

病理性矿化促进骨关节炎进展的研究进展

卢伟诚 闫舰飞 覃文聘 牛丽娜 焦 凯

摘 要 骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是临床中最常见的退行性关节疾病,其发病机制目前尚不清楚。近年来越来越多的证据表明,病理性矿化不仅仅是 OA 的一种临床表现,而且在 OA 的发生、发展中起到主要的致病作用。因此,对于 OA 患者关节软骨、关节盘及滑膜等组织病理性矿化形成机制的探索将会在 OA 阻断及治疗策略的研发过程中发挥重要作用。本文将围绕 OA 软骨中钙平衡紊乱、磷代谢失调和基质囊泡异常释放 3 个方面,对近年来关于 OA 病理性矿化形成机制的相关研究加以综述,以期将为阻断病理性矿化当作靶点的 OA 疗法提供新思路。

关键词 骨关节炎 病理性矿化 基质囊泡

中图分类号 R681

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.03.028

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是关节炎中发生率最高的一种,患者通常会出现关节疼痛、僵硬和肿胀等临床表现。该疾病会给患者带来极大的痛苦和经济负担。与此同时 OA 的发病因素和致病机制极为复杂,包括高龄、肥胖、遗传和系统性疾病在内的诸多因素均可对疾病发生、发展产生重大影响,因而除对症治疗以及手术干预外,尚无有效的治疗方法可真正治愈 OA^[1]。关节退变是 OA 最典型的病理特征之一,病变往往会侵袭至整个关节组织,包括软骨、软骨下骨、半月板、滑膜、韧带和外周肌肉在内均有发生病变的可能^[2]。

多项研究显示,软骨和关节软组织的病理性矿化是 OA 发病过程中的一个重要特征:(1)回顾以往的临床研究,OA 患者起病往往伴随着软骨、半月板等组织的病理性矿化。而且随着检测技术敏感度的提高,病理性矿化在 OA 患者中的检出率也不断升高,两者的密切联系不断得到证实。(2)关节组织病理性矿化的程度往往与 OA 患者的疾病进展密切相关,影像学发现病情严重的病理性矿化患者往往会伴有较为严重的关节软骨破坏。(3)体外实验已经证明,钙盐晶体能够导致软骨组织发生退行性改变,包括软骨细胞的表型改变以及炎性介质的产生等。

(4)阻断或降低病理性矿化的程度可一定程度上缓解病情,如通过基因敲除以及药物阻断等手段可显著降低疾病的严重程度^[3]。因此,病理性矿化可能在 OA 发病过程中扮演了关键角色,研究其形成机制对于 OA 的治疗具有重要的意义。

碱性磷酸钙 (basic calcium phosphate, BCP) 和焦磷酸钙二水合物 (calcium pyrophosphate dihydrate, CPPD) 在关节组织的病理性矿化中最为常见,其中 BCP 主要包括羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA)、磷酸八钙、磷酸三钙等^[4]。HA 除参与组成关节组织的病理性矿化之外,还存在于血管组织的钙化斑块中,而 CPPD 可见于动脉血管壁、皮肤和乳腺的异常矿化组织中。正常生理情况下组织中矿化的促进因素和抑制因素处于动态的平衡,因此生理性矿化只限于特定时期的特定部位,但当这一平衡受到某种刺激被打破后就有可能形成病理性矿化。本文将围绕钙平衡紊乱、磷代谢失调和基质囊泡 (matrix vesicle, MV) 异常释放 3 个方面,对近年来有关 OA 病理性矿化的形成机制展开综述。

一、钙平衡紊乱

OA 软骨细胞中存在着钙稳态失衡的情况,钙作为矿化物的主要组成元素,其稳态的失衡可能是形成 OA 病理性矿化的重要促进因素。

1. 软骨细胞中主要的 Ca^{2+} 通道和受体:软骨细胞相关的 Ca^{2+} 通道和受体主要包括膜联蛋白 V (annexin V)、 Ca^{2+} 敏感受体 (calcium-sensing receptor, CaSR) 和瞬时受体电位离子通道 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 等,这些通道和受体主要分布在细胞膜表面以及高尔基体、内质网等细胞器

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81671012, 81870787);陕西省重点科技创新团队 (2020TD-033);陕西高校青年创新团队

作者单位:710032 西安军事口腔医学国家重点实验室、国家口腔疾病临床医学研究中心、空军军医大学口腔医学院黏膜病科 (卢伟诚、闫舰飞、覃文聘、焦凯),修复科 (牛丽娜)

通讯作者:焦凯,副教授,副主任医师,博士,电子信箱:kjiao1@163.com;牛丽娜,教授,博士生导师,电子信箱:niulina831013@126.com

膜系统表面,有研究称处于软骨成骨发育过程中的软骨细胞以及 OA 中的软骨细胞表面的 Ca^{2+} 通道和受体表达量均显著提高,这一相似的表现或提示这两者间存在着类似的矿化趋势和矿化前的钙调控^[5]。膜联蛋白 V 是磷脂双分子层中 Ca^{2+} 选择性离子通道的重要组成部分,在软骨细胞分泌的 MV 上表达量较高,具有调控 MV 内部 Ca^{2+} 浓度的作用。TRPV4 介导了细胞内的 Ca^{2+} 信号通路,研究显示条件性敲除小鼠软骨细胞中的 TRPV4 相关基因能够缓解 OA 的疾病进展^[6]。CaSR 属于 G 蛋白偶联受体 C 家族一员,是细胞感受外界 Ca^{2+} 浓度变化的重要受体,主要分布于成熟期和肥大软骨细胞的细胞膜,内质网膜表面。Zhang 等^[5]研究发现,OA 软骨细胞的 CaSR 表达量显著上升,条件性靶向敲除 OA 模型鼠软骨细胞的 Casr 基因或者向模型鼠的关节区注射 CaSR 的拮抗剂都能够显著降低关节区软骨组织的病变程度以及钙化程度,并且还发现 OA 软骨细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡所介导的软骨细胞的终末分化同样在 OA 软骨组织的钙化形成以及疾病进展中发挥了重要的作用。

2. 异常的外力刺激对于软骨细胞内 Ca^{2+} 平衡的影响: Ca^{2+} 内流以及细胞质 Ca^{2+} 浓度增加是细胞受到外力刺激后早期的行为表现之一,而这些改变的发生均离不开位于内质网表面的 CaSR,其结合域能够感知细胞质内的 Ca^{2+} 浓度变化^[5,7]。细胞在受到流体剪切力之后内质网膜表面的 CaSR 的表达量显著上升并伴随线粒体和内质网的肿胀,同时软骨细胞的终末分化和组织钙化相关蛋白的表达水平也显著提升。在这种情况下通过使用 CaSR 的拮抗剂能够有效抑制软骨细胞终末分化的趋势。给予小鼠关节区异常的应力刺激后,其软骨细胞 CaSR 表达上调同时也能够产生类似 OA 的组织钙化表现,如关节软骨变薄以及软骨基质中 II 型胶原和蛋白多糖的含量显著下降,但是在 Casr 基因敲除的小鼠关节施加同样的力学刺激后,类似的病理改变明显减轻^[5]。以上结果显示,异常外力所介导的软骨细胞内 Ca^{2+} 浓度改变可能在病理性矿化的形成中发挥了重要的作用。

3. 全身的 Ca^{2+} 平衡异常对于病理性矿化形成的影响:某些系统性疾病往往伴随着体液中 Ca^{2+} 平衡的紊乱,进而造成细胞内钙稳态的丢失,这有可能成为病理性矿化的一个重要促进因素。临床中罹患 OA 的患者常常会伴发甲状旁腺功能亢进,提示 Ca^{2+} 调节异常可能在 OA 的发病进程中起到重要作用。甲状旁腺通过分泌甲状旁腺素 (parathyroid hormone,

PTH) 动员骨钙入血,促进肾小管和胃肠系统对钙的重吸收,使血钙浓度增加,进而调控骨骼、胃肠道和肾脏内钙分布的平衡,其中甲状旁腺细胞 (parathyroid cell, PTC) 可以对血清 Ca^{2+} 浓度的细微变化做出反应,并能迅速调节 PTH 的分泌以维持体液中 Ca^{2+} 浓度的平衡。有研究显示 PTC 中 CaSR 基因突变时会降低其对血清 Ca^{2+} 浓度变化反应的敏感程度,从而使其不能及时调控血钙平衡,极易诱发病理性矿化^[8]。

二、焦磷酸盐 (pyrophosphate, PPi) 和磷酸盐 (phosphate, Pi) 平衡对于病理性矿化形成的影响

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中 PPi 和 Pi 平衡异常是病理性矿化形成的重要促进因素,软骨和骨的细胞外基质中的 PPi 浓度主要受到以下 3 种酶的调控,即焦磷酸水解酶 (nucleoside triphosphate pyrophospho-hydrolase, NTPPH)、无机焦磷酸盐转运体 (inorganic PPi transport regulator, ANK) 和组织特异性碱性磷酸酶 (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP)^[9]。

1. PPi 和 Pi 平衡主要调控酶:NTPPH 包括 NTPPH-1 (PC-1)、NTPPH-2 (autaxin) 和 NTPPH-3 (B10) 等类型,其中 PC-1 主要位于软骨细胞分泌的 MV 膜的表面,可通过水解细胞外基质中的 ATP 及其类似物进而提高细胞外基质中的 PPi 浓度^[10]。在先天性血管钙化的患儿基因检测时发现其 PC-1 基因发生突变。实验发现将小鼠 Pc-1 特异性敲除会造成其关节半月板和韧带的大量钙化。这些证据都表明 NTPPH 异常引起的 PPi 和 Pi 平衡紊乱在病理性矿化的形成中发挥了重要的作用。ANK 作为一种跨膜蛋白可将胞内 PPi 转运至胞外进而提高细胞外基质中 PPi 的浓度,有研究显示 OA 患者软骨中 ANK 的表达显著上调^[11]。TNAP 主要通过糖基磷脂酰肌醇与细胞膜紧密结合,可以将细胞外基质中的 PPi 以及其他的磷酸盐类化合物水解生成 $\text{Pi}^{[12]}$ 。Pi 同时可作为信号分子诱导软骨细胞 TNAP 表达水平的进一步上调,促进软骨细胞终末分化并提高与矿化相关蛋白的表达^[13]。另外,位于软骨细胞胞膜和 MV 表面的 Na/Pi 转运蛋白可将细胞外的 Pi 转运至细胞内或基质囊泡内。在病理性矿化时,大量 Pi 便经由此通道进入胞内或囊泡内,而通过膦甲酸钠特异性阻断 Na/Pi 转运蛋白通道可有效抑制软骨中病理性矿化的形成,再次显示了 PPi 和 Pi 平衡调控酶的异常在病理性矿化的形成过程中“功不可没”^[14]。

2. PPi 和 Pi 平衡异常在病理性矿化形成中的作用:软骨细胞在生理情况下可以通过多种机制调控 PPi 和 Pi 的平衡进而防止软骨中病理性矿化的形成,但在 OA 患者中其平衡调控机制可能受到干扰。研究显示,细胞外基质中高浓度的 PPi 能够抑制 BCP 晶体的成核和生长,但同时 PPi 又是 CPPD 主要的阴离子来源,故可知高浓度 PPi 具有促进细胞外基质中 CPPD 形成的作用,过高或过低的 PPi 浓度均会带来矿化,因而维持 PPi 和 Pi 平衡对于避免病理性矿化晶体的形成具有一定的积极意义^[10]。另据相关实验了解,当小鼠成骨细胞胞外基质中 Pi 浓度降低时其骨质的矿化程度也会相应减低,更有研究发现细胞外基质中 Pi 浓度高时会促进成骨细胞和软骨细胞的凋亡,揭示了 Pi 的浓度对维持正常矿化避免病理性矿化同样不可或缺^[15,16]。临床研究发现,软骨细胞 PPi 代谢紊乱是原发性 CPPD 晶体沉积病的一个重要特征,而且软骨钙质沉着症患者家系中多发现 ANK 基因的变异,由于 ANK 对 PPi 的转运在细胞外基质中 PPi 的调控方面发挥了重要的作用,这一发现再次佐证 PPi 和 Pi 平衡异常可能是病理性矿化相关疾病的重要危险因素^[11]。

三、MV 在病理性矿化中的作用

由肥大化的软骨细胞和成骨细胞所分泌的 MV 在软骨成骨和膜内骨化的过程中发挥了重要的作用。其中,MV 由细胞分泌后能够在胞外富集钙磷,之后沉积于细胞外基质的胶原纤维中从而促进骨基质的矿化。MV 来源于生物膜系统,直径为 100 ~ 300nm,通常作为细胞外基质中矿化的核心,具有富集钙磷以及促进晶核形成的作用,目前研究显示 MV 在生理性和病理性矿化中均发挥了重要的作用^[15]。

1. MV 在病理性矿化晶体成核、生长中的作用:病理条件下,外界异常的刺激会促使软骨细胞发生肥大化的同时分泌 MV,而外界刺激超出细胞的调控能力后会诱使细胞发生凋亡,逐渐形成凋亡小体。有研究显示,凋亡小体与 MV 类似,也具有富集钙磷、促使晶核生成和推动病理性矿化形成的作用^[10]。MV 膜含有调控 Ca^{2+} 和 Pi 转运相应的通道蛋白,包括膜联蛋白、TNAP 和Ⅲ型 Na/Pi 协同转运蛋白。研究发现来源于 OA 软骨的 MV 膜相关的钙通道调控蛋白的表达水平显著提升^[17]。MV 从细胞外释放后富集钙磷,由于 MV 内部的钙磷趋向于形成晶相导致内部的钙磷浓度较低,所形成的离子梯度促使钙磷在 MV 内部的进一步富集,逐渐在 MV 内部形成钙-无机磷酸

盐-磷脂复合物,这一复合物在后期可成为细胞外晶体形成的核心。MV 膜富含酸性磷脂,如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇等,其对 Ca^{2+} 具有较高的亲和力,促进了 MV 对于钙的摄入^[10]。MV 内的矿化晶体逐渐生长会破坏 MV 膜并释放到 ECM 中,而后进一步生长形成矿化结节。Boskey 等^[18]提取 MV 在体外凝胶体系中培养并观察到了以 MV 为核心的晶体的成核和生长,从而肯定了 MV 在细胞外基质矿化形成中所发挥的作用。

2. MV 和 ECM 在病理性矿化形成过程中的相互作用:细胞外基质对矿化过程具有重要的调控作用,I 型胶原纤维是骨组织细胞外基质的主要成分,可以作为吸引并控制磷酸钙矿化前体渗透的活性模板,在胶原的矿化过程中发挥积极的作用^[19]。Derfus 等^[20]研究显示健康软骨组织基质中可见囊泡,但是很少发生矿化,而从健康软骨组织中提取的囊泡在体外矿化的能力与 OA 来源的囊泡在体外的矿化能力比较,差异无统计学意义,显示了软骨基质成分对于囊泡的矿化调控可能具有重要的作用。胶原的断裂和蛋白多糖的降解是 OA 软骨细胞外基质早期的改变之一,在 OA 发病初期,关节软骨中的软骨细胞发生肥大化,促使软骨细胞分泌蛋白酶进一步降解细胞外基质,同时 OA 软骨细胞的肥大化使其分泌的蛋白多糖和Ⅱ型胶原的数量显著减少^[21,22]。在 OA 软骨中,细胞外基质结构正常的区域内少有异常的晶体沉积,提示细胞外基质结构的异常可能在钙盐结晶的形成中发挥重要作用^[23]。Jubeck 等^[24]研究发现在体外Ⅱ型胶原浓度达到 1.6mg/ml 时,成骨细胞 MV 的矿化被显著抑制,说明 OA 中软骨基质Ⅱ型胶原受到破坏可能会促进病理性矿化的形成。蛋白多糖与细胞外的胶原支架一起对于维护细胞外基质的空间结构发挥了重要的作用。蛋白多糖富含大量带负电的硫酸盐基团和羧酸基团,能够使蛋白多糖分子在外周空间尽可能的伸展,这种空间效应和电荷作用能够减少钙磷的碰撞,干扰细胞外基质中钙磷的结合,这些研究显示蛋白多糖可能在抑制病理性矿化的过程中发挥了一定的作用。在 OA 疾病进展中,细胞周围基质的结构改变可能促进了 MV 来源晶体的生长和扩大,从而加重了 OA 的发病进程。

四、展望

病理性矿化晶体的出现与 OA 疾病进展密切相关,且在 OA 的发生、发展中发挥了重要推动作用。因而理清 OA 患者的病理性矿化形成机制对于寻找

OA 的治疗方法具有重要理论意义和临床指导价值。分析矿化的具体原因,软骨细胞内的钙、磷代谢紊乱以及 MV 的异常释放等因素可能发挥了重要促进作用,这些平衡的紊乱和功能异常在不同程度上加速了 OA 的进展。反过来看这些因素也可以成为治疗 OA 的关键靶点,而笔者通过阻断一个或者多个靶点最终可能达到迟滞病情发展甚至逆转病情治愈疾病的目的。但目前对于 OA 病理性矿化形成机制的研究还相对较少,有待于未来开展深入地研究,笔者相信这一类以阻断病理性矿化为手段的治疗方法将会为 OA 的治疗提供新的思路。

参考文献

- Hermann W, Lambova S, Muller - Ladner U. Current treatment options for osteoarthritis [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2018, 14 (2): 108 - 116
- Vina ER, Kwoh CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018, 30 (2): 160 - 167
- 张勉, 杨鸿旭, 刘晓东, 等. 软骨细胞 CaSR 在异常生物力诱导的颞下颌关节骨关节炎中的作用研究 [C]. 昆明: 中华口腔医学会第十五次全国颞下颌关节病学及牙合学学术研讨会, 2018
- Conway R, McCarthy GM. Calcium - containing crystals and osteoarthritis: an unhealthy alliance [J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2018, 20 (3): 13
- Zhang M, Yang H, Wan X, *et al.* Prevention of injury - induced osteoarthritis in rodent temporomandibular joint by targeting chondrocyte CaSR [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34 (4): 726 - 738
- O'Connor CJ, Ramalingam S, Zelenski NA, *et al.* Cartilage - specific knockout of the mechanosensory ion channel TRPV4 decreases age - related osteoarthritis [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29053
- Cianferotti L, Gomes AR, Fabbri S, *et al.* The calcium - sensing receptor in bone metabolism: from bench to bedside and back [J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26 (8): 2055 - 2071
- Santa Maria C, Cheng Z, Li A, *et al.* Interplay between CaSR and PTH1R signaling in skeletal development and osteoanabolism [J]. *Stem Cell Dev Biol*, 2016, 49: 11 - 23
- Ao M, Chavez MB, Chu EY, *et al.* Overlapping functions of bone sialoprotein and pyrophosphate regulators in directing cementogenesis [J]. *Bone*, 2017, 105: 134 - 147
- Rosenthal AK. Articular cartilage vesicles and calcium crystal deposition diseases [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2016, 28 (2): 127 - 132

- Hasegawa T, Yamamoto T, Tsuchiya E, *et al.* Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle - mediated mineralization [J]. *Jpn Dent Sci Rev*, 2017, 53 (2): 34 - 45
- Bessueille L, Briolay A, Como J, *et al.* Tissue - nonspecific alkaline phosphatase is an anti - inflammatory nucleotidase [J]. *Bone*, 2020, 133: 115262
- Yuan FL, Xu RS, Ye JX, *et al.* Apoptotic bodies from endplate chondrocytes enhance the oxidative stress - induced mineralization by regulating PPI metabolism [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (5): 3665 - 3675
- Sun Y, Mauerhan DR, Honeycutt PR, *et al.* Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture [J]. *Arthr Res Ther*, 2010, 12 (2): R56
- Michigami T, Ozono K. Roles of phosphate in skeleton [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 180
- Kirsch T, Swoboda B, Nah H. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarth cartil [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8 (4): 294 - 302
- Einhorn TA, Gordon SL, Siegel SA, *et al.* Matrix vesicle enzymes in human osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 1985, 3 (2): 160 - 169
- Boskey AL, Boyan BD, Schwartz Z. Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel [J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60 (3): 309 - 315
- 洪佳丹, 何丽泳, 杨慧方, 等. 基质囊泡及其在骨矿化过程中的作用 [J]. *材料导报*, 2018, 32 (11): 1827 - 1833
- Derfus BA, Kurtin SM, Camacho NP, *et al.* Comparison of matrix vesicles derived from normal and osteoarthritic human articular cartilage [J]. *Connect Tissue Res*, 1996, 35 (1 - 4): 337 - 342
- 刘艺, 沈龙海. 骨关节炎关节软骨细胞外基质降解靶点的研究进展 [J]. *世界临床药物*, 2015, 36 (5): 353 - 357
- 薛松, 姜亚飞, 桑伟林, 等. 肥大软骨细胞在骨关节炎发病中的作用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (6): 522 - 526
- Battistelli M, Favero M, Burini D, *et al.* Morphological and ultrastructural analysis of normal, injured and osteoarthritic human knee menisci [J]. *Eur J Histochem*, 2019, 63 (1): 7 - 23
- Jubeck B, Gohr C, Fahey M, *et al.* Promotion of articular cartilage matrix vesicle mineralization by type I collagen [J]. *Arthr Rheum*, 2008, 58 (9): 2809 - 2817

(收稿日期: 2020 - 08 - 03)

(修回日期: 2020 - 10 - 02)

欢迎订阅

欢迎赐稿