

• 综述 •

# 骨关节炎治疗靶点 p38MAPK 信号通路研究进展

于波 朱振安

**摘要** p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在正常软骨细胞生理及骨关节炎病理进程中起重要的调控作用。p38MAPK 可调控软骨细胞增殖、生存,细胞外基质代谢平衡,在基质金属蛋白酶、促炎症因子等导致的骨关节炎软骨退变病理进程中具有关键作用。深入研究 p38MAPK 信号通路与骨关节炎的关系,有助于为骨关节炎防治研究开辟新途径。该文就 p38MAPK 信号通路作为骨关节炎治疗靶点的近年研究进展作一综述。

**关键词** 关节软骨;p38 丝裂原活化蛋白激酶;骨关节炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-7083.2011.06.001

骨关节炎(OA)是一种常见的以关节软骨进行性退变为典型特征的慢性关节疾病。力学、遗传和老化等因素均会导致 OA,其中老化是最主要的原因。OA 具有炎症的体征和症状,如关节疼痛、肿胀和僵硬,导致明显的功能受限和残疾<sup>[1]</sup>。然而,OA 患者滑液中缺少嗜中性粒细胞,缺少全身性炎症临床表现,因此 OA 并非严格意义上的炎性关节病。病理学研究认为,软骨细胞的去分化、凋亡以及基质降解酶合成增加,导致软骨分解合成细胞外基质不平衡,并最终导致软骨退变,如关节表面软化、抗张强度及Ⅱ型胶原和蛋白聚糖含量下降。

OA 滑膜和软骨细胞分泌的促炎症因子,如白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 等在 OA 病理进程中起积极作用,可上调软骨细胞和滑膜细胞内前列腺素(PG)E<sub>2</sub>、基质金属蛋白酶(MMP)等表达<sup>[2]</sup>。MMP 是 OA 软骨结构性退变的介质之一,因此抑制 MMP 的合成和活化是治疗 OA 的关键。但广谱 MMP 抑制剂没有减缓 OA 病理进程,而是表现出对肌肉骨骼的剂量依赖性毒副作用<sup>[3]</sup>。直接抑制 MMP 活性的一个选择,就是将调控 MMP 的信号转导通路作为治疗靶点。近年研究发现,p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)可调控软骨细胞的增殖、生存,细胞外基质合成和产生疼痛介质,而且 p38MAPK 主要由炎症和应力诱导信号激活,因而被视为治疗 OA 的潜在靶点。

## 1 p38MAPK 信号通路生物学特性

p38MAPK 属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是一类分布于胞质中具有丝氨酸和酪氨酸双重磷酸化能力的蛋白激酶。p38MAPK 信号转导通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程,并与炎症、应激反应的

调控密切相关,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路。

p38MAPK 只有在苏氨酸(Thr180)和酪氨酸(Tyr182)双位点同时被磷酸化时才具有全部活性。这两个邻近的磷酸化位点之间被一氨基酸分开,形成“Thr-Xaa-Tyr”三肽基结构。它是决定激酶活性的关键结构,其长度影响 p38MAPK 底物特异性,并在控制其自主磷酸化上起重要作用<sup>[4]</sup>。p38 主要有 4 个亚型,即 p38 $\alpha$ 、p38 $\beta$ 、p38 $\gamma$  和 p38 $\delta$ ,其中 p38 $\alpha$  和 p38 $\beta$  又分为 p38 $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2、p38 $\beta$ 1/ $\beta$ 2 两种异构体。各同源激酶的氨基酸序列非常相近,均包含有“Thr-Xaa-Tyr”三肽序列,但同源激酶之间的组织分布不同,p38 $\alpha$  和 p38 $\beta$  广泛分布于各种组织,p38 $\gamma$  主要存在于骨骼肌,p38 $\delta$  主要存在于肺、肾、睾丸和胰腺等组织。而且,p38MAPK 不同亚型对上游激酶具有一定的选择作用,对下游底物的作用也不尽相同,这可能与不同细胞内机制的调节有关。

细胞外的多种应激原,如紫外线照射、细胞外高渗透压、放射线、炎症细胞因子(如 TNF- $\alpha$  和 IL-1)、生长因子、热休克因子、细菌病原体及其产物等均可将其激活,通过高度保守且较复杂的 3 级激酶“级联”程序转导信号<sup>[5]</sup>。不同亚型的 p38MAPK 可被不同的介质激活,产生不同的生物学效应,而且不同亚型对相同刺激的反应也不相同,构成复杂而多变的信号转导通路网络。p38MAPK 被磷酸化激活后,移位入核或转移到其他部位,作用到细胞内相应的目标并发挥调节作用。p38MAPK 下游底物对于确定 p38MAPK 生理功能很重要,活化转录因子(ATF)2、C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白(CHOP)10 和转录因子肌细胞增强因子(MEF)2C 是 p38MAPK 的主要作用底物。磷酸化 ATF2 可调节包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等多种炎症细胞因子在内的基因表达。MEF2C 磷酸化使转录因子 c-Jun 转录增加,从而增加其表达。炎症状态下磷酸化的 c-Jun 可以与许多细胞因子启动子区的激活蛋白(AP)-1 位点结合,从而使炎症相关基因表达增强,在炎症过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。

基金项目:国家自然科学基金(30973038)、国家青年自然科学基金(81001529)、山东省自然科学基金(Q2008C18)、上海教委重点学科建设基金(J50206)

作者单位:200011, 上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科、上海市骨科内植物重点实验室(于波、朱振安);250014 济南, 山东中医药大学附属医院骨科(于波)

通信作者:朱振安 Email:zhuzhenan2006@126.com

## 2 p38MAPK 在 OA 中的作用

有研究证实 OA 患者软骨内 MAPK 激活,至少是细胞外信号调节激酶(ERK)在 OA 软骨退变进程中起到的关键性作用,OA 患者软骨内活化的 c-Jun 氨基端激酶(JNK)较正常增多。Fan 等<sup>[7]</sup>研究表明,与 ERK 相同,OA 患者软骨内磷酸化 p38 含量较正常组织明显升高。Boileau 等<sup>[8]</sup>观察显示,犬 OA 动物模型中 ERK1/2、JNK 和 p38 含量均较正常组织明显升高。Rasheed 等<sup>[9]</sup>报道在 OA 软骨细胞内检测到 p38 $\alpha$ 、p38 $\gamma$  和 p38 $\delta$  表达,而 p38 $\beta$  未见表达;IL- $\beta$  可提高 p38 $\alpha$ 、p38 $\gamma$  的磷酸化,但对 p38 $\delta$  无作用。

MAPK 信号通路在调控软骨细胞分泌 MMP 中起关键作用<sup>[7]</sup>。OA 发病过程中产生的软骨基质碎片,如纤连蛋白<sup>[10]</sup>和胶原蛋白<sup>[11,12]</sup>会刺激软骨细胞分泌 MMP,这一进程需要 MAPK 参与。Loeser 等<sup>[10]</sup>研究表明,II型胶原与盘状结构域受体结合诱导 MMP 表达时,p38MAPK 起关键性作用;阻断任何一种 MAPK,均可抑制纤连蛋白诱导 MMP-13 表达。Xu 等<sup>[11]</sup>研究发现,只有 p38 阻断剂可抑制纤连蛋白诱导的 MMP13 表达。与之相似的研究<sup>[13,14]</sup>表明,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导 MMP-13 表达,也需要 ERK、p38 和 JNK 的参与。Hamamura 等<sup>[15]</sup>研究表明,p38 具有调控人软骨细胞 MMP-13 的作用。

p38MAPK 也参与调控软骨细胞的合成代谢。Masuko 等<sup>[16]</sup>研究表明,软骨细胞有鞘氨醇 1-磷酸受体(S1PR)表达,它是神经酰胺的代谢产物。鞘氨醇 1-磷酸(S1P)可刺激 p38,并与阻断聚集蛋白聚糖表达有关。p38 $\alpha$  阻断剂 SB203580 可阻断 S1P 诱导 PGE<sub>2</sub>,但阻断剂对聚集蛋白聚糖表达的作用未确定。Ding 等<sup>[17]</sup>研究证实创伤后继发性 OA 与 p38MAPK 磷酸化有关,抑制其磷酸化有助于降低 MMP-13、含 I 型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTS)-5 及 TNF- $\alpha$  表达。

老化致 OA 患者关节内常见磷酸钙结晶,这些结晶可刺激软骨细胞或滑膜成纤维细胞产生 MMP。Molloy 等<sup>[18]</sup>研究发现,p38 在 OA 滑膜成纤维细胞经磷酸钙结晶诱导 MMP-13 分泌时起关键性作用。Liu 等<sup>[19]</sup>研究发现氢钠尿酸盐结晶刺激软骨细胞 MMP-3 表达升高,与 p38MAPK 激活有关。

此外,过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR) $\gamma$  具有保护软骨细胞的作用,Boileau 等<sup>[8]</sup>研究发现 OA 发病进程中 PPAR $\gamma$  表达下降,并且与 ERK1/2 和 p38 活性降低相关。Afif 等<sup>[20]</sup>研究发现,阻断 p38 可抑制软骨细胞内 IL-1 诱导的 PPAR $\gamma$  表达下调。Stanton 等<sup>[21]</sup>研究表明 PPAR $\gamma$ 2 与软骨细胞分化密切相关,p38 起到关键性调控作用。

p38MAPK 磷酸化还参与软骨细胞凋亡。Takebe 等<sup>[22]</sup>研究发现,降低磷酸化的 p38MAPK 可有效抑制因力学刺激及热应力导致的软骨细胞凋亡。

关于 p38MAPK 在 OA 关节软骨之外组织的研究甚

少。Papachristou 等<sup>[23]</sup>在撕裂的半月板内检测到 p38 的激活。Ehling 等<sup>[24]</sup>研究发现,OA 滑膜成纤维细胞在脂肪连接蛋白刺激下产生 MMP-1 需要 p38 活化。Prasadam 等<sup>[25]</sup>研究表明,p38 在 OA 软骨下骨内成骨细胞促进软骨细胞肥大的病理进程中起重要的调控作用。

## 3 p38MAPK 阻断剂应用

MAPK 的激活参与了 OA 病理进程,或许采用 MAPK 阻断剂可作为治疗 OA 的靶点。然而 MAPK 阻断剂在动物实验或临床试验中并未受到重视,原因在于 MAPK 也参与到许多调控细胞增殖和组织恒定的生长因子信号转导通路,系统性应用 MAPK 阻断剂会有毒性产生的可能性。p38 主要由炎症和应力诱导信号激活,因此其抑制剂较其他 MAPK 亚家族有更高的风险-收益回报。

p38MAPK 专一抑制剂为吡啶咪唑类衍生物,如第一代 SB202190、SB203580、SB220025,第二代 SB239063,可阻断 p38MAPK 的激活作用,不同的抑制剂可特异抑制 p38MAPK 家族中不同成员。p38 $\alpha$  和 p38 $\beta$  异构体对此类抑制剂敏感,而 p38 $\gamma$  和 p38 $\delta$  异构体则对此类抑制剂具有拮抗作用。SB203580 并不阻断上游激酶对 p38 的激活,而是作用于 p38 三磷酸腺苷(ATP)结合活性位点 Thr106,使 p38 失去了与 ATP 结合能力,从而使其失去激酶活性<sup>[26]</sup>。有研究表明 p38 阻断剂通过减少骨与软骨的损害来保持关节完整性,降低类风湿关节炎(RA)严重性,但有临床研究<sup>[27-29]</sup>表明 p38 阻断剂帕吡莫德(pamapimod)及 VX-702 对 RA 治疗未见显著性差异。

Joos 等<sup>[30]</sup>研究发现创伤后 OA 软骨细胞生存率下降,而应用 p38 阻断剂 SB203580 可提高其生存率,提示 p38MAPK 的激活参与创伤后 OA 病理进程。Brown 等<sup>[31]</sup>研究发现,SB203580 可减轻兔 OA 模型软骨退变程度及减缓疼痛。Joos 等<sup>[32]</sup>采用基因芯片分析多种 p38 阻断剂对人 OA 软骨细胞炎症相关基因表达的差异,结果发现所有 p38 阻断剂均可抑制环氧化酶(COX)-2、膜结合型 PGE<sub>2</sub> 合酶(mPGES)-1、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、MMP13 及 TNF 受体超家族(TNFRSF)11B 表达。许多 p38 阻断剂用于 RA 临床治疗试验,但考虑到其对中枢神经系统和肝脏的毒副作用<sup>[33]</sup>,极少能进入临床 II 期试验。Tao 等<sup>[34]</sup>研究表明,p38 阻断剂 FR167653 可抑制甲状旁腺素诱导的破骨细胞生成及骨质吸收。有趣的是,Long 等<sup>[35]</sup>研究证实人软骨细胞在分解代谢因子 IL- $\alpha$ 、纤维连接蛋白降解产物(FN-I)等刺激下可激活 p38 $\gamma$ ,但磷酸化的 p38 $\gamma$  会抑制 MMP-13 表达。因此,提高 p38 $\gamma$  磷酸化有助于降低 MMP-13 对软骨的破坏。

## 4 问题与展望

OA 患者关节软骨内 p38MAPK 激活可参与软骨基质合成与代谢的不平衡,促进软骨细胞的肥大、钙化及凋亡,并且介导疼痛。采用靶向 p38MAPK 来抑制 OA 病理进程已成为治疗 OA 的热点。但目前仍存在许多问题:①调控 OA 病理进程的信号转导通路涉及多条通路之间

的交互与整合,需要深入研究 p38MAPK 如何参与各通路间的交互,交互后的整合信号又是如何影响下游底物的;②除了 p38 $\alpha$  的研究较深入外,对 p38 $\alpha$ 2、p38 $\beta$ 1 及 p38 $\beta$ 2 等异构体在 OA 中的作用了解较少;③MAPK 也参与许多调控细胞增殖和组织恒定的生长因子信号转导通路,系统性应用 MAPK 阻断剂可能会发生毒副作用。鉴于 p38MAPK 阻断剂可能的毒副作用,可考虑选择 p38 的下游底物作为治疗 OA 的作用靶点,如 Hegen 等<sup>[36]</sup>报道采用抑制 p38 $\alpha$  下游底物 MAPK 活化蛋白激酶 (MAPKAP) 激酶 2 治疗 RA 动物模型,可抑制 RA 病理进程。总之,通过研究 p38MAPK 在 OA 中的作用,有助于从分子水平深入探讨 OA 病理机制,并研制出靶向 p38MAPK 的新型药物。

### 参考文献

- Felson DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*, 2006; 354(8):841-848
- Abramson SB, Yusuf Y. Biologics in development for rheumatoid arthritis: relevance to osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006; 58(2):212-225
- Krzeski P, Buckland-Wright C, Balint G, et al. Development of musculoskeletal toxicity without clear benefit after administration of PG-116800, a matrix metalloproteinase inhibitor, to patients with knee osteoarthritis: a randomized, 12-month, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Res Ther*, 2007; 9(5):R109
- Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med*, 2000; 51:289-298
- Perlman H, Bradley K, Liu H, et al. IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J Immunol*, 2003; 170(2):838-845
- Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*, 1998; 83(4):345-352
- Fan Z, Soder S, Oehler S, et al. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol*, 2007; 171(3):938-946
- Boileau C, Martel-Pelletier J, Brunet J, et al. PD-020347, an alpha2delta ligand of the voltage gated calcium channel, inhibits in vivo activation of the Erk1/2 pathway in osteoarthritic chondrocytes: a PKCalpha dependent effect. *Ann Rheum Dis*, 2006; 65(5):573-580
- Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Pomegranate extract inhibits the interleukin-1 $\beta$ -induced activation of MKK-3, p38 $\alpha$ -MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2010; 12(5):R195
- Loeser RF, Forsyth CB, Samarel AM, et al. Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase-3 expression by human chondrocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem*, 2003; 278(27):24577-24585
- Xu L, Peng H, Glasson S, et al. Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2007; 56(8):2663-2673
- Ruettger A, Schueler S, Mollenhauer JA, et al. Cathepsins B, K, and L are regulated by a defined collagen type II peptide via activation of classical protein kinase C and p38 MAP kinase in articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 2008; 283(2):1043-1051
- Wang X, Manner PA, Horner A, et al. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004; 12(12):963-973
- Im HJ, Muddasani P, Natarajan V, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes. *J Biol Chem*, 2007; 282(15):11110-11121
- Hamamura K, Goldring MB, Yokota H. Involvement of p38 MAPK in regulation of MMP13 mRNA in chondrocytes in response to surviving stress to endoplasmic reticulum. *Arch Oral Biol*, 2009; 54(3):279-286
- Masuko K, Murata M, Nakamura H, et al. Sphingosine-1-phosphate attenuates proteoglycan aggrecan expression via production of prostaglandin E2 from human articular chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord*, 2007; 8:29
- Ding L, Heying E, Nicholson N, et al. Mechanical impact induces cartilage degradation via mitogen activated protein kinases. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010; 18(11):1509-1517
- Molloy ES, Morgan MP, Doherty GA, et al. Mechanism of basic calcium phosphate crystal-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression by osteoarthritic synovial fibroblasts: inhibition by prostaglandin E2. *Ann Rheum Dis*, 2008; 67(12):1773-1779
- Liu R, Liote F, Rose DM, et al. Proline-rich tyrosine kinase 2 and Src kinase signaling transduce monosodium urate crystal-induced nitric oxide production and matrix metalloproteinase 3 expression in chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(1):247-258
- Afif H, Benderdour M, Mfuna-Endam L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is downregulated by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2007; 9(2):R31
- Stanton LA, Li JR, Beier F. PPARgamma2 expression in growth plate chondrocytes is regulated by p38 and GSK-3. *J Cell Mol Med*, 2010; 14(1-2):242-256
- Takebe K, Nishiyama T, Hayashi S, et al. Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress. *Int J Mol Med*, 2011; 27(3):329-335
- Papachristou DJ, Papadaku E, Basdra EK, et al. Involvement of the p38 MAPK-NF-kappaB signal transduction pathway and COX-2 in the pathobiology of meniscus degeneration in humans. *Mol Med*, 2008; 14(3-4):160-166
- Ehling A, Schaffler A, Herfarth H, et al. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol*, 2006; 176(7):4468-4478
- Prasadani I, van Gennip S, Friis T, et al. ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts. *Arthritis Rheum*, 2010; 62(5):1349-1360
- Mörel C, Ibarz G, Oiry C, et al. Cross-interactions of two p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase inhibitors and two cholecystokinin (CCK) receptor antagonists with the CCK1 receptor and p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, 2005; 280(22):21384-21393
- Cohen SB, Cheng TT, Chindalore V, et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2009; 60(2):335-344
- Alten RE, Zerbini C, Jeka S, et al. Efficacy and safety of pamapimod in patients with active rheumatoid arthritis receiving stable methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis*, 2010; 69(2):364-367
- Damjanov N, Kauffman RS, Spencer-Green GT. Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum*, 2009; 60(5):1232-1241
- Joos H, Hogrefe C, Rieger L, et al. Single impact trauma in human early-stage osteoarthritic cartilage: implication of prostaglandin D2 but no additive effect of IL-1 $\beta$  on cell survival. *Int J Mol Med*, 2011; 28(2):271-277
- Brown KK, Heitmeyer SA, Hookfin EB, et al. P38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. *J Inflamm(Lond)*, 2008; 5:22
- Joos H, Albrecht W, Lauffer S, et al. Differential effects of p38MAP kinase inhibitors on the expression of inflammation-associated genes in primary, interleukin-1beta-stimulated human chondrocytes. *Br J Pharmacol*, 2010; 160(5):1252-1262
- Zhang J, Shen B, Lin A. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28(6):286-295
- Tao H, Okamoto M, Nishikawa M, et al. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, FR167653, inhibits parathyroid hormone related protein-induced osteoclastogenesis and bone resorption. *PLoS One*, 2011; 6(8):e23199
- Long DL, Loeser RF. p38gamma mitogen-activated protein kinase suppresses chondrocyte production of MMP-13 in response to catabolic stimulation. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010; 18(9):1203-1210
- Hegen M, Gaestel M, Nickerson-Nutter CL, et al. MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 2006; 177(3):1913-1917

(收稿:2011-09-07;修回:2011-10-10)

(本文编辑:边倍)