

· 综述 ·

一氧化氮与骨质疏松的研究进展

黄延玲 石凤英

近年来多项研究发现,一氧化氮(nitric oxide, NO)在骨代谢过程及骨疾病中发挥着极其重要的作用。本文现就 NO 与骨质疏松的关系作一综述,以期增进大家对两者间相互关系的了解。

NO 合成与代谢

NO 的合成是在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)介导下,以 L-精氨酸和分子氧为底物,经与电子氧化反应生成 NO 和胍氨酸。该反应过程需要多种因子参加,如:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、四氢生物蝶呤(BH₄)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FDA)、黄素单核苷酸(FMN)及血红素等^[1],并且 NO 的合成反应还可被精氨酸类似物抑制,如:L-硝基精氨酸甲酯或 L-单甲基精氨酸等^[2]。血红蛋白、肌红蛋白可以对抗 NO 经鸟苷酸环化酶的激活作用,亦起到阻断 NO 生成的作用。NO 也能以非酶的形式由亚硝酸盐在酸性环境(如:胃液)中产生^[3],或者由合成的硝酸盐类(如:硝酸甘油、硝普钠等)以药代学的方式产生^[4]。NO 在离体标本培养液中主要被氧化成亚硝酸盐,也可被快速氧化成高氧氮原子(NO_x),使含巯基的分子如谷胱甘肽、半胱氨酸或白蛋白等硝基化,故这些分子可作为 NO 载体或以生物形式沉积 NO。

目前已经证实,骨组织中 NOS 存在 3 种亚型,分别由不同基因编码,即神经元型(nNOS, NOS1)、诱导型(iNOS, NOS2)和内皮细胞型(eNOS, NOS3)。nNOS 和 eNOS 在生理状态下即有表达,称为结构型 NOS(cNOS),而 iNOS 在生理状态下不表达或低表达,只有在受到细胞因子等刺激后呈诱导性表达。eNOS 活性主要通过细胞间游离的 Ca²⁺ 调节,即通过 Ca²⁺ 与钙调蛋白的结合从而调节酶的催化活性。由该途径产生 NO 的量较少,浓度仅以皮摩尔(pmol)计量。eNOS 的活性还可通过蛋白激酶调节,如:一磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)可以介导缺血引起的 eNOS 释放,而多种刺激因子包括血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、雌激素及流体切变应激信号则可通过 Akt/PKB 磷酸化 eNOS 的 1177 号丝氨酸而激活 eNOS^[5]。目前对 eNOS 转录水平的调节了解相对较少,但通过对牛 eNOS 基因序列的研究发现,eNOS 的启动子上有多个转录因子结合位点,其中包括雌激素反应元件与剪切应激反应元件^[6]。对骨组织中 nNOS 表达的调节机制也了解甚少,通过 RT-PCR 法已经检测到骨组织中 nNOS mRNA 的表达,但在体内及体外实验中均未检测到骨细胞中 nNOS 蛋白的表达^[7]。iNOS 表达的调节主要发生在基因转录水平,iNOS 基因转录可被致炎因子(如:白细胞介素-1、肿瘤坏死因子- α 、 γ 干扰素或内毒素等)激活,而糖皮质激素及抗炎因子(如:白细胞介素-4、转化生长因子- β)则起抑制作用^[8]。

NO 对骨代谢的影响

我们在实验中发现,NO 供体(如:硝酸甘油等)可以预防由皮质醇引起的雄性大鼠骨质疏松症^[4],促进体外培养的成骨细胞生成,还可以缓解摘除卵巢后大鼠的骨量减少,这些都提示 NO 在骨代谢过程中具有非常重要的作用。目前已有充分证据表明,NO 对骨代谢的影响具有双向性,这与 NO 对破骨细胞(OC)及成骨细胞(OB)的影响具有双向性有关。基础浓度的 NO 是维持 OC 正常骨吸收功能所必需的,适当低浓度 NO 可促进 OC 前体向 OC 转化;低浓度 NO 还可增强由 IL-1 诱导的骨吸收作用,IL-1 首先作用于 OB,并通过 iNOS 途径提高 NO 的合成,从而增强 OC 前体细胞 NF- κ B 的核转录;然而 OC 前体细胞在缺乏 iNOS 的动物的实验中亦发现 IL-1 可激活 NF- κ B,但这种反应是短暂的,以上都提示 NO 在 NF- κ B 的持续激活过程中扮演着重要的角色^[11]。在细胞因子诱导下,过量表达的 iNOS 可造成 NO 生成量高于正常值 10 倍以上,而高浓度的 NO 可强烈抑制骨培养组织中或体外培养的 OC 的骨吸收活性,拮抗由 IL-1 和 TNF- α 引起的骨吸收作用^[12]。NO 及 NO 的供体林西多明(linsidomine, SIN-1)或硝普钠(SNP)可使分离 OC 的扩散范围显著缩小,但并不改变其膜的移动性,而且这种作用呈剂量依赖性。Ralston 等^[13]研究发现,高浓度的 NO 可以通过抑制 OC 的 c-fos 启动子表达,从而抑制 OC 生成。Percival 等^[14]则认为,NO 对 OC 活性的抑制可能是通过对组织蛋白 K 进行修饰、氧化硫醇残基、抑制其介导的骨胶原降解过程而实现的。NO 对 OB 活性的双重作用亦表现在,生理剂量的 NO 是 OB 生长及细胞因子产生的自分泌刺激剂。敲除 eNOS 基因(eNOS -/-)的小鼠其骨形成过程明显异常,通过对(eNOS -/-)小鼠股骨的组织形态学分析,发现其骨容量及骨形成速率分别下降 45% ($P < 0.01$) 和 52% ($P < 0.01$),并且 OB 的数量及其矿化活性都明显降低^[15];而超过一定阈值的高浓度 NO(如那些由致炎因子刺激后产生的大量 NO)则对 OB 具有毒性作用,可抑制 OB 成熟、分化及其功能发挥^[16]。

NO 与机械负荷对骨的作用

自 1892 年 Wolff 在他的骨转换定律中提出骨可根据其所受机械负荷而自行调整代谢的理论以来,机械负荷对骨代谢的影响也逐渐受到人们广泛关注,且机械负荷对骨密度及骨微观结构与宏观结构的影响也已在流行病学调查及动物实验中得到证实。如在一项对 480 名绝经期及绝经后妇女进行的随机对照实验中发现,运动可以抑制绝经后妇女的骨量减少,而且该作用随着绝经时间的延长,对照组与运动组间的差别愈加显著^[17]。Rubin 等^[18]利用短阵、极低量的高频振动对成年绵羊进行每日 20 min 的干预,1 年后该组绵羊股骨近端的骨密度较对照组提高了 34.2%。众所周知,骨是一种多孔组织,其间充满了可持续流动的液体,液体由血管压力及机械负荷驱动其流动,并可对骨

小管及沿着骨内膜走向的骨衬产生明显的切变应力。OB 及骨细胞都会对液体的流变力产生反应。Turner 等^[19]认为,骨细胞及骨衬细胞上存在应力感受器,可以感受机械负荷及液体切变应力产生的刺激,并以 NO 及前列腺素为信号分子,将信号传递给效应细胞——OB 或 OC,从而引发骨的吸收或重构,骨骼以此方式对机械刺激进行适当调整。有学者将来源于骨髓的类破骨细胞前体细胞暴露于精确设定的 16 dynes/cm² 的流体切变应激(FFS)中达 6 h,发现其 NO 的产生速率为 7.5 nmol/mg 蛋白·h。该产生速率是静息状态下的 10 倍,并且可被 NOS 抑制剂(L-NAA)所抑制^[20]。Zaman 等^[21]通过检测在生理机械负荷作用下 NOS 亚型 mRNA 及蛋白的表达,分析了机械负荷在体内及体外培养骨细胞中促 NO 产生的机制,并经 Northern blot 法、原位杂交及免疫细胞化学等方法证实:在机械负荷作用下,长骨骨膜的 OB 及皮质骨的骨细胞主要表达 eNOS,而 iNOS 及 nNOS 几乎不表达。Boo 等^[22]研究发现,内皮细胞在切变应激下,其 NO 产生主要通过以下两条途径完成:①依赖 PI3K/PKA 途径,磷酸化 eNOS 的 1179 号丝氨酸(相当于人 eNOS 的 1177 号丝氨酸),从而激活 eNOS;②依赖 PKA(但 PI3K 非依赖性的)途径,磷酸化 eNOS 的 635 号丝氨酸,激活 eNOS。其中 635 号丝氨酸的磷酸化在 eNOS 对机械负荷及流体切变应激引起 NO 释放的慢性调节过程中起重要作用。既往研究认为机械负荷主要是通过提高 eNOS 的活性来促进 NO 产生,其 eNOS mRNA 的水平并没有明显提高^[21],但 Rubin 等^[23]在其最近对破骨细胞调节机制的研究中发现,产自 eNOS 的 NO 可以起到减少骨吸收的作用,而细胞核因子 κ B 受体活化因子配基(RANKL)对骨吸收有促进作用,在生理水平的机械负荷作用下,RANKL 表达下调而 eNOS 的活性及基因表达水平均得到了提高,而且该提高幅度与机械负荷的大小呈正相关关系。骨组织对机械负荷的调整过程是通过 ERK1/2 MAP 激酶调节 eNOS 及 RANKL 水平而实现的。

NO 与雌激素对骨的作用

NO 在介导雌激素对骨组织的作用中亦扮演着重要角色。Samuels 等^[24]发现,分别给予雌性小鼠雌二醇(E₂)、L-NAME(eNOS 及 iNOS 的抑制剂)、氨基胍(iNOS 抑制剂)、E₂ + L-NAME 及 E₂ + 氨基胍后,发现 E₂ 可明显提高小鼠近端胫骨干骺端松质骨密度;L-NAME 或氨基胍单独作用时对骨密度无明显影响;而 E₂ + L-NAME 则可明显降低 E₂ 对骨组织的骨量增加反应;相对应的是,E₂ + AG 则不能明显抑制 E₂ 对骨组织的骨量增加反应。该研究表明,E₂ 对骨组织的作用与 NO 密切相关,尤其是 eNOS 在介导由 E₂ 引起的骨量增加方面具有重要作用。Katharine 等^[25]亦发现,体外及体内实验均证实敲除 eNOS 基因的小鼠其 OB 生长速率及 ALP 活性明显下降,体外及体内实验均证实,eNOS 途径在 OB 的分化及功能实现中起重要作用。另有研究表明,去卵巢并敲除 eNOS 基因的小鼠对高剂量雌激素的反应及由雌激素引发的合成代谢效应均明显减弱;有趣的是,NO 供体硝酸甘油在摘除卵巢的大鼠中可起到与应用雌激素相类似的效果^[9]。以上实验则更进一步证实了雌激素通过 NO 途径起作用的假说。目前已知雌激素对 eNOS 的作用有 2 条途径:①基因机制——雌激素通过与核内雌激素受体(ERs)反应,从而与 eNOS 启动子上的雌激素反应元件结合,促进 eNOS mRNA

的表达^[26],利用 RT-PCR 技术已经证实雌激素可以上调 eNOS 的表达水平(约 2.2 倍于对照组)^[8,27];②非基因调节机制——该机制与雌激素引起的 eNOS 迅速激活有关。ER 可以生理性或功能性地与磷脂酰肌醇 3 激酶(lipid kinase phosphatidylinositol 3-OH kinase,PI3K)偶联,雌激素与 ER α 相互作用可以激活 PI3K 信号级联反应,从而引起丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 的磷酸化并激活之,并进一步使 eNOS 的 1177 号丝氨酸磷酸化,从而激活 eNOS^[28]。治疗骨质疏松的新一类药物,如选择性雌激素受体激动剂雷洛昔芬(raloxifene)也有类似的促 NO 释放的作用,但雷洛昔芬不具备上调 eNOS 的转录功能,所以在基因水平上无法起到促 NO 生成的作用。与雌激素类似的是雷洛昔芬具有促进 PI3K 与 ER 相互作用的功能^[29],通过雌激素受体介导途径,发挥其促 NO 生成的作用,这一作用可被雌激素受体拮抗剂 ICI,182 780 所阻滞^[30]。

小结与展望

NO 在骨形成及骨吸收过程中作为调节因子已经得到确证,它在骨质疏松症的治疗方面亦受到了广泛关注。带有 NO 成分的非甾体类抗炎药(NO-NSAID),如:NO-苯氟布洛芬作为一种带有 NO 释放剂的新药在体内及体外均已证实对抑制骨吸收具有显著作用^[31]。这些研究的发现给包括骨质疏松症在内的骨代谢疾病的治疗带来了新的前景。但由于 NO 对 OC 及 OB 的双向性作用以及体内各种细胞因子及各种骨细胞间相互作用的复杂性,目前关于 NO 对于骨代谢的作用机制还不十分明确,有待于今后更进一步的研究与探索。

参考文献

- Farrell AJ, Adrian J, Blade DR, et al. Nitric Oxide. Ann Rheum Dis, 1996, 55: 7-20.
- Thomas PK, Patricia CO, Niray P, et al. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 3569-3573.
- Benjamin N, Driscoll F, Dougall H, et al. Stomach NO Synthesis. Nature, 1994, 368: 502.
- Wimalawansa SJ, Chapa MT, Yallampalli C. Prevention of corticosteroid induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. Bone, 1997, 21: 275-280.
- Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem, 2001, 276: 17625-17628.
- Venema RC, Nishida K, Alexander RW, et al. Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. Biochim Biophys Acta, 1994, 1218: 413-420.
- Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. J Bone Miner Res, 1997, 12: 1108-1115.
- Rob J, Van't Hof, Stuart H. Nitric oxide and bone. Immunology, 2001, 103: 255-261.
- Wimalawansa SJ, Marco GD, Gangula P. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. Bone, 1996, 18: 301-304.
- Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, et al. L-arginine and L-lysine stimulation on cultured human osteoblasts. Biomed Pharmacother, 2002, 56:

- 492-497.
- 11 Van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:7993-7998.
- 12 Iain M, Mone Z, Towhidnl A, et al. Osteoclastic inhibition; an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 2936-2940.
- 13 Ralston SH. Nitric oxide and bone; what a gas. *Brit J Rheum*, 1993, 36: 831-830.
- 14 Percival MD, Onellet M, Campagnolo C, et al. Inhibitor of cathepsin K by NO donor; evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. *Biochemistry*, 1999, 38:13574-13583.
- 15 Jose A, Lee B, Mego, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblasts maturation and activity. *Am J Pathol*, 2001, 158:247-257.
- 16 Mika HK, Francis JH, Lee DK, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology*, 1995, 136:5445-5453.
- 17 Mizuho N, Jun K, Takeo M, et al. Effects of exercise practice on the maintenance of radius bone mineral density in postmenopausal women. *J Physiol Anthrol Appl Hum Sci*, 2002, 21:229-234.
- 18 Rubin C, Turner AS, Bain S, et al. Anabolism, low mechanical signals strengthen long bones. *Nature*, 2001, 412:603-604.
- 19 Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress; the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci*, 1998, 3:346-355.
- 20 McAllister TN, Du T, Franges JA, et al. Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 2000, 270:643-648.
- 21 Zaman G, Pitsillides AA, Rawlinson SC. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:1123-1131.
- 22 Boo YC, Hwang J, Sykes M, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283:1819-1828.
- 23 Rubin J, Murphy TC, Zhu L, et al. Mechanical strain differentially regulates eNOS and RANKL expression via ERK1/2 MAP kinase. *J Biol Chem*, 2003, 25:24.
- 24 Samuels A, Perry MJ, Gibson RL, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. *Bone*, 2001, 29:24-29.
- 25 Katharine E, Armour, Kenneth J, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 2001, 142:760-766.
- 26 Hambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev*, 2002, 23:665-686.
- 27 Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1998, 139:799-802.
- 28 Simoncini T, Fornari L, Mannella P, et al. Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids*, 2002, 67:935-939.
- 29 Simoncini T, Genazzani. Raloxifene actually stimulates nitric oxide release from human endothelial cells via an activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85:2966-2969.
- 30 Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation*, 2002, 105:1368-1373.
- 31 Burgaud JL, Riffaud JP, Del Soldato P. Nitric-oxide releasing molecules; a new class of drugs with several major indications. *Curr Pharm Des*, 2002, 8:201-213.

(收稿日期:2003-06-14)

(本文编辑:易浩)

· 短篇论著 ·

早期康复训练对臀肌挛缩症患者术后疗效的影响

石恩东 王炳臣 黄抗美 张琰 王军强

臀肌挛缩症是因臀部肌肉及筋膜纤维性挛缩而导致髋关节外展、外旋畸形及屈曲功能障碍,患者常表现蹲坐时姿势异常及步态异常,手术松解或切除纤维挛缩组织是有效的治疗方法之一^[1,2]。我们对行臀肌挛缩松解术的患者进行系统的术后早期康复训练,可明显提高手术疗效。现报道如下。

一、资料与方法

选取我科 1999 年 4 月~2002 年 7 月间收治的臀肌挛缩症患者共 154 例,均为双侧发病。手术采用股骨大转子上斜弧形切口,切断并松解挛缩增厚的臀肌组织,术中进行矫正直至髋关节屈曲 > 120°,双髋关节内收 > 30°,手术结束后放置引流

管。术后将患者随机分为康复组及对照组。康复组 110 例,其中男 59 例,女 51 例;年龄 5~22 岁(平均 13.4 岁);对照组 44 例,其中男 28 例,女 16 例;年龄 6 岁~24 岁(平均 13.7 岁)。

康复组患者于术后早期给予康复训练。具体包括以下内容:①体位改变训练——术后当天患者即平卧并膝固定,术后第 2 天于床上保持屈髋 60°~90°,屈膝 60°体位,每天 2 h,共持续 8 周。②床上训练——从术后第 3 天开始,患者先在医护人员或亲属帮助下进行双髋关节内旋训练、屈髋抱膝训练及床上交腿屈髋训练,每个动作每天各做 60 次,分 2 次完成,共持续 8 周。③床下训练——从术后第 4 天开始,患者在拔除切口引流管后下床行并膝下蹲训练、坐位交腿训练及弓步压腿训练,每个动作每天各做 60 次,分 2 次完成,共持续 8 周。④步态训练——从术后第 5 天开始行平稳直行训练(即走“猫”步)、登

作者单位:250031 济南,山东省交通医院骨科(石恩东、王炳臣、黄抗美、张琰);北京积水潭医院创伤骨科(王军强)