

活性氧与激素性股骨头坏死

翟玥 邓国英 王秋根 王谦

摘要 大量实验表明,激素使用导致的活性氧(ROS)升高参与了股骨头坏死(ONFH)发生发展过程。机体内的 ROS 主要来自线粒体呼吸电子传递链和氧化酶反应,对不同类型的细胞均有损伤作用。ROS 清除剂相对不足可能为激素性 ONFH 发展的重要原因之一。虽然目前 ONFH 发病机制尚不明确,但研究结果高度提示 ROS 促进 ONFH 发生,而抗氧化剂可在一定程度上减缓该病理过程。ROS 通过损伤血管内皮细胞、诱导成骨细胞与骨细胞减少、异常激活破骨细胞等方式诱发激素性 ONFH。该文对 ROS 与激素性 ONFH 研究进展作一综述。

关键词 活性氧;激素性股骨头坏死;氧化应激;发病机制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2017.02.009

股骨头坏死(ONFH)以其高发病率、高致残率严重影响着人们的生命与健康。据保守估计,中国有 500 万~750 万 ONFH 患者,数量庞大^[1]。在所有全髋关节置换患者中,ONFH 患者约占 1/3^[2],以大量应用糖皮质激素所致的激素性 ONFH 最为常见^[3-4]。然而,目前激素性 ONFH 发病机制尚不明确^[5-6]。

有研究^[7-10]高度提示活性氧(ROS)可促进 ONFH 发生,而抗氧化剂的使用可在一定程度上抑制这一病理过程。本文对 ROS 与激素性 ONFH 研究进展作一综述。

1 ROS 简介

1.1 产生及其效应

ROS 主要包括过氧化氢、氧自由基、羟自由基等。机体内的 ROS 主要来自线粒体呼吸电子传递链和氧化酶反应。ROS 可与磷脂、蛋白质及 DNA 等高度亲和并对其进行氧化修饰,从而调节细胞的分化、增殖、基因表达和凋亡。过多的 ROS 可通过攻击多聚不饱和脂肪酸引起脂质过氧化,使生物膜结构、功能及膜表面受体改变,还可通过与核酸的嘧啶、嘌呤等反应引起 DNA 链断裂、突变或永久性修饰等,从而导致细胞损伤。ROS 可激活多种细胞内蛋白和酶,调节核因子- κ B(NF- κ B)和激活蛋白(AP)-1 的表达,进而调节多种炎性介质^[11]。同时,ROS 还可通过复杂的调控网络影响细胞周期进程。

基金项目:上海市科委引导项目(15411968800)、上海市自然科学基金(13ZR1433300)

作者单位:201620, 上海交通大学附属第一人民医院南院创伤中心

通信作者:王谦 E-mail: drwangqian23@126.com

长时间、低剂量的 ROS 环境可使细胞信号转导通路如丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路持续激活,导致细胞增殖抑制,细胞被阻滞于 G1 期^[12]。此外,短期、高剂量的 ROS 可导致 DNA 损伤、p53 基因激活,使处于各细胞周期内的细胞均受到不同程度的抑制而进行 DNA 修复。长期作用下,被抑制在 G1 期的细胞生长受到永久抑制,而被抑制于 S 期、G2 期或 M 期的细胞将发生凋亡^[13]。

ROS 的损伤作用具有普遍性,其在不同类型细胞中均可诱导细胞发生凋亡,该现象可被细胞内高谷胱甘肽水平抑制。ROS 诱导细胞凋亡的途径分为外源性途径和内源性途径。其中外源性途径也称受体介导途径,由外源信号分子如肿瘤坏死因子(TNF)- α 所激活,通过激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-8 和 caspase-10 诱发细胞凋亡。有研究^[14]表明,抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)能抑制 TNF 诱导的细胞凋亡,提高细胞内谷胱甘肽水平也能抑制死亡受体家族(Fas)介导的细胞凋亡。此类现象提示 ROS 可能在细胞凋亡过程中起重要作用。在内源性途径中,ROS 可通过线粒体膜电位变化造成线粒体通道氧化,导致细胞色素 C 释放,从而引起细胞凋亡^[12]。

1.2 清除

生理状态下,ROS 的产生与清除处于动态平衡状态,细胞主要通过胞内的抗氧化酶系统和小相对分子质量抗氧化剂(LMWA)清除多余的 ROS。细胞内的抗氧化酶系统主要包括直接作用酶和辅助性酶,其中直接作用酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶等,辅助性酶包括黄嘌呤氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等。SOD 能通过歧化反应催化氧自

由基形成过氧化氢,而歧化反应的终产物过氧化氢则能通过过氧化氢酶或过氧化物酶(包括谷胱甘肽过氧化物酶)反应生成水。LMWA包括大量化合物,它们能给氧自由基提供电子而将其清除,减轻所致损害,反应后这些 LMWA 携带的自由基又可被其他物质如还原型辅酶 I (NADH)还原,重新处于还原状态^[15]。在激素性 ONFH 进程中,ROS 清除剂相对不足可能是疾病发展的重要原因之一。

2 ROS 与 ONFH 相关性

大量研究^[7-9]表明,氧自由基参与了 ONFH 的发生发展过程。Ichiseki 等^[16]研究发现,短暂氧化应激即可加重骨坏死。在动物模型中静脉注射具有抗氧化应激作用的物质(如维生素 E^[17]、辅酶 Q10^[18]、原花色素^[19]、普伐他汀^[20]等),均可在一定程度上降低 ONFH 发病率,抑制 ONFH 的发展^[21]。虽然 ONFH 发病机制目前尚不明确,但研究结果高度提示 ROS 可促进 ONFH 的发生,而抗氧化剂可在一定程度上减缓这一病理过程。

3 ROS 在激素性 ONFH 中的作用机制

3.1 血管内皮细胞损伤

既往研究^[22]表明,在激素诱导的高血压大鼠模型中,随着血清 ROS 合成增多,氧化应激水平也增高,糖皮质激素所致的 ROS 增高可引发强烈的脂质过氧化,损伤血管内皮细胞膜和亚细胞器,进而破坏血管壁的完整性。这一损伤经抗氧化剂维生素 C 处理后得到有效减轻^[23]。此外,激素还可通过 ROS 途径直接诱导微血管内皮细胞凋亡,导致微血管数量减少^[24]。由此可见,糖皮质激素可引起 ROS 异常增多、血管内皮细胞功能受损及数量减少。

单层排列的血管内皮细胞能阻止凝血因子和血小板的激活,并有促进纤溶的作用,从而维持正常的血液循环,防止血栓形成。血管内皮细胞损伤后,不仅会因其通透性增加而失去屏障功能,使内皮下层暴露,导致血小板黏附、聚集及血栓形成,而且会使受刺激的内皮细胞释放组织因子,促进外源性凝血过程,加速血栓形成,最终引起骨内微循环障碍,微血管内皮细胞功能紊乱,髓内微环境失衡,股骨头血液循环障碍,最终导致 ONFH 发生^[3]。

3.2 成骨细胞与骨细胞减少

激素可通过提高 ROS 水平促进成骨细胞凋亡^[25-26],而减轻氧化应激反应可减少这种细胞凋亡^[27-28],其具体分子机制尚未明确。激素诱导产生的 ROS 可通过激活转化生长因子激酶(TAK)1^[29]、

p53-线粒体通透性转换孔^[30]等信号转导通路诱导成骨细胞凋亡^[31]。过氧化氢作为 ROS 的主要成分,可抑制成骨细胞增殖,而 NAC 可减弱该抑制作用^[32],并可诱导凋亡相关基因 Bax、细胞凋亡诱导因子(AIF)和 caspase-3、caspase-9 表达,促进成骨细胞凋亡^[33],且细胞凋亡比例与过氧化氢浓度呈正相关。研究^[27]表明,应用腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激活剂可降低氧化应激导致的成骨细胞凋亡率,推测 AMPK 信号转导通路可能参与氧化应激诱导的成骨细胞凋亡。ROS 导致的成骨细胞凋亡可能与 MAPK 和磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)等信号转导通路相关^[33]。此外,抗氧化剂依拉达奉能显著降低激素作用后成骨细胞内 ROS 水平,减轻成骨细胞损伤^[34]。综上所述,氧化应激在激素诱导的成骨细胞凋亡中有重要作用。

ROS 还可通过诱导成骨细胞细胞周期阻滞,抑制间充质干细胞和成骨前体细胞增殖^[35];通过激活 PI3K/Akt 信号转导通路,阻碍其向成骨细胞分化^[36];降低细胞分泌骨基质及基质矿化能力^[37],甚至诱导细胞凋亡。

成骨细胞和骨细胞增殖减少、凋亡加剧及功能减弱可导致 ONFH^[38]。实验^[39]显示,成年小鼠经大剂量泼尼松龙处理后,骨密度降低,骨小梁变稀疏,骨生成减弱,其骨细胞和成骨细胞凋亡率较正常小鼠高 3 倍,与激素性 ONFH 病理学表现一致,提示激素性 ONFH 的发生可能与激素诱导成骨细胞凋亡、数量降低、功能相对不足有关。Calder 等^[40]研究认为,ROS 所致的内源性细胞凋亡在糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡中有重要作用,对 ONFH 的发生意义重大。

3.3 破骨细胞异常激活

ROS 是 NF- κ B 受体活化因子配体(RANKL)系列信号转导通路中的重要调节因子,在破骨细胞激活过程中起重要作用^[41]。RANKL 通过激活肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF)-6,启动胞质内信号级联反应,激活 Ras 相关 C3 肉毒素底物(Rac)1, Rac1 激活还原型辅酶 II 氧化酶(Nox)1 产生 ROS,从而上调细胞内 ROS 浓度,激活促进破骨细胞分化成熟的关键因子 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 MAPK,在应用 RNA 干扰技术抑制 ROS 产生后, RANKL 不再具有促进破骨前体细胞分化的功能。不仅如此,ROS 还可刺激成骨细胞表达 RANKL^[42]。以上表明,ROS 在破骨细胞分化成熟

过程中起重要作用。

ROS 可调节破骨细胞的骨吸收作用,破骨细胞产生的超氧化物可直接参与骨组织降解^[43]。ROS 作为第二信使,可通过 NF- κ B、MAPK、Ca²⁺ 介导的信号转导通路等促进破骨细胞生成^[44]。同时,大剂量激素作用下 ROS 显著增加还可提高破骨细胞增殖能力^[45]。ROS 能刺激破骨细胞生长分化,而破骨细胞又能反过来增加 ROS 产生,若机体抗氧化防御机制受损,则极易形成恶性循环,导致骨吸收增加,股骨头结构破坏。

此外,氧化应激还可破坏 I 型胶原蛋白,引起软骨胶原纤维和蛋白聚糖降解,促进软骨破坏,导致软骨退化,影响髋关节正常结构和功能,加快 ONFH 的发生^[46]。

综上所述,激素导致的 ROS 增高可通过影响血管内皮细胞、成骨细胞、骨细胞、破骨细胞的功能,导致股骨头血液循环障碍,成骨细胞功能相对不足,骨质平衡破坏,骨质疏松形成,机械支撑结构受损,受力区股骨头变平、塌陷,最终发生 ONFH^[47-48]。

就目前研究状况而言,关于氧化应激在激素性 ONFH 发生发展中的作用机制研究虽已取得不少进展,但具体作用机制仍不明确,尚需进一步的动物实验和临床随机试验。深入研究 ROS 与 ONFH 发病的关系可为激素性 ONFH 的防治提供理论基础,抗氧化剂对 ONFH 的保护作用可为激素性 ONFH 的防治提供新的思路。

参考文献

- [1] 刘铁钢,陈卫衡. 非创伤性股骨头坏死的流行病学研究[J]. 当代医学, 2008, 14(24):64-65.
- [2] 崔立强. 中国大陆地区股骨头坏死病因学调查及危险因素初步分析[D]. 北京协和医学院, 2014.
- [3] Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteonecrosis [J]. Endocrine, 2012, 41(2):183-190.
- [4] Moya-Angeler J, Gianakos AL, Villa JC, et al. Current concepts on osteonecrosis of the femoral head[J]. World J Orthop, 2015, 6(8):590-601.
- [5] Wang F, Wang Y, Hu N, et al. Risk-factors, pathogenesis, and pharmaceutical approaches for treatment of steroid-induced bone infarction of femoral head [J]. Acta Pol Pharm, 2016, 73(3):557-563.
- [6] 崔国峰,毕郑刚,潘琦,等. 成人非创伤性股骨头坏死[J]. 国际骨科学杂志, 2013, 43(4):243-248.
- [7] Huang SL, Jiao J, Yan HW. Hydrogen-rich saline attenuates steroid-associated femoral head necrosis through inhibition of oxidative stress in a rabbit model[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(1):177-182.
- [8] Li GY, Feng Y, Cheng TS, et al. Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. Rheumatology (Oxford), 2013, 52(3):438-447.
- [9] Lu BB, Li KH. Lipoic acid prevents steroid-induced osteonecrosis in rabbits[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(6):1679-1683.
- [10] Liu H, Yang X, Zhang Y, et al. Fullerol antagonizes dexamethasone-induced oxidative stress and adipogenesis while enhancing osteogenesis in a cloned bone marrow mesenchymal stem cell[J]. J Orthop Res, 2012, 30(7):1051-1057.
- [11] Yu JH, Kim H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(46):17324-17329.
- [12] Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cell Signal, 2012, 24(5):981-990.
- [13] Verbon EH, Post JA, Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells [J]. Gene, 2012, 511(1):1-6.
- [14] Watson RW, Rotstein OD, Jimenez M, et al. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils[J]. Blood, 1997, 89(11):4175-4181.
- [15] Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 30(11):1191-1212.
- [16] Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, et al. Osteonecrosis development in a novel rat model characterized by a single application of oxidative stress[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(7):2138-2141.
- [17] Mikami T, Ichiseki T, Kaneuji A, et al. Prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of vitamin E in a rabbit model[J]. J Orthop Sci, 2010, 15(5):674-677.
- [18] Komurcu E, Oktay M, Kaymaz B, et al. Preventive effects of coenzyme Q10 (CoQ10) on steroid-induced osteonecrosis in rats[J]. Acta Orthop Traumatol Turc, 2014, 48(2):217-222.
- [19] Song Q, Shi Z, Bi W, et al. Beneficial effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits with steroid-induced osteonecrosis via protecting against oxidative stress and apoptosis[J]. J Orthop Sci, 2015, 20(1):196-204.
- [20] Nozaki Y, Kumagai K, Miyata N, et al. Pravastatin reduces steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in SHRSP rats[J]. Acta Orthop, 2012, 83(1):87-92.
- [21] Qiang H, Liu H, Ling M, et al. Early steroid-induced osteonecrosis of rabbit femoral head and panax notoginseng saponins: mechanism and protective effects[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015:719370.
- [22] Joshi M, Kotha SR, Malireddy S, et al. Conundrum of pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: role of vascular

- endothelial dysfunction, reactive oxygen species, and mitochondria[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 386(1-2):233-249.
- [23] Yang Y, Lou J, Li Z, et al. Effect of glucocorticoid on production of reactive oxygen species in bone microvascular endothelial cells[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2011, 25(5):533-537.
- [24] El Zaoui I, Behar-Cohen F, Torriglia A. Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: analysis of cell death mechanisms[J]. *Toxicol Sci*, 2015, 143(2):441-453.
- [25] Sato AY, Tu X, McAndrews KA, et al. Prevention of glucocorticoid induced-apoptosis of osteoblasts and osteocytes by protecting against endoplasmic reticulum (ER) stress in vitro and in vivo in female mice[J]. *Bone*, 2015, 73:60-68.
- [26] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor α increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52):44326-44335.
- [27] She C, Zhu LQ, Zhen YF, et al. Activation of AMPK protects against hydrogen peroxide-induced osteoblast apoptosis through autophagy induction and MAPK maintenance; new implications for osteonecrosis treatment? [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1):1-8.
- [28] Yang M, Huang Y, Chen J, et al. Activation of AMPK participates hydrogen sulfide-induced cyto-protective effect against dexamethasone in osteoblastic MC3T3-E1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(1):42-47.
- [29] Ding H, Wang T, Xu D, et al. Dexamethasone-induced apoptosis of osteocytic and osteoblastic cells is mediated by TAK1 activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(2):157-163.
- [30] Zhen YF, Wang GD, Zhu LQ, et al. P53 dependent mitochondrial permeability transition pore opening is required for dexamethasone-induced death of osteoblasts[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(10):1475-1483.
- [31] Liang D, Xiang L, Yang M, et al. ZnT7 can protect MC3T3-E1 cells from oxidative stress-induced apoptosis via PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5):1126-1135.
- [32] Ueno T, Yamada M, Igarashi Y, et al. N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 99(4):523-531.
- [33] Liang D, Yang M, Guo B, et al. Zinc inhibits H₂O₂-induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 148(3):420-429.
- [34] Sun WX, Zheng HY, Lan J. Edaravone protects osteoblastic cells from dexamethasone through inhibiting oxidative stress and mPTP opening[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 409(1-2):51-58.
- [35] Smith E, Coetzee GA, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3 β [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(20):18191-18197.
- [36] Liu J, Yang J. Uncarboxylated osteocalcin inhibits high glucose-induced ROS production and stimulates osteoblastic differentiation by preventing the activation of PI3K/Akt in MC3T3-E1 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(1):173-181.
- [37] Wang Y, Zhao L, Wang Y, et al. Curculigoside isolated from *Curculigo orchoides* prevents hydrogen peroxide-induced dysfunction and oxidative damage in calvarial osteoblasts[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2012, 44(5):431-441.
- [38] Chernetsky SG, Mont MA, LaPorte DM, et al. Pathologic features in steroid and nonsteroid associated osteonecrosis [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1999, 368:149-161.
- [39] Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(8):2907-2912.
- [40] Calder JD, Buttery L, Revell PA, et al. Apoptosis: a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2004, 86(8):1209-1213.
- [41] Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, et al. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species [J]. *J Orthop Res*, 2012, 30(11):1843-1852.
- [42] Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(10):860-867.
- [43] Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, et al. Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(11):2682-2694.
- [44] Callaway DA, Jiang JX. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases[J]. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33(4):359-370.
- [45] Shi J, Wang L, Zhang H, et al. Glucocorticoids: dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy[J]. *Bone*, 2015, 79:222-232.
- [46] Yu SM, Kim SJ. The thymoquinone-induced production of reactive oxygen species promotes dedifferentiation through the ERK pathway and inflammation through the p38 and PI3K pathways in rabbit articular chondrocytes[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(2):325-332.
- [47] Canalis E, Delany AM. Mechanisms of glucocorticoid action in bone[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 966:73-81.
- [48] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(2):274-282.

(收稿:2016-08-19;修回:2016-10-18)

(本文编辑:李圆圆)