力学强度和 Wnt/ β -catenin 通道下游蛋白表达均优于对照组,说明 LiCl 能有效地预防大鼠骨质疏松症^[25]。Loiselle, Alayna E. 研究连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 在骨修复中作用时,使用敲除 Cx43 基因小鼠造骨折模型,GSK-3 抑制剂 LiCl 治疗组动物骨折修复部位骨量形成明显增加,机械强度也更强^[26]。出生后 6 月龄小鼠通过卵巢切除 4 周内发现骨小梁明显丢失,此间可以发现一个较高的骨转化表现,与绝经后妇女骨量丢失极其相似,通过上述方法建立骨质疏松模型,口服 GSK-3 抑制剂 LY603281-31-8 2 个月,可以明显增加卵巢切除小鼠的骨小梁厚度、数目,并增加骨小梁之间的联系,减少骨小梁的分离,力学分析显示与对照组相比,LY603281-31-8 显著增加了小鼠脊柱力量和强度^[27]。以上研究表明,通过抑制 GSK-3,可以增加骨量,GSK-3 抑制剂激活 Wnt/ β -catenin 通路可能是治疗骨质疏松症的潜在药物之一。

3 糖原合成酶激酶-3 抑制剂对骨细胞的作用

骨细胞分化成熟或凋亡障碍将会直接影响骨骼的重建,使骨形成骨吸收的耦联机制发生异常,破坏骨代谢平衡而引发骨量平衡失调疾病,OP 正是骨吸收作用远大于骨形成作用所致。骨髓间充质干细胞又称骨髓干细胞,体内和体外研究表明,在适当培养条件下,骨髓间充质干细胞具有向成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞分化的潜能,其成骨分化与成脂分化能

力之间的平衡是 OP 发生的原因之一;成骨细胞和破骨细胞也是参与骨代谢的重要角色,其分化成熟、功能活动以及凋亡决定了代谢过成中骨形成和骨吸收的程度,共同影响新骨的形成。GSK-3 β 是 β -catenin 在细胞质内被 Axin/APC/GSK-3 β 复合物磷酸化和降解的关键酶,GSK-3 抑制剂通过与 GSK-3 β 结合,阻止 GSK-3 β 在蛋白酶体中将 β -catenin 磷酸化降解,从而促进经典 Wnt/ β -catenin 通路表达,参与介导骨髓间充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞等各类骨细胞各阶段的生理功能,在骨细胞增殖、分化及凋亡过程中发挥重要作用,在骨质疏松症骨细胞修复中扮演了重要角色。

3.1 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种易于扩增、具有分化为各种不同细胞潜能的干细胞,它可分化为:脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、生肌细胞,甚至神经细胞等。在各种类型的骨质疏松症,如绝经后骨质疏松和老年性骨质疏松等研究中发现,随年龄增长,BMSCs 的成骨能力逐渐降低,而成脂分化能力则相对增强,在临床上则表现为骨质疏松患者的骨量减少与髓腔内的脂肪增多^[28]。因此提高骨质疏松症患者 BMSCs 增殖及成骨分化的能力,抑制其成脂分化是目前治疗骨质疏松性骨折的新途径。GSK-3 抑制剂作用于 BMSCs,激活 Wnt/ β -catenin 通道,上调 β -catenin 进而促进其增殖及成骨分化能力,成为治疗骨质疏松症的有效药物,为骨质疏松性疾病的治疗提供了新方向^[29]。Zhu, Zhenzhong 等人用 GSK-3 抑制剂 5mM LiCl 与 MSCs 细胞共培养,发现细胞增殖明显比没有用药物作用的对照组高,用另一种 GSK-3 抑制剂 SB216763 和小分子 RNA 手段干扰 GSK-3 β 活性手段也证实了抑制 GSK-3 β 活性可提高 MSCs 增值效率^[30]。Bain 等试验表明,在 C3H10T1/2 cells 中异位表达 β -catenin 或者采用 LiCl 激活 β -catenin 可以诱导 ALP mRNA 和蛋白的表达^[31]。KuLkarni 等分别在体内和体外研究了小分子 GSK-3 抑制剂 603281-31-8 对成骨细胞分化标志基因的影响,经 603281-31-8 处理的 C3H10T1/2 cells 在 β -catenin 表达升高的同时,成骨细胞分化标志基因 sialoprotein、collagen alpha1、OC、ALP、Runx2 表达明显升高,而去卵巢骨质疏松大鼠在口服 603281-31-8 后,大鼠股骨 collagens α (I)、 α (V)、biglycan、osteonectin、Runx2 mRNA 表达显著升高,表明 GSK-3 抑制剂可以作用于间充质细胞

系,调节 BMSCs 成骨分化^[24]。Masaki Arioka 等将 LiCl 与 C3H10T1/2 cells 共培养,证实了 LiCl 能够通过促进成骨细胞分化来增加骨代谢,动物实验中运用 Li₂CO₃ 局部作用于大鼠股骨骨缺损,通过 Micro CT 及组织形态学观察证实 Li⁺可促进骨组织的修复^[32]。De Bore 等分别采用 LiCl 和 Wnt3A 条件培养基刺激 hMSCs,发现低水平的 Wnt 信号抑制骨祖细胞增殖,高水平 Wnt 条件下,hMSCs 向脂肪细胞分化受到抑制,高度表达了成骨细胞分化标志物 ALP^[33]。Shuanhu Zhou 从 42 岁女性身上提取 hMSCs 细胞,用 GSK-3 抑制剂 LiCl 刺激 Wnt/ β -catenin 通道,使通道下游蛋白增加,也证实了 LiCl 可以促使 hMSCs 成骨分化同时抑制其成脂分化^[34]。

3.2 成骨细胞

成骨细胞(Osteoblasts)在骨修复过程中扮演着最直接最重要的角色。骨的形成是一个比较复杂的生物学过程,其主要特征是骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞,然后到成骨细胞的成熟,基质的形成和矿化,细胞质中的 GSK-3 β 能磷酸化 β -catenin 蛋白,不利于骨细胞生长代谢。GSK-3 抑制剂抑制了 GSK-3 β 活性,激活 Wnt/ β -catenin 通道,使得 β -catenin 蛋白增多进而促进成骨细胞的增殖、分化,从而促进骨的形成速率使骨量增加。Marsell R 体外用 GSK-3 抑制剂 AZD2858 与成骨细胞共培养,短时间内测定 β -catenin 含量较对照组增加,利用口服的方法对大鼠施以 AZD2858 治疗,每天口服剂量 20mg/kg,连续服用两个星期,建立空白对照组,结果显示 AZD2858 处理组与空白对照组相比,松质骨量明显增加,皮质骨也有较显著的变化,生物力学检测发现实验组椎体抗压强度和骨干骨三点弯曲测定抗弯强度均较对照组增强,组织学切片也证明了实验组骨量增加^[35]。C. Galli 研究 LiCl 在亲水性钛合金表面对骨髓间充质干细胞及成骨细胞分化增殖的影响,证实在 LiCl 作用下可以使 Wnt/ β -catenin 通道相关基因及蛋白表达增加,进而促进骨细胞的增殖、分化能力^[36]。Rika Nakanishi 研究证实了分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related protein 4 Sfrp4)可以抑制骨细胞的增殖,转 Sfrp4 基因小鼠模型表现出低骨密度形态,其中涉及 LiCl 作用于转 Sfrp4 基因小鼠可以修复低骨量状态,证明了 GSK-3 抑制剂的促进成骨细胞增殖作用^[37]。Armstrong 等研究液压力下骨质疏松动物模型长骨骨折修复过程中 Wnt/ β -catenin 通道的表达情况,其中使用 GSK-3

抑制剂 LiCl 抑制 GSK-3 β 活性,在体外将其与成骨细胞共培养,证实了 LiCl 通过抑制 GSK-3 β 活性,激活 Wnt/ β -catenin 通道,其下游蛋白 β -catenin 含量增多^[38]。

3.3 破骨细胞

破骨细胞(Osteoclasts)来源于单核巨噬细胞,是一种高度分化的多核巨噬细胞,直接参与骨吸收作用,是骨组织中行使骨吸收作用的唯一功能细胞^[39]。破骨细胞的分化成熟由成骨细胞直接调控,其经典调控途径是 OPG/RANKL/RANK 途径,成骨细胞可刺激分泌核激活因子受体配体 RANKL 与破骨细胞上面的核激活因子受体 RANK 相结合,从而促使破骨前体细胞融合成含有多个核细胞并将其活化,同时成骨细胞还可以分泌骨保护素 OPG 跟 RANKL 相结合,用以抑制 RANKL-RANK 系统之间的相互作用^[40]。Wnt/ β -catenin 通道可以在调控成骨细胞代谢的基础上,间接通过 OPG/RANKL/RANK 途径调控破骨细胞的增殖分化,李红丽用 50ng/ml RANKL 诱导 RAW264.7 为阳性对照组、空白为阴性对照组、转入 Ad-GFP 基因的 RAW264.7 为实验阴性组、转入 Ad- β -catenin 的 RAW264.7 细胞为实验组,结果显示转入 Ad- β -catenin 基因的 RAW264.7 细胞后能明显抑制破骨细胞的分化成熟,证明了 Wnt/ β -catenin 通道除了通过促进成骨分化、抑制成骨凋亡间接调节破骨细胞表达外,同时还可以直接抑制破骨细胞的分化成熟^[41]。在骨质疏松的环境下,破骨细胞的增殖及活性超出正常水平,使得骨质量下降,骨痂生长疏松,如何打破破骨细胞的这一作用机制,成为治疗骨质疏松性骨折的关键,Wnt/ β -catenin 通道可以直接和间接地调控破骨细胞分化成熟,GSK-3 抑制剂可以上调 β -catenin,进而调控破骨细胞代谢。Masaki Ariokaza 在将 LiCl 与前成骨细胞系 C3H10T1/2 cells 共培养的基础上,又将 LiCl 与前破骨细胞系 RAW-D cells 共培养,证实了 LiCl 能够促进成骨细胞分化同时抑制了破骨细胞分化成熟^[32]。

4 展望

综上所述,Wnt/ β -catenin 通道已经被证实与骨细胞代谢有着密切的联系,GSK-3 β 作为该通道中的关键酶更是在骨代谢调控上发挥着不可替代的作用,GSK-3 抑制剂作为一种通道调控物质,它在调节骨组织的代谢、骨折后骨痂的形成中扮演着重要的角色,但对于 GSK-3 抑制剂影响骨质疏松性疾病的

具体机制, 以及其与细胞间作用机理仍需要进一步研究, 另外, 使用 GSK-3 抑制剂有可能产生很多副作用, 应用到人身上时还需要做更多的临床研究。LiCl 是临床上用于双向情感障碍精神疾病的治疗药物, 把 GSK-3 抑制剂 LiCl 与骨组织工程材料结合到一起, 提高骨折修复材料在骨折愈合中的作用或许将成为骨质疏松性骨折治疗的一个新的研究方向。

【参 考 文 献】

- [1] Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1994, 9(8): 1137-1141.
- [2] Kanis JA, McCloskey EV, Harvey NC, et al. Intervention Thresholds and the Diagnosis of Osteoporosis [J]. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2015, 30(10): 1747-1753.
- [3] Mathavan N, Turunen MJ, Tagil M, et al. Characterising Bone Material Composition and Structure in the Ovariectomized (OVX) Rat Model of Osteoporosis [J]. *Calcified Tissue International*, 2015, 97(2): 134-144.
- [4] Silva AK, Yi H, Hayes SH, et al. Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway [J]. *Molecular vision*, 2010, 16: 36.
- [5] Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2006, 116(5): 1202-1209.
- [6] Saito-Diaz K, Chen TW, Wang XX, et al. The way Wnt works: Components and mechanism [J]. *Growth Factors*, 2013, 31(1): 1-31.
- [7] Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin [J]. *Embo J*, 2012, 31(12): 2714-2736.
- [8] Korvala J, Jüppner H, Mäkitie O, et al. Mutations in LRP5 cause primary osteoporosis without features of OI by reducing Wnt signaling activity [J]. *BMC medical genetics*, 2012, 13(1): 26.
- [9] Morimoto M, Kerouedan O, Gendronneau M, et al. Dental abnormalities in Schimke immuno-osseous dysplasia [J]. *Journal of dental research*, 2012, 91(7 suppl): S29-S37.
- [10] Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, et al. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation [J]. *Bone*, 2009, 44(5): 805-812.
- [11] Minear S, Leucht P, Jiang J, et al. Wnt proteins promote bone regeneration [J]. *Science translational medicine*, 2010, 2(29): 29ra30-29ra30.
- [12] Laine CM, Chung B-D, Susic M, et al. Novel mutations affecting LRP5 splicing in patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) [J]. *European Journal of Human Genetics*, 2011, 19(8): 875-881.
- [13] Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD. Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(21): 14117-14125.
- [14] Glass DA, II, Karsenty G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 73, 2006, 73: 43-+.
- [15] Gaur T, Wixted JJ, Hussain S, et al. Secreted frizzled related protein 1 is a target to improve fracture healing [J]. *Journal of cellular physiology*, 2009, 220(1): 174-181.
- [16] Padhi D, Jang G, Stouch B, et al. Single dose, placebo controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, 26(1): 19-26.
- [17] Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen Synthase Kinase 3 from Rabbit Skeletal Muscle [J]. *European Journal of biochemistry*, 1980, 107(2): 519-527.
- [18] Steinbrecher KA, Wilson W, Cogswell PC, et al. Glycogen synthase kinase 3 beta functions to specify gene-specific, NF-kappa B-dependent transcription [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(19): 8444-8455.
- [19] Takahashi-Yanaga F. Activator or inhibitor? GSK-3 as a new drug target [J]. *Biochemical pharmacology*, 2013, 86(2): 191-199.
- [20] Ribas J, Bettayeb K, Ferandin Y, et al. 7-bromindirubin-3-oxime induces caspase-independent cell death [J]. *Oncogene*, 2006, 25(47): 6304-6318.
- [21] Patel DS, Bharatam PV. Selectivity criterion for pyrazolo [3,4-b] pyrid [az] ine derivatives as GSK-3 inhibitors: CoMFA and molecular docking studies [J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2008, 43(5): 949-957.
- [22] Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2004, 3(6): 479-487.
- [23] Tsai L-K, Leng Y, Wang Z, et al. The mood stabilizers valproic acid and lithium enhance mesenchymal stem cell migration via distinct mechanisms [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(11): 2225-2237.
- [24] Kulkarni NH, Onyia JE, Zeng Q, et al. Orally Bioavailable GSK 3 α / β Dual Inhibitor Increases Markers of Cellular Differentiation In Vitro and Bone Mass In Vivo [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, 21(6): 910-920.
- [25] Cui M, Niu Y, Liu G, et al. Protective effects of lithium chloride on bone loss in hindlimb unloading rats [J]. *Acta Academiae Mediciniae Militaris Tertiae*, 2010, 32(14): 1512-1515.
- [26] Loiselle AE, Lloyd SAJ, Paul EM, et al. Inhibition of GSK-3 beta Rescues the Impairments in Bone Formation and Mechanical Properties Associated with Fracture Healing in Osteoblast Selective Connexin 43 Deficient Mice [J]. *Plos One*, 2013, 8(11): 10.
- [27] Guo X, Wang X-F. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways [J]. *Cell research*, 2009, 19(1): 71-88.

- [28] Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, et al. Playing with bone and fat [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2006, 98(2): 251-266.
- [29] Gambardella A, Nagaraju CK, O'Shea PJ, et al. Glycogen synthase kinase $3\alpha/\beta$ inhibition promotes in vivo amplification of endogenous mesenchymal progenitors with osteogenic and adipogenic potential and their differentiation to the osteogenic lineage [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, 26(4): 811-821.
- [30] Zhu Z, Yin J, Guan J, et al. Lithium stimulates human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation through GSK 3β dependent β catenin/Wnt pathway activation [J]. *FEBS Journal*, 2014, 281(23): 5371-5389.
- [31] Bain G, Müller T, Wang X, et al. Activated β -catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003, 301(1): 84-91.
- [32] Arioka M, Takahashi F, Sasaki M, et al. Acceleration of bone regeneration by topical application of GSK-3 inhibitor [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2014, 124: 95P-95P.
- [33] De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Tissue engineering*, 2004, 10(3-4): 393-401.
- [34] Zhou SH, Eid K, Glowacki J. Cooperation between TGF- β and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, 19(3): 463-470.
- [35] Marsell R, Sisask G, Nilsson Y, Sundgren-Andersson AK, Andersson U, Larsson S, et al. GSK-3 inhibition by an orally active small molecule increases bone mass in rats [J]. *Bone*, 2012, 50(3): 619-627.
- [36] Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, et al. GSK3 β -inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces [J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2013, 24(8): 921-927.
- [37] Nakanishi R, Akiyama H, Kimura H, et al. Osteoblast Targeted Expression of Sfrp4 in Mice Results in Low Bone Mass [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2008, 23(2): 271-277.
- [38] Armstrong VJ, Muzylak M, Sunter A, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20715-20727.
- [39] Charles JF, Hsu L-Y, Niemi EC, et al, Aliprantis AO, Nakamura MC. Inflammatory arthritis increases mouse osteoclast precursors with myeloid suppressor function [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122(12): 4592.
- [40] Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, et al. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(33): E2197-E2204.
- [41] Li H, Lu Y, Shen L, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway in inhibition of Raw264.7 cell differentiation [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2013, 33(9): 1155-1159.

(收稿日期: 2016-03-04; 修回日期: 2016-05-15)

欢迎投稿 欢迎订阅
邮发代号 82 - 198