·综 述·

硫氧还蛋白系统在骨质疏松症中的作用

李运芝，武小薇*
（哈尔滨医科大学附属第二医院老年综合内科，哈尔滨 150086）

【摘 要】 越来越多的研究表明氧化应激与骨质疏松症的发生密切相关，而硫氧还蛋白（Trx）系统其中一个重要作用就是参与调节细胞氧化还原状态以对抗氧化应激，其是由Trx、硫氧还蛋白还原酶（TrxR）和还原型辅酶Ⅱ（NADPH）以及硫氧还蛋白相互作用蛋白（TXNIP）组成的多功能小分子蛋白系统，因此在骨质疏松症的发生发展中扮有重要角色。本文综述了硫氧还蛋白系统和骨质疏松症之间的联系。

【关键词】 硫氧还蛋白系统；氧化应激；骨质疏松症
【中图分类号】 R589.9 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.10.190

Role of thioredoxin system in osteoporosis

LI Yun-Zhi, WU Xiao-Wei*
(Department of Geriatric Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

【Abstract】 More and more studies indicate that oxidative stress is closely related to the occurrence of osteoporosis. But thioredoxin (Trx) system is a multifunctional small molecule protein system, consisting of Trx, thioredoxin reductase (TrxR), reduced coenzyme Ⅱ (NADPH) and thioredoxin interacting protein (TXNIP), and one of its important roles is involved in regulating cellular redox state against oxidative stress, and thus plays an important role in the occurrence and development of osteoporosis. This article reviewed the relationship between the thioredoxin system and osteoporosis.

【Key words】 thioredoxin system; oxidative stress; osteoporosis
This work was supported by the Science and Technology Research Project of Bareau of Education of Heilongjiang Province (11541160) *and the Youth Science Foundation of Heilongjiang Province* (QC2009C34).
Corresponding author: WU Xiao-Wei, E-mail: wuxw75@163.com

骨质疏松症（osteoporosis，OP）是一种以骨量降低和骨组织微结构破坏为特征，导致骨脆性增加和易于骨折的代谢性骨病[1]。其发病病因多样，分子机制复杂，已成为影响人们生活质量的流行病之一。人体处于一个富氧的环境，在其代谢过程中不可避免地不断产生活性氧（reactive oxygen species，ROS），当人体因各种原因导致ROS生成与消除之间失平衡时，机体便产生氧化应激（oxidative stress，OS）。越来越多的研究发现ROS诱导的氧化应激在OP中发挥重要作用。而硫氧还蛋白（thioredoxin，Trx）系统为体内重要的抗氧化应激因子之一，其是否能延缓OP的发生目前国内外还没有确切的研究报道。本文就Trx系统与OP之间联系进行综述。

1 硫氧还蛋白系统及其作用

1.1 硫氧还蛋白系统的结构特性

Trx是一类普遍存在的多功能小分子蛋白，分为Trx-1（细胞质和细胞核）、Trx-2（线粒体）和spTrx（内质网），目前研究的较多的是Trx-1。Trx-1普遍存在于原核和真核生物中，由105个氨基酸组成，相对分子质量约为12 ku，其氨基酸序列中含有调节氧化还原活性的二硫键/巯基，该结构位于保守序列Trp-Cys-Gly-Pro-Cys中。氧化型Trx-1（Trx-S_2）含有二硫键，还原型Trx-1[Trx-$(SH)_2$]含有巯基。Trx-1主要通过二硫键和巯基之间的相互转换实现其氧化还原调节功能。氧化型Trx-1可通过Trx还原酶

收稿日期：2016-04-23；修回日期：2016-07-21
基金项目：黑龙江省教育厅科学技术研究项目（11541160）；黑龙江省青年科学基金项目（QC2009C34）
通信作者：武小薇，E-mail：wuxw75@163.com

(thioredoxin reductase, TrxR)被还原而恢复活性。因此Trx-1对细胞抵御氧化应激损伤和维持细胞内正常的氧化-还原平衡具有重要的作用。

Trx相互作用蛋白(thioredoxin interacting protein,TXNIP)又称为Trx结合蛋白2或维生素D3上调蛋白1,它与还原型Trx的活性中心发生作用,从而抑制Trx的还原活性,因此TXNIP被认为是Trx的一个内源性负调节因子[2]。丙二醛、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是目前用来评估机体氧化、还原水平最常用的指标。吴亚利等[3]研究表明,TXNIP与丙二醛呈正相关,与SOD呈负相关,表明TXNIP可以反映机体的氧化应激水平。

1.2 硫氧还蛋白的抗氧化作用

作为体内的还原系统,Trx具有对抗氧自由基的作用,目前认为Trx抗氧化的主要机制:(1)抑制呼吸链电子传递链Ⅰ,进而减少ROS的产生;(2)在还原型辅酶Ⅱ,即还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)的作用下,还原型的Trx作为电子供体通过某些过氧化物酶将H_2O_2还原成H_2O,从而清除部分ROS,降低过量ROS造成的细胞脂质过氧化、蛋白质及DNA变性;(3)作为二硫键还原酶,Trx能还原磷酸酶、激酶、转录因子等蛋白的二硫键从而恢复其生理功能,减轻氧化损伤;(4)调节氧化应激的相关蛋白,如血红素加氧酶-1、一氧化氮合酶的表达,发挥抗氧化作用[4,5]。

目前,在一些氧化应激相关性疾病如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)、神经退行性疾病和糖尿病等的研究中已经发现,Trx系统起着重要作用。Tanabe等[6]用一种病毒和香烟烟雾诱导的固有免疫激动剂聚肌胞苷酸[polyinosine-polycytidylic acid, poly(I:C)]处理C57B1/6小鼠后发现其肺部细胞的凋亡和氧化应激的发生率增加,进而引起肺气肿,导致COPD的发生。但在腹腔注入Trx-1的情况下,肺气肿的变化明显改善,肺内中性粒细胞的入侵减少,炎症减轻。Yamawaki等[7]研究发现心肌炎患者的心肌细胞中Trx-1增加。相对于健康受试者,腹主动脉瘤患者血清Trx-1的水平显著提高,且其水平与腹主动脉瘤大小以及进展程度密切相关,因此血清Trx-1可以作为判断腹主动脉瘤进展的潜在生物标志物[8]。Hwang等[9]研究发现迟发性神经元死亡与Trx-2的时间顺序性变化有关,认为Trx-2可通过抑制线粒体介导的凋亡和降低脂质过氧化物对缺血脑细胞表现出明显的保护作用。

1.3 硫氧还蛋白的抑制凋亡作用

在诱导细胞凋亡中起中枢作用的蛋白酶,即细胞凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK-1),既存在于胞浆中,又存在于线粒体中,可从内源和外源两种途径诱发细胞凋亡。研究证实,Trx-1和Trx-2可分别与胞浆和线粒体内的ASK-1结合,形成蛋白-蛋白复合物,诱导ASK-1泛素化和降解,阻断ASK-1下游的促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)家族成员蛋白激酶p38(protein kinase p38,PKp38)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, c-JNK)、胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinases,ERK)诱导的细胞凋亡,保护细胞。研究证实,敲除Trx-1或用RNA干扰技术沉默Trx-2或使ASK-1变异,导致Trx不能与ASK-1结合,均会导致c-JNK依赖的凋亡途径激活,引发下游的CtyC的释放和胱天蛋白酶(caspase-3)的激活,使凋亡不可逆转[10-12]。体内存在着许多的先天性抑制因子可以抑制ASK-1介导的细胞凋亡,在哺乳动物中,Trx则是ASK-1的直接抑制剂[13],而Trx/ASK1-MAPKs也成为引发细胞凋亡的经典途径[14]。

2 氧化应激与骨质疏松症

OS是指机体在遭受各种有害刺激时,体内产生过多的高活性分子如ROS和活性氮自由基,氧化程度超出氧化物的清除,导致氧化/抗氧化失衡的一种状态,从而引发组织损伤,并被认为是导致OP的独立危险因素[15]。晚期氧化蛋白质终产物(advanced oxidation protein products, AOPPs)是体内蛋白质在氧化应激状态下生成的一类双酪氨酸蛋白质交联物,能引起老年大鼠骨量减少、骨微结构退行性改变,促进骨退化[16]。Baek等[17]用AOPP刺激破骨细胞(osteoclast,OC)时,OC增殖率上升,并且可以释放炎性介质破坏骨质。因此,可推测OS与OP的发生和进展有密切联系[18,19]。王簕等[20]研究发现反映OS水平的AOPP与骨密度(bone mineral density, BMD)呈负相关,与骨破坏指标β-Ⅰ型胶原羧基末端肽(β-type Ⅰ collagen carboxy-terminal peptide, β-CTX)呈正相关,说明了OS可以促进骨质破坏,导致骨破坏指标升高。

2.1 氧化应激对成骨细胞的影响

体外研究发现单纯H_2O_2处理成骨前体细胞MC3T3-E1可以明显降低成骨分化标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色和定量结果;减

少细胞外基质钙沉积量;下调成骨分化相关基因ALP、Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen,COL-1)和骨钙素(osteocalcin,OCN)的表达水平,用抗氧化剂二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)预处理24 h后,TSG(0.1~10 μmol/L)以剂量依赖方式明显改善ALP活性,改善ALP染色和钙结节沉积,显著提高成骨分化基因ALP、COL-1和OCN的表达水平,说明OS能抑制成骨前体细胞MC3T3-E1成骨分化能力;研究还发现H_2O_2能促进促凋亡蛋白Bax的表达,抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,导致成骨前体细胞出现较大程度的凋亡,说明OS能促进成骨前体细胞MC3T3-E1凋亡增加[21]。

Almeida等[22]通过对UAMS-32细胞加入一种能阻断H_2O_2诱导p66shc丝氨酸磷酸化的阻断剂Ly333531处理后,发现其能阻断H_2O_2诱导的成骨细胞(osteoblast,OB)凋亡,接着加入一种蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)β强激活剂佛波酯(phorbol myristate acetate,PMA),发现前者阻断效应可被扭转。由此可推测出ROS可通过激活PKCβ调节p66sch丝氨酸(Ser36)磷酸化,并使其从细胞质进入线粒体,增加H_2O_2的产生以及激活JNK通路,诱导OB凋亡。综合以上发现,ROS不仅降低OB的生成,还诱导OB凋亡,最终减少OB数量,降低骨形成,引起OP。

2.2 氧化应激对破骨细胞的作用

ROS主要通过促进OC分化和骨吸收而促使OP的发生。目前ROS对OC作用机制的研究主要关注OC前体细胞和OC本身,但其主要作用机制不是ROS对OC本身,而是ROS通过刺激骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)和OB的核因子-κB(nuclear factor-kappa B,NF-κB)受体激活剂配体(receptor of activator of nuclear factor κB-ligand,RANKL)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor,M-CSF)和骨保护素(osteoprotegerin,OPG)等的表达而影响OC的分化、生存和活化。

无翼型MMTV整合位点(Wnt)是一类分泌型糖蛋白,富含半胱氨酸。在Wnt信号通路的作用下,间充质干细胞分化为OB。OB中经典的Wnt/β-catenin信号通路也调节OC形成[23]。在骨重建过程中连接骨形成与骨吸收的关键分子为RANKL和OPG[24]。Wnt信号通路可升高OPG水平,下调RANKL的表达,不仅促进OB活性,还抑制骨吸收。相反,在OC前体细胞中,激活非经典的Wnt通路可增强RANKL诱导的OC分化。因此Wnt信号通路具有调节OB和OC分化的双重作用[25]。

核氧化还原蛋白(nucleoredoxin, NRX)是一种Trx相关蛋白,可以暂时性控制ROS刺激的Wnt信号。NRX能够与散乱蛋白(dishevelled,Dvl)相互作用,阻断Wnt通路的活化,而H_2O_2可使Dvl与NRX发生解离,激活Wnt下游信号通路[26],但其机制有待深入研究。由此推测Trx能抑制OC分化。

2.3 氧化应激对细胞外基质的影响

骨组织中的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)是ROS的一个重要靶点。ROS可引起ECM降解,例如,·OH可诱导ECM分子之间发生交联,引起胶原和纤连蛋白降解,抑制OB的增殖、分化和矿化过程,从而抑制骨形成作用[27]。Halleen等[28]发现ROS可降解骨基质。

综上所述,ROS在骨代谢中发挥了重要作用:(1)抑制成骨前体细胞MC3T3-E1成骨分化能力,并促进其凋亡增加;(2)激活PKCβ调节p66shc Ser36磷酸化并激活JNK通路,诱导OB凋亡;(3)在OC前体细胞中,通过激活非经典的Wnt通路的下游信号通路,增强RANKL诱导的OC分化;(4)降解骨基质。ROS刺激OC的活化和分化,抑制OB的分化,并直接参与骨基质的降解,在原发性OP的发病机制中发挥了重要作用。而Trx系统作为体内重要的氧化还原系统,具有抗氧化、抑制凋亡的作用,从而发挥对抗氧化应激相关疾病,OP进展的作用,为OP的治疗提供一个新的靶点。

3 结语和展望

ROS主要是通过增加OC的活性、减少OB的生成及促进其凋亡和直接参与骨有机质的降解而参与和促进OP的病理发生过程。Trx系统作为机体主要的氧化还原调节机制之一,可调节细胞的氧化还原状态,清除体内的ROS,在众多氧化应激性疾病发生中发挥重要作用,因此开发Trx激动剂、TXNIP抑制剂或沉默TXNIP基因类药物,以减轻体内氧化应激造成的伤害,必将成为治疗这类疾病的新手段,且已有这方面可喜的临床应用报道。牛痘疫苗接种家兔炎症皮肤提取物注射液可通过诱导Trx-1表达而起到对肺细胞的保护效应,该药对吸入香烟或H_2O_2所致的鼠肺上皮细胞损伤有保护作用,可用于如COPD等涉及氧化应激所致肺疾病的治疗[29]。目前国内外对Trx系统延缓OP发生发展研究还有待进一步深入,以便为OP的治疗寻找并提供新的作用靶点,为将来治疗OP特异性药物的开发提供依据。

【参考文献】

[1] Ge JB, Xu YJ. Internal Medicine[M]. 8th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013: 860.[葛均波, 徐永健. 内科学[M]. 第8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 860.]

[2] Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, *et al*. Antioxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2 [J]. Pharmacol Ther, 2010, 127(3): 261-270.

[3] Wu YL, Long M, Zhang XC, *et al*. The possible relationship between thioredoxin-interacting protein and the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2014, 30(8): 682-685.[吴亚利, 龙 敏, 张学翠, 等. 硫氧还蛋白相互作用蛋白与糖尿病致病机制关系的探讨[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(8): 682-685.]

[4] Saxena G, Chen J, Shalev A. Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin-interacting protein[J]. J Biol Chem, 2010, 286(6): 3997-4005.

[5] Gao JB. Biological function of thioredoxin and its relationship with human diseases[J]. Guide China Med, 2013, 11(18): 90-92.[高建波. 硫氧还蛋白的生物学功能及与人类疾病的关系[J]. 中国医药指南, 2013, 11(18): 90-92.]

[6] Tanabe N, Hoshino Y, Marumo S, *et al*. Thioredoxin-1 protects against neutrophilic inflammation and emphysema progression in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79016.

[7] Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis[J]. Circ Res, 2003, 93(11): 1029-1033.

[8] Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Blanco-Colio LM, *et al*. Increased levels of thioredoxin in patients with abdominal aortic aneurysms(AAAs). A potential link of oxidative stress with AAA evolution[J]. Atherosclerosis, 2010, 212(1): 333-338.

[9] Hwang IK, Yoo KY, Kim DW, *et al*. Changes in the expression of mitochondrial peroxiredoxin and thioredoxin in neurons and glia and their protective effects in experimental cerebral ischemic damage[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(9): 1242-1251.

[10] Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, *et al*. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology[J]. Annu Rev Genet, 2009, 43(3): 335-367.

[11] Yang L, Wu D, Wang X, *et al*. Depletion of cytosolic or mitochondrial thioredoxin increases CYP2E1-induced oxidative stress *via* an ASK-1-JNK1 pathway in HepG2 cells[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(1): 185-196.

[12] Chen X, Tang W, Liu S, *et al*. Thioredoxin-1 phosphorylated at T100 is needed for its anti-apoptotic activity in HepG2 cancer cells[J]. Life Sci, 2010, 87(7-8): 254-260.

[13] Saitoh M, Nishitoh H, Makiko Fujii M, *et al*. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK)1[J]. EMBO J, 1998, 17(9): 2596-2606.

[14] Wu DF, Cederbaum A. Activation of ASK-1 and downstream MAP kinases in cytochrome P4502E1 potentiated tumor necrosis factor alpha liver injury[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(3): 348-360.

[15] Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, *et al*. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2007, 8: 124.

[16] Zeng JH, Zhong ZM, Xiao Q, *et al*. Effect of advanced oxidation protein products on bone mineral density and bone microstructure in senile rats[J]. Chin J Osteoporos, 2015, 21(11): 1313-1317.[曾纪焕, 钟招明, 肖 强, 等. 晚期氧化蛋白质终产物对老年大鼠骨密度和骨微结构的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(11): 1313-1317.]

[17] Baek KH, Oh KW, Lee WY, *et al*. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures[J]. Calcif Tissue Int, 2010, 87(3): 226-235.

[18] Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause[J]. J Midlife Health, 2013, 4(3): 140-146.

[19] Wilson C. Bone: Oxidative stress and osteoporosis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(1): 3.

[20] Wang L, Lin QW, Bai YL, *et al*. The relationship between oxidative stress and bone metabolism in the elder people with osteoporosis[J]. Chin J Osteoporos, 2015, 21(2): 192-195.[王 韧, 林启旺, 白玉玲, 等. 氧化应激和骨代谢水平与老年原发性骨质疏松症间的相互关系[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 192-195.]

[21] Zhang JK. The prevention of tetrahydroxy stilbene-2-o-β-D-glucoside on osteoporosis and the related mechanism[D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2013.[张金康. 二苯乙烯苷防治骨质疏松的作用及相关机制研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.]

[22] Almeida M, Han L, Ambrogini E, *et al*. Oxidative stress stimulates apoptosis and activaties NF-kappaB in osteoblastic cells *via* a PKCβ/p66shc signaling cascade; counter regulation by estrogens or androgens[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(10): 2030-2037.

[23] Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, *et al*. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease[J]. Gene, 2012, 492(1): 1-18.

[24] Tanaka H, Mine T, Ogasa H, *et al*. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling *in vivo* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(4): 690-694.

[25] Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, *et al*. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16(1): 21-30.

[26] Funato Y, Miki H. Redox regulation of Wnt signalling *via* nucleoredoxin[J]. Free Radic Res, 2010, 44(4): 379-388.

[27] Hosoya S, Suzuki H, Yamamoto M, *et al*. Alkaline phosphatase and type 1 collagen gene expressions were reduced by hydroxyl radical-treated fibronectin substratum [J]. Mol Genet Metab, 1998, 65(1): 31-34.

[28] Halleen JM, Raisanen SR, Alatalo SL, *et al*. Potential function for the ROS-generating activity of TRACP[J]. J Bone Miner Res, 2003, 18(10): 1908-1911.

[29] Hoshino Y, Nakamura T, Sato A, *et al*. Neurotropin demonstrates cytoprotective effects in lung cells through the induction of thioredoxin-1[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37(4): 438-446.

(编辑: 周宇红)