

· 综述 ·

细胞衰老在激素性骨质疏松症中的作用

孙朔, 李东海, 康鹏德*

(四川大学华西医院关节外科, 四川成都 610000)

摘要: 糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 被广泛应用于内科疾病的治疗, 但其副作用, 尤其是激素诱导性骨质疏松症 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 仍是一个严重的临床问题。目前, GIOP 的实际机制仍不清楚, 但最新研究表明其与应激等因素导致的细胞衰老密切相关, 也就是说细胞衰老可能是 GIOP 的一种形成机制。激素通过诱导骨组织细胞衰老, 衰老细胞旁分泌衰老相关因子 (senescence-associated secreted phenotype, SASP), 产生细胞衰老的级联放大反应, 最终形成 GIOP。本文就细胞衰老与 GIOP 的关系、相关机制以及靶向阻断措施等方面进行综述。

关键词: 糖皮质激素, 细胞衰老, 激素诱导性骨质疏松症

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2023) 03-0247-04

Role of cell senescence in glucocorticoid-induced osteoporosis // SUN Shuo, LI Dong-hai, KANG Peng-de. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610000, China

Abstract: Glucocorticoid (GC) has been widely used in the treatment of internal diseases. However, glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP), one of GC adverse effects, is still a serious clinical problem. Currently, the mechanism of GIOP remains unclear, but recent studies show that it might be closely related to cell senescence caused by stress and other factors, in other word, cell senescence may be involving pathogenesis of GIOP. The glucocorticoid induces the senescence of bone tissue cells, and then the senescent cells secrete senescence-associated secreted phenotype (SASP) by paracrine to produce the cascade amplification reaction of cell senescence and finally form GIOP. This article reviews the relationship between cell senescence and GIOP, related mechanisms and targeted blocking measures.

Key words: glucocorticoid, cell senescence, glucocorticoid-induced osteoporosis

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 因具有强大的抗炎以及免疫抑制效果, 被广泛应用于临床疾病的治疗。内源性糖皮质激素在骨稳态的维持、成骨破骨微环境的调节中同样起关键作用^[1]。长期、高剂量应用外源性糖皮质激素会引起多种不良反应, 如激素诱导性骨质疏松症 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 等^[2]。GIOP 作为继发性骨质疏松症的重要医源性原因已受到广泛关注, 但具体发病机制仍不清楚。

细胞衰老是指正常细胞在各种衰老诱导因子应激因素诱导下, 通过基因序列破坏或改变, 染色体及端粒异常, 代谢功能改变, 抗凋亡分子途径活化及强化等, 出现细胞周期不可逆的阻滞以及细胞结构功能的改变^[3, 4]。衰老细胞会主要以旁分泌途径向微环境中正常细胞分泌释放衰老细胞相关表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP), 包括细胞因

子、趋化因子、生长因子、蛋白酶等^[5]。

现有研究表明, 糖皮质激素会诱导骨微环境中成骨细胞、骨细胞等多种细胞衰老, 衰老细胞向骨微环境分泌衰老细胞相关表型, 使更多正常细胞向衰老细胞转化^[6]。骨微环境中衰老细胞蓄积, 成骨破骨代谢紊乱, 骨吸收与骨重塑失衡, 骨密度、骨强度下降, 诱发骨质疏松症。因此, 多种细胞衰老过程在激素诱导性骨质疏松症的发生发展中起重要作用。

1 衰老细胞的定义

“细胞衰老”最早是由细胞生物学家 Hayflick 和 Moorhead^[7]首次提出的, 他们发现人成纤维细胞拥有有限的增殖分裂能力, 随后进入一种不可逆的生长停滞状态。几十年来关于细胞衰老的定义及其现象的描述仍存在争议, 但仍可以通过衰老细胞的特点与共

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2023.03.11

作者简介: 孙朔, 博士研究生, 研究方向: 骨坏死机制探究、骨修复等, (电话)15924469737, (电子信箱)15924469737@163.com

* 通信作者: 康鹏德, (电子信箱)kangpengde69@126.com

性给出定义。目前认为, 细胞衰老是一种应激诱导的、特殊的、持续的细胞周期停滞^[8]。区别于正常细胞, 衰老细胞的细胞周期停滞被认为是不可逆的, 也就是说, 正常细胞一旦进入衰老状态, 尽管给予有丝分裂刺激与适宜的生长条件, 衰老细胞仍将处于增殖停滞状态。衰老细胞受到外界刺激的影响, 激活 DNA 损伤反应 (DDR), p53/p21 分子通路被激活, 进一步导致细胞表达 p16INK4a 激活肿瘤抑制因子 pRB, p53/p21 与 p16INK4a/pRB 途径同时作用, 促使细胞周期停滞、细胞衰老^[8-10]。因此, 细胞衰老是应激、DDR 诱发多种衰老相关信号通路共同作用的结果。

衰老细胞通过上述信号通路, 使细胞结构功能发生改变, 并向微环境中释放衰老细胞相关表型 (SASP)。目前在多种衰老细胞中发现 SASP, 而数量也从最初发现的数十种发展到数百种^[10, 11]。值得注意的是, SASP 并不是单一的衰老细胞表型, 而是依赖于细胞类型、衰老诱导因子的复杂因子网络^[5]。SASP 的产生、分泌受到 NF- κ B、p38MAPK、mTOR 等因子及其信号通路调控^[12-14]。随着衰老细胞通过自分泌、旁分泌和内分泌的方式释放 SASP, 微环境中衰老信号被逐步放大, 细胞外囊泡在衰老细胞放大衰老信号的过程中起重要作用^[15]。

由于衰老是大多数细胞都可以进入的一种状态, 所以目前仍缺乏一个各类衰老细胞均适用的特异性检测指标, 现在所有对衰老细胞的检测手段均为对某种细胞适用的相对特异性, 目前对衰老细胞的检测仍有赖于多种衰老相关标记物的组合。在衰老细胞检测中使用最广泛的仍然是 β -半乳糖苷酶, 直到目前, β -半乳糖苷酶仍作为衰老细胞的染色试剂而被广泛应用, 但仍有部分衰老细胞中无法检测到 β -半乳糖苷酶, β -半乳糖苷酶也可以在正常细胞中被检测出来^[16, 17]。p21 与 p16 作为 p53/p21 与 p16INK4a/pRB 途径的组成部分, 也逐渐用于体外衰老细胞的培养鉴定^[18, 19]。

总的来说, 细胞衰老通过复杂的衰老信号网络释放 SASP, 在局部微环境乃至体液中发送衰老信号, SASP 作为其他正常细胞的衰老诱导因子, 诱发更多细胞的衰老, 最终引起衰老相关疾病的发生。因此, 通过对 SASP 调控因子进行靶向药物控制, 抑制衰老细胞通过细胞外囊泡向微环境释放 SASP, 阻断衰老信号放大机制可能是未来衰老相关疾病的治疗趋势。

2 糖皮质激素与骨组织细胞衰老之间的关系

在骨微环境中, 成骨细胞的结构或功能的破坏会导致骨吸收与骨重塑之间失衡, 而在地塞米松处理的成骨细胞中, 衰老相关标志物 p53、p21 的 mRNA 以及相应蛋白水平显著升高, 而成骨细胞活力以及碱性磷酸酶水平显著降低, 这提示糖皮质激素诱导骨组织中成骨细胞衰老来引发成骨细胞功能障碍, 从而对骨吸收重塑失衡有促进作用^[20]。糖皮质激素同样参与到软骨细胞的衰老过程中, 有研究表明, 糖皮质激素可通过 mTOR 依赖途径抑制软骨细胞自噬从而诱导衰老, 这同时说明自噬可能是防止细胞衰老的保护过程。

除骨组织细胞外, 骨微环境的免疫细胞也参与到细胞的衰老过程中。在衰老的巨噬细胞中, 一种决定糖皮质激素反应程度的酶 11 β -羟类固醇脱氢酶 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD) 的表达活性受损, 这同时伴随着一种糖皮质激素受体靶基因, 即糖皮质激素诱导亮氨酸拉链 (glucocorticoid-induced leucine zipper, GILZ) 的下调, 而对 GILZ 的活化抑制作用也促进了巨噬细胞的衰老过程^[21]。因此, 糖皮质激素可诱导多种细胞衰老, 而衰老的免疫细胞也同时改变了糖皮质激素的作用过程, 对细胞衰老状态的诱导与维持起重要作用。

Sirtuins (SIRT) 是 NAD⁺依赖性组蛋白去乙酰化酶, 在细胞衰老过程中起重要作用。研究显示, 用泼尼松对成年小鼠细胞进行处理后, 小鼠溶酶体 β -半乳糖苷酶细胞和 p16INK4a⁺细胞数量显著增加, 二者均为衰老细胞的典型标志, 而糖皮质激素对细胞衰老过程的诱导作用可能是通过 DPP4/GLP-1 轴和 AMPK/SIRT1/FOXO3a 通路实现的, 其中 SIRT1 基因对细胞衰老起着重要的调控作用^[6, 20, 22]。糖皮质激素增加正常细胞的氧化应激, 通过对细胞的代谢机制进行改变, 加重压力期的端粒损耗, 诱导细胞衰老^[23], 这种通过端粒长度缩短与代谢失衡假说来解释的细胞衰老仍然与 p21 及其上下游通路相关^[24]。实验表明, 对糖皮质激素受体 (GR) 用拮抗剂或 siRNA 进行阻断后与对照组相比, 碱性磷酸酶水平增加, 成骨能力增强, 成脂能力减弱, 端粒长度更长, 因此说明, 阻断 GR 有利于延缓骨髓间充质干细胞的衰老^[25, 26]。综上所述, 骨组织细胞受到糖皮质激素影响后, 呈现出衰老细胞的典型变化, 这一衰老过程与多种信号转导通路抑制自噬、增加氧化应激、加重端粒损耗、免疫细胞调节的机制相关, 而糖皮质激素作用的拮抗因素可延缓这一衰老过程。

3 糖皮质激素诱发细胞衰老与骨质疏松症的关系

糖皮质激素自问世以来拥有无可比拟的抗炎与免疫抑制作用，但 GIOP 等不良反应严重限制着糖皮质激素的临床应用，使患者骨质疏松继发骨折的风险大大增加^[2]。糖皮质激素对骨细胞调节功能、成骨细胞矿化以及其他骨组织正常活动的影响是时间依赖性以及剂量依赖性的^[27]。在低剂量的生理浓度中，内源性糖皮质激素受到 11 β -HSD 的活化，与包括骨组织在内的靶组织中 GR 结合，有利于间充质干细胞向成骨细胞分化，利于骨重塑的过程^[28]。但为消退炎症或进行免疫抑制治疗时，高于生理浓度的外源性糖皮质激素往往被使用，有证据表明，应用糖皮质激素的患者骨折风险随着激素使用时间和剂量的增加而增加^[29]。可以猜想，激素诱导性骨质疏松的剂量与时间依赖性是否与糖皮质激素诱导的细胞衰老信号放大过程有关？即随着糖皮质激素诱导衰老细胞向周围正常骨微环境释放 SASP，随着时间变化，正常细胞在糖皮质激素以及 SASP 的作用下被诱导衰老，从而形成衰老信号的放大过程，这仍需更多的体内体外实验证明。

骨组织中各种细胞如血管内皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等的衰老过程与骨质疏松症的发生发展关系密切。破骨细胞通过分泌 ANG，作用于 ANG/PLXNB2-rRNA 转录信号，抑制长骨生长中的血管衰老过程。GC 抑制破骨细胞形成来抑制 ANG 的产生，从而导致骨组织中的血管细胞衰老、血管再生障碍^[30]。在动物实验中，随着小鼠和大鼠的衰老，巨噬细胞与中性粒细胞等多种免疫细胞在骨髓中分泌大量的 grancalcin (GCA)，GCA 与 plexin-b2 受体结合，并抑制其下游通路，从而抑制骨髓间充质干细胞的成骨作用，促进其向成脂方向分化，对 GCA 基因敲除后，GCA-KO 小鼠骨量显著增加，而 GCA-KO 后 plexin-b2 缺失的小鼠骨量降低，抑制了 GCA-KO 的成骨作用^[31]。对 plexin-b2 相关信号的靶向作用，可能未来是对 GIOP 的治疗靶点之一。

4 针对阻断细胞衰老途径的骨质疏松症的治疗策略

Kirkland 等^[32-34]研发的 senolytic 鸡尾酒疗法由达沙替尼加槲皮素 (D+Q) 构成，能够选择性消除衰老细胞、减少细胞衰老数量、抑制细胞衰老过程、减少脂肪组织中促炎因子的分泌，是抑制细胞衰老的经

典药物。Farr 等^[35]使用 3 种方法：激活细胞内衰老自杀基因“INK-ATTAC”；使用 senolytic 鸡尾酒疗法 (D+Q)；JAK 抑制剂 (JAKi)。3 种方法治疗后的小鼠与对照组相比拥有更高的骨量和骨强度以及更好的骨微结构。Li 等^[31]发现衰老的小鼠体内中 GCA 的浓度显著增加，而这种衰老机体内上升的 GCA 有对成骨的抑制作用，而后其对 GCA 中和抗体 (GCA-Nab) 进行研发，发现 GCA-Nab 可与 GCA 靶向结合，阻断 GCA 抑制成骨、促进成脂的作用，提升骨小梁质量与成骨速度。研究表明，Dex 诱导的成骨细胞衰老可能是其功能障碍的一大原因，而巯基化钠 (NaHS) 通过靶向成骨 MC3T3-E1 细胞中的 miR-22/sirt1 通路，可以防止 Dex 诱导的成骨细胞衰老和损伤^[20]。

5 展望

GIOP 仍然是世界范围内难以解决的问题，其具体发生发展机制也未探索清楚，这给靶向预防、治疗 GIOP 带来了困难。而近些年来，糖皮质激素促进细胞过早衰老的现象已有相关通路解释，骨组织细胞衰老促进骨相关疾病的发生机制也成为当下研究焦点，细胞衰老相关通路已成为靶向预防或缓解 GIOP 的基本机制之一。

以 senolytic 为首的典型抗细胞衰老药物已在体内体外实验中取得积极成果，但一方面，其对细胞衰老的抑制作用机制仍需探索，对糖皮质激素导致的骨质疏松症的作用仍需进一步证实；另一方面，部分细胞衰老过程的有益作用为如衰老自杀基因“INK-ATTAC”等无差别清除衰老细胞的治疗方法带来了挑战。因此，靶向清除衰老骨髓间充质干细胞、衰老成骨细胞，清除相关 SASP 以及靶向抗骨组织细胞衰老药物有助于在副作用最小的基础上延缓细胞衰老的发生与进展。

在未来的发展中，抑制衰老细胞通路、阻断衰老放大信号、清除累积衰老细胞可能是 GIOP 的新型治疗策略。对骨组织细胞以及免疫细胞中衰老信号通路的阻断可能促进成骨细胞、破骨细胞以及巨噬细胞在骨吸收、骨重塑方面的积极作用，对骨稳态的维持、炎症因子的清除起积极作用。细胞衰老的通路研究为 GIOP 的治疗奠定了理论基础，以抑制细胞衰老为核心的治疗策略拥有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Kalak R, Zhou H, Street J, et al. Endogenous glucocorticoid signaling in osteoblasts is necessary to maintain normal bone structure in mice [J]. *Bone*, 2009, 45 (1) : 61-67.
- [2] Buckley L, Humphrey MB. Glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. *N Engl J Med*, 2018, 379 (26) : 2547-2556.
- [3] van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing [J]. *Nature*, 2014, 509 (7501) : 439-446.
- [4] Khosla S, Farr JN, Tchkonja T, et al. The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16 (5) : 263-275.
- [5] Basisty N, Kale A, Jeon OH, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18 (1) : e3000599.
- [6] Wang T, Yang L, Liang Z, et al. Targeting cellular senescence prevents glucocorticoid-induced bone loss through modulation of the DPP4-GLP-1 axis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6 (1) : 143.
- [7] Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains [J]. *Exp Cell Res*, 1961, 25: 585-621.
- [8] He S, Sharpless NE. Senescence in health and disease [J]. *Cell*, 2017, 169 (6) : 1000-1011.
- [9] Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer [J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75 : 685-705.
- [10] Coppé JP, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor [J]. *PLoS Biol*, 2008, 6 (12) : 2853-2868.
- [11] Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15 (8) : 978-990.
- [12] Herranz N, Gallage S, Mellone M, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17 (9) : 1205-1217.
- [13] Laberge RM, Sun Y, Orjalo AV, et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17 (8) : 1049-1061.
- [14] Farr JN, Khosla S. Cellular senescence in bone [J]. *Bone*, 2019, 121 : 121-133.
- [15] Yin Y, Chen H, Wang Y, et al. Roles of extracellular vesicles in the aging microenvironment and age-related diseases [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10 (12) : e12154.
- [16] Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (20) : 9363-9367.
- [17] 于斐, 雷鸣, 曾晖, 等. 特殊染色技术在骨关节炎关节软骨形态学研究中的比较 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2015, (19) : 1801-1807.
- [18] Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, et al. The meaning of p16 (ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10 (15) : 2497-2503.
- [19] 李兰, 梁明玮, 陆燕蓉, 等. miR-140 对早期骨关节炎软骨细胞衰老的调控作用及机制 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (3) : 252-259.
- [20] Li P, Mao WW, Zhang S, et al. Sodium hydrosulfide alleviates dexamethasone-induced cell senescence and dysfunction through targeting the miR-22/sirt1 pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21 (3) : 238.
- [21] Valbuena Perez JV, Linnenberger R, Dembek A, et al. Altered glucocorticoid metabolism represents a feature of macrophage-aging [J]. *Aging Cell*, 2020, 19 (6) : e13156.
- [22] 刘弼, 雷鸣, 肖德明. 抗衰老基因 SIRT1 对骨关节炎的防治影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2012, 20 (15) : 1402-1404.
- [23] Casagrande S, Stier A, Monaghan P, et al. Increased glucocorticoid concentrations in early life cause mitochondrial inefficiency and short telomeres [J]. *J Exp Biol*, 2020, 223 (Pt 15) : jeb222513.
- [24] Martin LF, Richardson LS, da Silva MG, et al. Dexamethasone induces primary amnion epithelial cell senescence through telomere-P21 associated pathway [J]. *Biol Reprod*, 2019, 100 (6) : 1605-1616.
- [25] Wei N, Yu Y, Joshi V, et al. Glucocorticoid receptor antagonist and siRNA prevent senescence of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro [J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 354 (2) : 461-470.
- [26] Wei N, Yu Y, Schmidt T, et al. Effects of glucocorticoid receptor antagonist, RU486, on the proliferative and differentiation capabilities of bone marrow mesenchymal stromal cells in ovariectomized rats [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31 (5) : 760-767.
- [27] Seibel MJ, Cooper MS, Zhou H. Glucocorticoid-induced osteoporosis: mechanisms, management, and future perspectives [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2013, 1 (1) : 59-70.
- [28] Stewart PM, Krozowski ZS. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase [J]. *Vitam Horm*, 1999, 57 : 249-324.
- [29] Chotiarnwong P, McCloskey EV. Pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis and options for treatment [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16 (8) : 437-447.
- [30] Liu X, Chai Y, Liu G, et al. Osteoclasts protect bone blood vessels against senescence through the angiogenin/plexin-B2 axis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1) : 1832.
- [31] Li CJ, Xiao Y, Sun YC, et al. Senescent immune cells release calcitonin to promote skeletal aging [J]. *Cell Metab*, 2021, 33 (10) : 1957-1973.
- [32] Kirkland JL, Tchkonja T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents [J]. *Exp Gerontol*, 2015, 68 : 19-25.
- [33] Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs [J]. *Aging Cell*, 2015, 14 (4) : 644-658.
- [34] Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (8) : 1246-1256.
- [35] Farr JN, Xu M, Weivoda MM, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice [J]. *Nat Med*, 2017, 23 (9) : 1072-1079.

(收稿:2022-03-24 修回:2022-09-08)
(同行评议专家:袁普卫 钱 列)
(本文编辑:宁 桦)