

固本增骨方调控 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路防治原发性骨质疏松的研究进展

俞中超 蒋宜伟 周玉英 魏 博 海云翔 巩彦龙 罗春晖 刘 沛

摘 要 骨质疏松症(osteoporosis, OP)是重大公共卫生问题,尤其是原发性 OP 严重影响老年人生活质量,因此防治 OP 是当今研究的热点和难点。传统医学认为,OP 发生的病机以“脾肾亏虚”为主,先天肾与后天脾共司骨骼与肌肉作为人体运动的基础,“骨肉不相亲”、“骨枯髓空”的病理状态下降造成成骨细胞代谢异常,导致 OP 的发生。现代医学研究发现,OP 是人体衰老过程中由增龄性氧化应激、雌激素减少引起免疫系统低度活化、产生大量炎性介质引起,这些因素可以激活 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路,通过干预该途径影响骨代谢防治 OP。研究证实,固本增骨方能改善雌激素低下状态;降低大鼠骨髓中 IL - 1 β 的表达;调节 OP 大鼠肠道菌群结构及功能,通过培补脾肾、益气活血,多系统、多靶点防治 OP。基于以上研究,固本增骨方能调控 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路,抑制成骨细胞焦亡减少炎性细胞因子的表达,达到防治 OP 的作用。

关键词 成骨细胞焦亡 固本增骨方 骨质疏松

中图分类号 R274.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.03.038

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种全身性的骨代谢疾病,以骨微环境发生紊乱、骨小梁受到破坏、骨板稀疏变薄为主要结构改变,并伴有疼痛、畸形、骨折等临床症状^[1]。随着年龄的增长,骨质的逐渐流失会导致 OP,遗传因素占 60% ~ 80%,可改变的因素有负重运动、营养、体重和荷尔蒙环境等^[2]。据美国一项研究发现,大约有 1000 万 50 岁以上的美国人患有 OP,另有 3400 万人面临患 OP 的风险^[3]。伴随着我国老龄化人口的急剧增加,OP 已经成为我国亟待解决和研究的热点和难点问题,2018 年 10 月,国家卫生健康委员会发布的结果提示,我国 50 岁以上人群的 OP 患病率为 19.2%,女性的患病率达 32.1%,男性患病率达 6.0%^[4,5]。OP 引起的严重并发症也逐渐增多,轻者引起全身性渐进性骨痛,重者导致髋部、腰椎的脆性骨折,给患者和社会造成了巨大的负担。目前用于治疗 OP 的药物主要有双磷酸盐类药物、甲状旁腺素类似物、选择性雌激素受体调节剂、钙剂等^[6]。但有些药物由于存在严重不良反应、服用周期长及昂贵的费用等因素在临床使用时受到限制。有研究表明,中药对于恢复骨重建平衡疗效

显著,与西药单向调控机制比较,有些中药治疗调控双向化,调节效应更具优势^[7]。

现代研究发现,原发性 OP 是人体衰老过程中由增龄性氧化应激、雌激素减少引起的免疫系统的低度活化、产生大量的炎性介质引起,这些炎性介质被细胞识别后可以激活 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路而诱发成骨细胞焦亡,细胞焦亡后释放的 IL - 1 β 和 IL - 18 等多种炎性细胞因子,又可以通过多种途径来调节骨稳态,最终导致 OP 的发生^[8,9]。因此从 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 经典焦亡途径探讨 OP 的发病机制,可以为 OP 的防治提供新的理论支持。

一、NLRP3/caspase - 1/GSDMD 经典细胞焦亡通路

细胞焦亡是一种由 gasdermin 介导的程序性细胞坏死,表现为细胞肿胀、破裂,释放促炎性细胞因子(IL - 1 β 和 IL - 18)的炎性反应^[10]。当机体发生病变时,会通过一定途径促使炎性小体(NLRP3)形成,进而激活依赖胱天蛋白酶 1(caspase - 1)的经典细胞焦亡通路。活化的 caspase - 1 将底物蛋白 GSDMD 切割为有成孔活性的 N 末端和有自抑作用的 C 末端,GSDMD - N 通过成孔活性介导细胞焦亡。N 端结构域在细胞膜上形成直径为 10 ~ 20nm gasdermin D 孔洞,通过影响钠和钾的浓度梯度来破坏质膜的渗透性屏障,导致渗透压变化^[11]。当孔数超过细胞的

基金项目:国家自然科学基金(82160916);兰州市科技计划项目(2021 - 1 - 95);甘肃中医药大学“课程思政”项目(2020 年)

作者单位:730000 兰州,甘肃中医药大学

通信作者:蒋宜伟,电子邮箱:634559498@qq.com

补偿能力时,水通过渗透梯度流入细胞,然后细胞肿胀破裂死亡^[12]。同时从孔洞中释放出被 caspase - 1 切割成成熟形式的 IL - 1 β 和 IL - 18 而诱导焦亡^[13]。Liu 等^[14]通过负染色电子显微镜观察了含 PS 脂质体上的 GSDMD - NT 寡聚物,观察到质膜上的孔内径约为 15nm,外径约为 32nm,处理后的 IL - 1 β 直径约为 4.5nm,质膜孔明显大于活化后的 IL - 1 β ,只有质膜上的孔洞的形成,才能使成熟 IL - 18 和 IL - 1 β 炎性细胞因子的释放到细胞外。因此活化的 caspase - 1 将底物蛋白 GSDMD 切割为有成孔活性的 N 末端是发生细胞焦亡的关键环节。Yang 等^[15]研究发现,高糖浓度可能通过 caspase - 1/gasdermin D (GSDMD)/IL - 1 β 通路激活细胞焦亡,进而抑制牙槽骨成骨细胞的增殖和分化,这为糖尿病患者牙槽骨疾病的临床治疗及骨代谢提供了理论依据。Liu 等^[16]报道,脂多糖引起的氧化应激诱导成骨细胞焦亡,进而导致成骨功能障碍。NLRP3/caspase - 1/GSDMD 是发生细胞焦亡的经典途径之一,临床上诸多疾病都伴随有细胞焦亡现象的发生,如感染、痛风、免疫缺陷疾病、自身免疫性疾病等。

二、成骨细胞焦亡机制与 OP 的相关性

成骨细胞是单核骨形成细胞,起源于骨髓间充质干细胞 (marrow mesenchymal stem cells, MSCs), 是维持骨代谢和骨强度最重要的细胞^[17]。在人体衰老过程中会引起增龄性氧化应激、雌激素减少、免疫系统的低度活化、并产生大量炎性介质,在这些因素的影响下, NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路被激活,导致细胞发生破裂死亡。同时 pro - IL - 1 β 、pro - IL - 18 被活化的 caspase - 1 切割成成熟的炎性细胞因子 IL - 1 β 、IL - 18,通过细胞膜上形成的 gasdermin D 孔洞或者后期细胞发生破裂释放到外环境中加重炎症状况。焦亡过程中释放的 IL - 1 β 和 IL - 18 以多种方式促进破骨细胞的形成。IL - 1 β 可以通过增加巨噬细胞集落刺激因子的产生来激活破骨细胞,并且还可以抑制破骨细胞凋亡^[18]。IL - 1 β 还可结合其在 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和巨噬细胞上的受体,促进核因子 - κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of NF - κ B ligand, RANKL) 的产生,从而促进破骨细胞的分化和激活^[19]。IL - 18 可以通过诱导 γ - 干扰素的分泌以及作用于 T 淋巴细胞,还可以上调 IL - 17 的产生。IL - 17 或 IL - 1 β 均可诱导树突细胞转分化为破骨细胞^[20]。NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路通过影响成骨细胞焦亡直接抑制成

骨,并在炎症诱导下促进破骨细胞的分化,引起骨吸收和骨重塑的不平衡,从而导致 OP。Xu 等^[21]研究成骨细胞表达 NLRP3,其介导细菌诱导的细胞死亡并参与炎症期间的骨质流失。此外,在雌激素缺乏的 OP 中,未观察到直接细菌感染,但 NLRP3 水平仍然上升,成骨细胞的活力显著增加,当 NLRP3 被抑制或灭活时,OP 也得到缓解^[22]。由此可知雌激素缺乏可以激活成骨细胞焦亡经典通路。由于 ROS 作为触发因子和 NLRP3 炎性小体效应的双重作用,在年龄相关性 OP 中,焦亡对破骨细胞生成的刺激可能更为明显。因此当身体暴露于外部刺激时,例如细菌感染、雌激素缺乏或衰老信号, NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡炎症途径被激活,炎性细胞因子 IL - 1 β 和 IL - 18 分泌增加,进一步激活破骨细胞导致骨质流失的加重。

三、固本增骨方对 OP 的防治

中医学认为 OP 当属“骨痿”“骨痹”的范畴。骨痿的基本病机为脾肾亏虚,骨枯而髓减,经筋痿废不用。亦如《素问·痿论篇》云:“肾者,水脏也,今水不胜火,则骨枯而髓虚……发为骨痿”,认为肾者先天之本也,主骨生髓,若肾气、肾精亏虚,不能充养骨髓则致骨痿。又脾为后天之本,脾虚则先天无以资,筋肉不能荣,骨肉不相亲而发为骨痿,正如李东垣在《脾胃论·脾胃盛衰论》提出:“脾病则下流乘肾……则骨乏无力……令人骨髓空虚,是为骨痿”。又肾主骨生髓,脾主身之肌肉,先天肾与后天脾共司骨骼与肌肉作为人体运动的基础,“骨肉不相亲”“骨枯髓空”的病理状态下成骨细胞代谢异常,进一步导致 OP 的发生。中医中药在治疗 OP 有独特的临床疗效,经过多年研究证实,固本增骨丸可以通过多种途径达到防治 OP 的作用。

1. 固本增骨方的方义:固本增骨方由炙黄芪、岷当归、淫羊藿、白条党参、金毛狗脊、肉苁蓉、乌药等甘肃道地药材组成为主,是甘肃省名中医宋敏教授以中医辨证论治为指导,根据多年临床经验及患者体质差异,参考相关中药药理机制,以“增骨丸”和“补肾固本方”为基础进行组方加减而成的经验方,通过前期实验研究及临床观察,其治疗 OP 疗效确切^[23]。方中当归味甘而辛,善补血活血,炙黄芪味甘性温补气升阳,补益中焦;二药合用有气血双补之效,共成君药。淫羊藿补肾阳、强筋骨善治肾虚引起的筋骨痿软;党参味甘性平可健脾益气,养血生津,与黄芪、当归相配增强补气生血之力;熟地黄味甘微温可滋阴补

血、益精填髓,与当归同用可增强补血之效,与淫羊藿相配以增补肾之功,三者同为臣药。狗脊甘苦性温,有补肝肾、强腰膝之效,肉苁蓉甘温有补肾阳、益精血之功,乌药温肾散寒、行气止痛使诸药补而不塞,四者同为佐使。诸药合用共奏益气健脾、补肾壮骨、活血通络之功。巩彦龙等^[24]研究发现,固本增骨方可以改善去卵巢大鼠肠内微生态失衡,改善“脾虚”状态,维持机体正常消化吸收功能,促进吸收转化,使之“骨”“肉”之“相亲”,为运用健脾补肾法治绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)提供了现代科学依据。

2. 固本增骨方对 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路的干预:(1) 炎性细胞因子:人体衰老过程中会引起增龄性氧化应激、雌激素减少、免疫系统的低度活化、产生大量炎性介质,这些炎性介质可通过多种途径影响骨代谢,导致 OP 的发生和发展^[25]。李瑶等^[26]通过实验发现炎性细胞因子 IL - 1 β 能够引起 NF - κ B 信号通路的异常活化,而 NF - κ B 是炎症的关键激活剂,通过诱导促 IL - 1 β 和 NLRP3 表达来启动 NLRP3 炎性小体以进行激活^[27]。进一步激活 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路,使成骨细胞发生破裂死亡,最终导致 OP 的发生。根据对固本增骨方药效学研究,并通过动物实验证实:固本增骨方可以降低大鼠骨髓中 IL - 1 β 的表达,而 IL - 1 β 是 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路的激活物质,因此固本增骨方可以通过调控 IL - 1 β , 影响 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路,达到防治 OP 的目的^[28]。(2) 雌激素:雌激素水平下降常常被认为是导致 PMOP 的重要因素,研究发现雌激素可以通过影响骨重塑率来调节骨骼的状态,能够直接诱导破骨细胞的凋亡,减少体外诱导的破骨细胞分化,从而减少破骨细胞的骨吸收作用^[29]。贾智等^[30]研究表明,雌激素缺乏能够激活核 NF - κ B 信号通路,可能在牙周骨吸收中发挥一定作用。而 NF - κ B 又是 NLRP3 炎性小体的关键激活剂。此外雌激素对炎性因子也有直接干预效应,雌激素缺乏会导致成骨细胞中 IL - 1、IL - 6 及 TNF - α 分泌自发增加,而炎性细胞因子的增加也可以激活 NLRP3 炎性小体,因此雌激素可以通过影响 NF - κ B 和炎性细胞因子而调控 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路^[31]。Jiang 等^[32]也报道了维生素 D/维生素 D 受体通过下调 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 焦亡途径减轻顺铂诱导的急性肾损伤,为治疗急性肾

损伤提供新思路。

固本增骨方具有雌激素样作用,可以改变骨代谢及骨微结构,达到防治 OP 的作用。药理学研究表明,固本增骨方含有异黄酮、木犀草素、槲皮素、山柰酚、 β - 谷甾醇等成分^[33]。顾艺婧等^[34]研究发现“槲皮素”能发挥类雌激素样作用,抑成骨细胞成熟前衰老,减少 OP 小鼠骨量丢失。曾意荣等^[35]研究发现,“山柰酚”可激活雌激素受体,提高成骨细胞 MG - 63 的增殖分化,促进成骨细胞矿化。董万涛等^[36]也研究证实固本增骨方可以改善卵巢切除 OP 大鼠雌激素低下状态,提高成骨细胞的增殖分化能力,抑制破骨细胞活性,调节骨代谢高转换状态,预防骨量丢失。因此固本增骨方能改善去卵巢 OP 大鼠肠内微生态失衡、“脾虚”状态,调节机体雌激素、炎症微环境等抑制 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路,通过多系统、多靶点、多途径达到防治 OP 的目的。

四、展 望

原发性 OP 的高发人群是绝经后女性以及老年人,中医认为 OP 发生的病机以“脾肾亏虚”为主,先天肾与后天脾共司骨骼与肌肉,作为人体运动的基础,“骨肉不相亲”“骨枯髓空”的病理状态下降导致成骨细胞代谢异常,最终导致 OP 的发生。现代医学研究发现,OP 是由增龄性氧化应激、雌激素减少引起的免疫系统的低度活化、产生大量的炎性介质而引起,这些因素被成骨细胞识别后可以激活 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路而诱成骨细胞焦亡,细胞焦亡后释放的 IL - 1 β 和 IL - 18 等多种炎性细胞因子又可以通过多种途径来调节骨稳态,最终导致 OP 的发生。固本增骨方可改善雌激素低下状态;降低大鼠骨髓中 IL - 1 β 的表达;调节 OP 大鼠肠道菌群结构及功能,通过培补脾肾、益气活血,多系统、多靶点有效防治 OP。基于以上研究,固本增骨方能通过调节 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 成骨细胞焦亡通路,抑制成骨细胞焦亡进而减少炎性细胞因子的表达,达到防治 OP 的作用。

参考文献

- Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis[J]. Lancet, 2019, 393(10169): 364 - 376
- Chen LR, Ko NY, Chen KH. Medical treatment for osteoporosis: from molecular to clinical opinions[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2213
- Clynes MA, Harvey NC, Curtis EM, et al. The epidemiology of osteoporosis[J]. Br Med Bull, 2020, 133(1): 105 - 117

- 4 汪纯. 原发性骨质疏松症发病及诊治的现状和展望[J]. 诊断学理论与实践, 2020, 19(3): 209–213
- 5 Vidal M, Thibodaux RJ, Neiral L, *et al.* Osteoporosis: a clinical and pharmacological update[J]. Clin Rheumatol, 2019, 38(2): 385–395
- 6 Tadrous M, Mamdani MM, Juurlink DN, *et al.* Comparative gastrointestinal safety of bisphosphonates in primary osteoporosis: a network Meta-analysis – reply to Pazianas and Abrahamsen[J]. Osteoporos Int, 2014, 25(11): 2671–2672
- 7 李延红, 龚福太, 石耀武, 等. 原发性骨质疏松症中西医结合治疗现状及研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(5): 690–694
- 8 Azizieh FY, Shehab D, Jarallah KA, *et al.* Circulatory levels of RANKL, OPG, and oxidative stress markers in postmenopausal women with normal or low bone mineral density[J]. Biomark Insights, 2019, 14: 1177271919843825
- 9 Greene E, Flees J, Dhamad A. Double-stranded RNA is a novel molecular target in osteomyelitis pathogenesis: a translational avian model for human bacterial chondronecrosis with osteomyelitis[J]. Am J Pathol, 2019, 189(10): 2077–2089
- 10 胡颖超, 杨硕. 细胞焦亡的研究进展[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2021, 41(8): 1245–1251
- 11 Ding J, Wang K, Liu W, *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family[J]. Nature, 2016, 535(7610): 111–116
- 12 Gong W, Shi Y, Ren J. Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases[J]. Immunobiology, 2020, 225(2): 151884
- 13 Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. Nature, 2016, 535(7610): 153–158
- 14 Liu X, Zhang Z, Ruan J, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores[J]. Nature, 2016, 535(7610): 153–158
- 15 Yang L, Liu J, Shan Q, *et al.* High glucose inhibits proliferation and differentiation of osteoblast in alveolar bone by inducing pyroptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522(2): 471–478
- 16 Liu S, Du J, Li D, *et al.* Oxidative stress induced pyroptosis leads to osteogenic dysfunction of MG63 cells[J]. J Mol Histol, 2020, 51(3): 221–232
- 17 Cho E, Chen Z, Lee J, *et al.* PSTP-3, 5-Me inhibits osteoclast differentiation and bone resorption[J]. Molecules, 2019, 24(18): 3346
- 18 Lacativa PG, Farias ML. Osteoporosis and inflammation[J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2010, 54(2): 123–132
- 19 Nakamura I, Jimi E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1[J]. Vitam Horm, 2006, 74: 357–370
- 20 Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, *et al.* IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF- α antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17[J]. J Cell Biochem, 2009, 108(4): 947–955
- 21 Xu LT, Wang T, Fang KL, *et al.* The ethanol extract of flower buds of *Tussilago farfara* L. attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation through regulating NLRP3 inflammasome, Nrf2, and NF- κ B[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 283: 114694
- 22 Xu L, Shen L, Yu X, *et al.* Effects of irisin on osteoblast apoptosis and osteoporosis in postmenopausal osteoporosis rats through upregulating Nrf2 and inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(2): 1084–1090
- 23 宋敏, 王玉泉, 柳申朋, 等. 增骨丸对大鼠骨质疏松模型影响的实验研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2007, 24(4): 7–10
- 24 巩彦龙, 董万涛, 宋敏, 等. 基于16S rDNA序列分析骨质疏松大鼠肠道菌群结构变化及固本增骨方的调控机制[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2040–2045
- 25 Thanakun S, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Izumi Y, *et al.* C-reactive protein levels and the association of carotid artery calcification with tooth loss[J]. Oral Dis, 2017, 23(1): 69–77
- 26 李瑶, 孙中仪, 戴健, 等. 椎间盘退变 IL-1 β 激活 NF- κ B 信号通路增强 ADAMTS-4 的表达[J]. 中国矫形外科杂志, 2021, 29(23): 2177–2181
- 27 Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, *et al.* NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria[J]. Cell, 2016, 164(5): 896–910
- 28 李宁, 谢兴文, 宋敏, 等. 中药增骨丸对去卵巢大鼠骨髓 IGF-1 和 IL-1 β 的影响[J]. 中国骨伤, 2004, 17(9): 524–526
- 29 Slemenda C, Hui SL, Longcope C, *et al.* Sex steroids and bone mass. A study of changes about the time of menopause[J]. J Clin Invest, 1987, 80(5): 1261–1269
- 30 贾智, 张丰伟, 祁颖颖, 等. 雌激素缺乏状态下牙周组织中核转录因子 κ B 及白细胞介素 17 的表达变化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(24): 3796–3802
- 31 Zhou Q, Zhu L, Zhang D, *et al.* Oxidative stress-related biomarkers in postmenopausal osteoporosis: a systematic review and Meta-analysis[J]. Dis Markers, 2016, 2016: 7067984
- 32 Mishina Y, Starbuck MW, Gentile MA, *et al.* Bone morphogenetic protein type IA receptor signaling regulates postnatal osteoblast function and bone remodeling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(26): 27560–27566
- 33 王凯. 固本增骨方治疗骨质疏松症的网络药理学研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2020
- 34 顾艺婧, 傅稼耀, 武文婧, 等. 槲皮素通过抗骨相关细胞衰老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J]. 同济大学学报: 医学版, 2019, 40(3): 274–280
- 35 曾意荣, 曾建春, 樊粤光, 等. 山柰酚对成骨细胞株 MG-63 增殖分化的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1463–1465
- 36 董万涛, 巩彦龙, 宋敏, 等. 固本增骨方对卵巢切除模型大鼠骨代谢和骨微结构的影响[J]. 四川大学学报: 医学版, 2019, 50(5): 679–683

(收稿日期: 2022-04-18)

(修回日期: 2022-05-04)