

双膦酸盐的作用机制和急性时相反应

范靖雪 姜礼红* 孟佳 朱秀英 陶天遵
哈尔滨医科大学附属第二医院, 哈尔滨 150001

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016)09-1216-05

摘要: 双膦酸盐类药物是无机焦磷酸盐人工合成的类似物,对于骨组织具有非凡的选择性。双膦酸盐可分为两种作用模式:不含氮的双膦酸盐通过整合到三磷酸腺苷不可水解的类似物中,引起破骨细胞凋亡;含氮的双膦酸盐通过抑制 FPP 合酶,使 APPPI 积累以及抑制蛋白质的异戊烯化,引起破骨细胞凋亡。双膦酸盐能有效抑制骨吸收,减少骨骼相关事件的发生率和恶性肿瘤的骨转移等。同时也发现了一些双膦酸盐的不利影响,其中双膦酸盐引起的急性时相反应,症状普遍见于初始使用的患者中,仅为轻微短暂的流感样症状,包括发热、乏力和肌肉疼痛等,这种非特殊生理性反应与提高了炎症因子的水平有关。本文将详细论述双膦酸盐的作用机制和急性时相反应。

关键词: 双膦酸盐; 构效关系; 作用机制; 急性时相反应

Mechanisms of action and acute phase responses of bisphosphonates

FAN Jingxue, JIANG Lihong, MENG Jia, ZHU Xiuying, TAO Tianzun

The 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: JIANG Lihong, Email: jianglihong2006@163.com

Abstract: Bisphosphonates are synthetic analogs of inorganic pyrophosphates with high avidity for bone. Bisphosphonates can be classified into two modes of action: non-nitrogen containing bisphosphonates are incorporated into non-hydrolysable analogues of adenosine triphosphate, which induce osteoclast apoptosis; nitrogen-containing bisphosphonates inhibit FPP synthesis which can cause osteoclast apoptosis through two routes, inhibition of protein prenylation and accumulation of ApppI. Bisphosphonates are effective in decreasing bone resorption, the incidence of skeletal related events, and bone metastases of malignant tumors et al. However, adverse effects of bisphosphonates have been observed, which can be associated with acute phase responses generally only occur on first exposure to the drug, a nonspecific physiologic reaction associated with increased levels of inflammatory cytokines, involve only slight transient flu like symptoms including fever, fatigue and myalgia et al. This article will discuss the mechanisms of action and the acute phase responses of bisphosphonates in details.

Key words: Bisphosphonates; Structure activity relationships; Mechanisms of action; Acute phase responses

双膦酸盐在 1969 年二膦酸盐生物效应第一次完整的发表后更名为双膦酸盐。20 世纪 60 年代初, Fleisch 等^[1]发现了血浆及尿液中有抑制异位钙化作用的焦磷酸盐,由此得到启发而合成了焦磷酸盐的类似物双膦酸盐。焦磷酸盐在体内易于水解,故用 P-C-P 结构取代了 P-O-P 结构(图 1),形成了在体内不易水解且对其他化学试剂也相对稳定的化合物—双膦酸盐。双膦酸盐的早期应用主要是作为腐蚀抑制剂,以及纺织、化肥和石油工业中的螯合剂,后在口腔科用于去除牙齿污垢。过去的 40 年间,双膦酸盐已经彻底改变了骨吸收疾病患者的治

疗。如今在临床中,双膦酸盐用来治疗恶性肿瘤的骨转移、Paget's 病、高钙血症,特别是在骨质疏松的治疗方面尤为重要,并且在骨科的其他领域也有许多重要的作用^[2]。双膦酸盐类药物能够减少骨痛及骨折的发生率,能够显著提高病人的生活质量,降低死亡率^[3]。

1 双膦酸盐的构效关系

双膦酸盐是高级性的药物,口服吸收效果差,生物利用度低,但吸收较快,双膦酸盐类药物的血浆半衰期短,但在骨组织中半衰期较长,可存留数月甚至数年之久,这主要与骨骼自身的更新速度有关,大部分双膦酸盐分布于骨形成及骨溶解活跃的部位。当前

* 通讯作者: 姜礼红, Email: jianglihong2006@163.com

临床应用的双膦酸盐都具有两个 P-C 键,通过单一的 C 连接(图 1),得到以 P-C-P 为核心的双膦酸盐结构。双膦酸盐磷酸基团上的氧原子能够与骨矿物形成双齿配位螯合而发挥活性,因此 P-C-P 结构对羟基磷灰石有强大的亲和力。另外碳原子上还有 R1、R2 两条侧链,R1 侧链主要参与双膦酸盐分子与骨矿物的结合,决定了双膦酸盐在人体内能否快速并选择性地结合于骨矿物表面,通常为羟基(羟基是抑制骨吸收的主要功能结构,除氯屈膦酸盐 R1 = R2 = Cl 和替鲁膦酸盐 R1 = H 外),能够与骨矿物形成三齿配位螯合,因此大大增强了双膦酸盐与骨矿物的亲和力;R2 侧链的结构决定了双膦酸盐药物抗骨吸收的能力,侧链的长短对双膦酸盐的活性十分重要,一个合适的侧链长度能够增强药物的脂溶性、稳定性和生物利用度^[4]。由于 R2 侧链的不同形成了不同种类的双膦酸盐,导致其对骨吸收的抑制作用不同。根据 R2 侧链上是否含氮原子将双膦酸盐分为两类:含氮的双膦酸盐及不含氮的双膦酸盐。含氮的双膦酸盐能更有效的抑制破骨细胞活动,显著增强双膦酸盐的活性,是不含氮双膦酸盐抑制骨吸收能力的 10 到 10000 倍。虽然 R2 侧链的结构被认为是抗吸收作用的主要因素,两个磷酸基团也是药物药理活性所必需的。若将其中 1 个磷酸基团取代,所得产物的抗骨吸收能力远低于双膦酸盐。单膦酸盐,例如戊烷单膦酸盐或 P-N-P 或 P-C-C-P 化合物的抗骨吸收能力基本上是无效的^[1]。

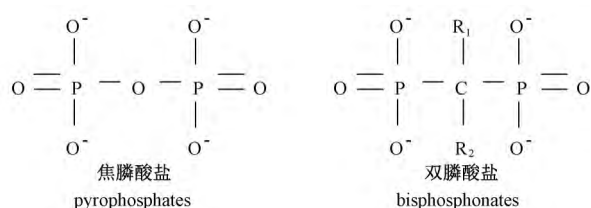


图 1 焦磷酸盐与双膦酸盐结构比较

Fig. 1 The structure of pyrophosphates and bisphosphonates

2 双膦酸盐的作用机制

2.1 细胞内摄取

双膦酸盐相比其他组织对于骨组织显著的选择性,是临床应用中有效性和安全性的基础。双膦酸盐类药物在骨骼中优先摄取,通过吸附于骨矿物表面,防止它们长时间暴露于其他细胞^[5]。双膦酸盐能以多种方式影响破骨细胞介导的骨吸收,包括对破骨细胞聚集、分化和吸收活性的影响及诱导细胞凋亡。骨吸收过程中,破骨细胞通过细胞膜褶皱缘

中空泡型质子泵的作用使亚细胞空间酸化,微环境的酸性,使骨矿物的羟基磷灰石溶解,双膦酸盐在破骨细胞的低 pH 环境中从骨矿物表面解离,通过胞吞作用进入破骨细胞,形成双膦酸盐的细胞内摄取。

双膦酸盐主要作用于成熟的破骨细胞。成熟的破骨细胞是由造血起源的单核前体细胞的融合形成的,双膦酸盐还可通过抑制破骨细胞形成而抑制骨吸收。双膦酸盐抑制破骨细胞前体细胞向骨表面游走和聚集,并可抑制它们继续向多核细胞分化^[6]。研究表明,一些双膦酸盐可以抑制人骨髓体外培养物中的破骨细胞样细胞的形成。并且在器官培养中,双膦酸盐可通过抑制破骨细胞前体细胞的融合来抑制成熟破骨细胞的生成。其机制可能是阻止破骨细胞前体细胞识别骨基质中刺激破骨细胞成熟所必需的一些因子。

双膦酸盐对成骨细胞也有一定的作用。与诱导破骨细胞凋亡的作用相反,双膦酸盐能够阻止体外和体内成骨细胞的凋亡(如糖皮质激素引起时)。这种促存活作用是连接蛋白 43 半通道的开放,导致 Src 激酶和细胞外信号调节激酶(ERKs)的激活,随后 ERKs 的细胞质靶点—P90RSK 激酶及其底物 BAD 和 C/EBPβ 的磷酸化,使细胞凋亡抑制^[7]。

2.2 生化作用

不含氮的双膦酸盐,如氯屈膦酸盐和依替膦酸盐结构上最接近焦磷酸盐(Pi),在氨酰 tRNA 合成酶的作用下,能够更好地整合到酶活性位点替代 Pi。它们通过整合到三磷酸腺苷(ATP)不可水解的类似物中,使氨酰 tRNA 合成酶的作用逆转,所得代谢物中含有 P-C-P 部分代替 ATP 的 β、γ 磷酸基团,从而形成了不可水解的 AppCp 型核苷酸。AppCp 型核苷酸在细胞内积聚可抑制许多细胞内代谢酶,对破骨细胞产生毒性效应,影响细胞功能并诱导破骨细胞凋亡从而抑制骨吸收。AppCp 型核苷酸能干扰线粒体 ATP 转移酶(如腺嘌呤核苷酸移位酶 ANT),如氯屈膦酸盐形成的 AppCCl₂p 能抑制 ANT 作用,导致线粒体内膜超极化使线粒体膜电位失活,通透性发生改变,使 caspase-3 活化导致 MST-1 这种促凋亡酶裂解,诱导破骨细胞凋亡^[8]。不含氮的双膦酸盐对于骨组织的靶向作用和选择性的通过破骨细胞吸收,使双膦酸盐选择性地诱导破骨细胞凋亡。

含氮的双膦酸盐如阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐和唑来膦酸盐等抑制骨吸收的效果比不含氮的双膦酸盐高几个数量级,但不像不含氮的双膦酸盐代谢为 AppCp 型核苷酸。它们干扰特定的代谢反应,特别

是甲羟戊酸途径。双膦酸盐能够不同程度的抑制该途径的几种酶,其主要分子靶标是甲羟戊酸途径中的法尼基焦磷酸合酶(FPPS)。含氮的双膦酸盐模仿 FPPS 的天然类异戊烯焦磷酸底物 GPP/DMAPP 的结构和竞争 GPP/DMAPP 底物酶结合位点,从而能抑制 FPPS 的活性^[9]。

2.3 甲羟戊酸途径

甲羟戊酸途径的主要功能是合成胆固醇以及异戊烯脂质如法尼基二磷酸(FPP)和龙牛儿基龙牛儿基二磷酸(GGPP)。这些异戊烯脂质是各种代谢产物的组成部分,法尼基化和龙牛儿基龙牛儿基化的蛋白主要是小 GTP 酶的信号蛋白。异戊烯化需要的这些蛋白质的准确功能,有助于锚定细胞膜上的蛋白以及与其它蛋白质的相互作用^[10]。FPPS 的抑制可阻止 FPP 和 GGPP 的合成,从而阻止小 GTP 酶的异戊烯化。异戊烯化小 GTP 酶例如 Ras、Rho、Rac、Cdc42 和 Rab 家族是调节破骨细胞多种细胞过程的重要信号蛋白,甲羟戊酸途径的抑制,导致异戊烯化蛋白的丢失,双膦酸盐通过间接抑制小 GTP 酶的异戊烯化,导致破骨细胞骨架结构破坏、褶皱缘丢失、肌动蛋白环破坏、改变囊泡运输等进而诱导破骨细胞凋亡。

阻止小 GTP 酶异戊烯化的同时,含氮的双膦酸盐对于 FPPS 的抑制引起 IPP—甲羟戊酸途径中 FPPS 上游代谢物的立即积累。IPP 的积累是氮结合双膦酸盐引起急性时相反应的原因之一。IPP 在细胞内积累,氨酰基-tRNA 合成酶能偶联 IPP 与 AMP 形成了新的代谢产物 APPPI。APPPI 也能抑制线粒体 ANT,从而引起破骨细胞凋亡^[11]。因此含氮的双膦酸盐通过抑制 FPP 合酶,使 APPPI 积累以及抑制蛋白质的异戊烯化,进而引起破骨细胞凋亡抑制骨吸收。

3 双膦酸盐和急性时相反应

双膦酸盐类药物虽然在抗骨吸收方面有重要作用,但也产生一定的药物特殊毒性,其中包括急性时相反应(APR),一种非特异性生理和生物化学免疫反应对于全身系统的攻击(例如组织损伤、感染、和恶性肿瘤等)。APR 可以通过诱发神经内分泌、造血干细胞、新陈代谢和肝脏系统的变化来恢复生理平衡。这种反应普遍持续 1~2d,并经常伴随一些短暂的临床症状包括发热、轻微的流感样症状,像劳累、乏力、胃部不适、肌肉关节疼痛和淋巴细胞减少等。在 APR 期间,从巨噬细胞谱系衍生出的巨噬细

胞和破骨细胞,在最开始受到攻击时被致敏和活化,释放出大量的炎症介质,包括肿瘤坏死因子- α 、白介素-1、白介素-6。这些细胞因子的级联反应导致了炎症反应,升高了体温,使肝脏产生各种蛋白质(统称为急性时相反应蛋白)^[12]。人体中两类比较重要的急性时相反应蛋白为 C-反应蛋白(CRP)一种炎症反应广义的血浆标志物,另一种为血清淀粉样蛋白-A,在 APR 期间,他们都可以增加至正常水平的 1000 倍以上。

应用含氮的双膦酸盐后,通过刺激单核细胞、巨噬细胞和活化的 T 细胞(主要是 $\gamma\delta$ T 细胞^[13])(图 2)有引发急性时相反应的潜在风险,产生短暂的促炎症细胞因子的释放。研究表明使用双膦酸盐后都会产生一个高水平的细胞因子像白介素-1、白介素-6、肿瘤坏死因子- α 等和急性时相反应蛋白包括 C-反应蛋白和弹性蛋白酶等。虽然几乎所有的含氮的双膦酸盐都会产生急性时相反应,但就产生这种反应的细胞因子和急性时相反应蛋白的种类,对于淋巴细胞的影响和炎症反应的本质都存在着一些差异。

与含氮的双膦酸盐不同,不含氮的双膦酸盐可能会有与急性时相反应无关的一定抗炎作用。实验发现,将两类药物联合应用可能会获得更好的疗效。将氯屈膦酸盐(不含氮的双膦酸盐)用于细胞或动物时,不仅逆转了含氮双膦酸盐的促炎症反应,同时加强了阿仑膦酸盐抑制骨吸收的能力。此外,含氮的双膦酸盐和他汀类药物通过不同的靶点都会抑制甲羟戊酸途径,含氮的双膦酸盐抑制甲羟戊酸途径促使炎症反应代谢产物积累,激活 T 细胞产生致炎细胞因子,最终产生了急性时相反应。他汀类药物通过抑制甲羟戊酸途径早期的关键酶—HMGCoA 还原酶,可以预防 IPP 的积累,防止致炎因子的产生,从而阻断急性时相反应。此外,他汀类药物还能通过调节骨形成蛋白(BMP)-2 促使骨细胞增殖分化,改善骨骼微结构^[14],以及抑制破骨细胞活性而促进骨形成。

急性时相反应在唑来膦酸盐等含氮的双膦酸盐中都有过报道,然而在氯屈膦酸盐等不含氮原子的膦酸盐中未曾报道过。随着不断发展,第三代含有杂环结构的含氮双膦酸盐的代表伊班膦酸盐和唑来膦酸盐,其抗骨吸收能力进一步提高,强效、安全且方便的特点,使其成为目前临床应用广泛的抗骨吸收药物。但是其在临床实践中引起急性时相反应似乎比试验中更为常见^[15]。大部分病人在接受含氮

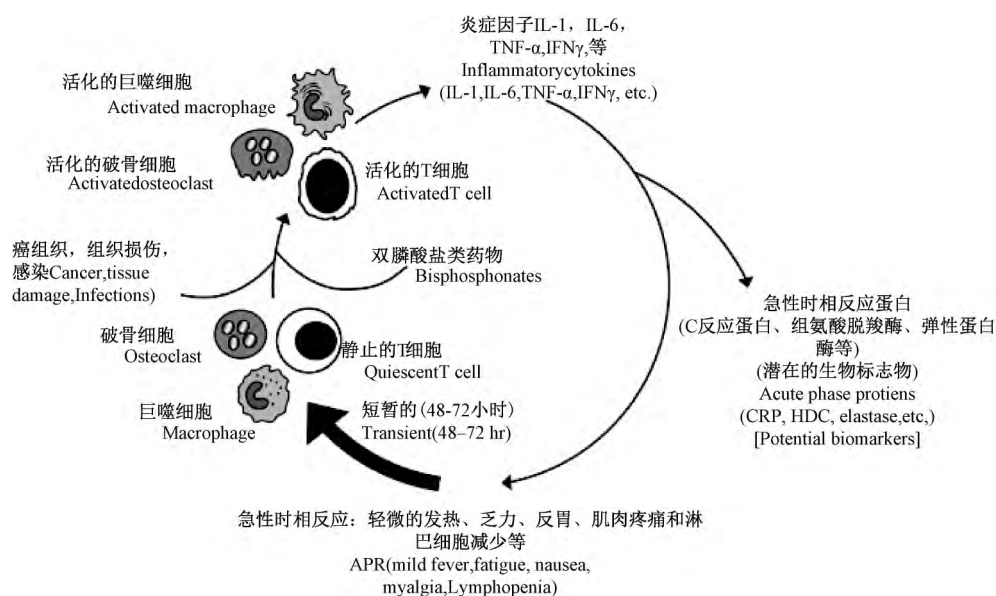


图 2 双膦酸盐引起急性时相反应的原理图

Fig. 2 Schematic diagram of aminobisphosphonate-induced acute phase responses

的双膦酸盐的治疗时会产生急性时相反应,主要发生在首次注射之后,很少发生于后续的给药过程及口服的给药方式。急性时相反应在双膦酸盐给药后的 28 ~ 36h 最明显,持续时间基本上都小于 72h。这种急性时相对不同的含氮的双膦酸盐呈剂量依赖性,并且与它们抗骨吸收的活性有关,因此并不是所有的含氮的双膦酸盐都会引起相同程度的急性时相反应,而且第二次应用双膦酸盐的患者,即使加大用药剂量也很少发生上述急性时相反应,这可能与第二次用药的患者对急性时相反应不敏感有关,也可能与双膦酸盐在骨组织中长期保留有关。这种急性反应通常是良性且自限的,可使用小剂量地塞米松^[16]及非甾体类抗炎药物如 COX-2 高选择性抑制剂塞来昔布^[17]通过不同的途径阻断炎症反应的发生,进而改善相关症状。除急性时相反应外,在使用双膦酸盐治疗的不良事件中,最严重的是肾毒性,还可引起一些严重的不良事件如:胃肠道反应、食管癌、房颤、低钙血症及下颌骨坏死等^[18]。

4 小结

双膦酸盐发现 40 多年间使骨疾病的治疗有了新的进展。多年来对构效关系、作用机制以及相关不良反应的研究使我们对双膦酸盐的独特性能有了更好的了解。虽然双膦酸盐的临床疗效是确切的,但是不能盲目应用,应准确掌握好适应症。充分做好用药前准备对预防不良反应是必要的,如用药前计算患者的肌酐清除率,还可通过用药前充分的水

化,补充足量的钙和维生素 D,预防性使用小剂量地塞米松或非甾体抗炎药以及加强用药期间的护理等措施来预防双膦酸盐引起的急性时相反应。双膦酸盐在骨质疏松及肿瘤的骨转移等疾病的治疗中还应注重序贯治疗。双膦酸盐类药物开始作为简单的化学品,用于非生物的用途,到目前至少有 10 余种双膦酸盐在各个国家不同的临床应用注册。相信未来更多、更有效、副作用更小的双膦酸盐类药物将被研发并应用于临床各种骨疾病的治疗,双膦酸盐的发展也将会用于其他更广阔的领域。

【参考文献】

- [1] Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years [J]. Bone, 2011, 49(1): 2-49.
- [2] 曲新华,郝永强. 双膦酸盐在骨科相关疾病治疗中的地位及再认识[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(1): 78-80.
Qu XH, Hao YQ. Status and thinking of bisphosphonates in the treatment of orthopedic-related diseases [J]. Chin J Orthop, 2014, 34(1): 78-80. (in Chinese)
- [3] 夏维波. 双膦酸盐可能降低死亡率[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2014, 7(2): 179-184.
Xia WB. Effects of bisphosphonates on reduced mortality risk [J]. Chin J Osteoporosis & Bone Mineral Res, 2014, 7(2): 179-184. (in Chinese)
- [4] Schilcher J, Koeppen V, Aspenberg P, et al. Risk of atypical femoral fracture during and after bisphosphonate use [J]. New England Journal of Medicine, 2014, 371(10): 974-976.
- [5] Roelofs A J, Coxon F P, Ebetino F H, et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone

- marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. [J]. Journal of Bone & Mineral Research the Official Journal of the American Society for Bone & Mineral Research, 2010, 25 (3): 606-16.
- [6] Hughes D E, Wright K R, Uy H L, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. J Bone Miner Res 10: 1478-1487 [J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2009, 10(10): 1478-87.
- [7] Plotkin L I, Aguirre J I, Kousteni S, et al. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. [J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(8): 7317-25.
- [8] Rondeau J, Bitsch F, Bourcier E, et al. Structural Basis for the Exceptional in vivo Efficacy of Bisphosphonate Drugs [J]. Chemmedchem, 2006, 1(2): 267-273.
- [9] Ebtino F H, Hogan A M L, Shuting S, et al. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. [J]. Bone, 2011, 49(1): 20-33.
- [10] Ory S, Brazier H, Pawlak G, et al. Rho GTPases in osteoclasts: Orchestrators of podosome arrangement [J]. European Journal of Cell Biology, 2008, 87(8-9): 469-77.
- [11] Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, et al. A new endogenous ATP analog (AppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates [J]. British Journal of Pharmacology, 2006, 147(4): 437-45.
- [12] Karin O, Catherine V P. Significance and impact of bisphosphonate-induced acute phase responses. [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2012, 82(3): 1098-1107.
- [13] De Santis M, Cavaciocchi F, Ceribelli A, et al. Gamma-delta T lymphocytes and 25-hydroxy vitamin D levels as key factors in autoimmunity and inflammation: the case of zoledronic acid-induced acute phase reaction [J]. Lupus, 2015, 24(4-5): 442-447.
- [14] Ruan F, Zheng Q, Wang J. Mechanisms of bone anabolism regulated by statins [J]. Bioscience reports, 2012, 32(6): 511-519.
- [15] Sieber P, Lardelli P, Kraenzlin C A, et al. Intravenous bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: safety profiles of zoledronic acid and ibandronate in clinical practice [J]. Clinical drug investigation, 2013, 33(2): 117-122.
- [16] 邓伟明, 潘霞, 黄志祥, 等. 预防性地塞米松使用对唑来膦酸治疗早期不良反应的影响 [J]. 临床医学工程, 2015, 22(9): 1183-1184.
- Deng WM, Pan X, Huang ZX et al. Effect of Prophylactic Use of Dexamethasone on Incidence of Early Adverse Reactions of Zoledronic Acid Treatment [J]. Clinical Medicine & Engineering, 2015, 22(9): 1183-1184. (in Chinese)
- [17] 刘红, 罗灵光, 覃保瑜, 等. 塞来昔布预防唑来膦酸治疗老年性骨质疏松症不良反应的疗效观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(1): 91-94.
- Liu H, Luo LG, Qin BY, et al. The efficacy of celecoxib in preventing the adverse reaction of zoledronic acid in the treatment of senile osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2016, 22(1): 91-94. (in Chinese)
- [18] 黄诚, 王诗尧, 翁习生. 双膦酸盐类药物在临床应用中的进展 [J]. 实用骨科杂志, 2016, 1(1): 39-42.
- Huang C, Wang SR, Weng XS. Progress of bisphosphonates in clinical application [J]. Journal of Practical Orthopaedics, 2016, 1(1): 39-42. (in Chinese)
- (收稿日期: 2016-03-23, 修回日期: 2016-05-09)

欢迎订阅中国骨质疏松杂志
邮发代号: 82-198