

用于骨病治疗的酶抑制剂药物研发进展 *

张丽萍^{1,2} 齐 红³ 张瑀珊⁴

(1 吉林工商学院基础部 吉林 长春 130062 2 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室 吉林 长春 130012 ;

3 吉林省肿瘤防治研究所 吉林 长春 130012 4 白求恩医科大学制药厂 吉林 长春 130012)

摘要 近年来研究发现,多种骨病都伴随钙化异常发生,该钙化异常与组织非特异性碱性磷酸酶等生物酶的功能异常密切相关,破解这些酶的致病机理,研发能减缓异常钙化进程的相关酶抑制剂作为传统抗炎药物的重要补充,已成为该领域研究人员的关注热点,本文将针对过度钙化型骨病,对于其形成机理及药物研发的相关进展进行介绍。

关键词 异常钙化骨病;羟磷灰石;基质囊胞;焦磷酸盐;碱性磷酸酶

中图分类号 R593 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2012)25-4985-03

Research Progress on the Enzymatic Inhibitors for the Bone Related Diseases*

ZHANG Li-ping^{1,2}, QI Hong³, ZHANG Yu-shan⁴

(1 Department of Foundation, Jilin Business and Technology College, Changchun 130062, China;

2 Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, the Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130012, China;

3 Jilin tumor combat research institute, Changchun 130012, China;

4 Pharmaceutical Factory of Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130012, China)

ABSTRACT: It has been found from the recent studies that lots of bone related diseases are associated with pathological mineralization, which correlates closely to the abnormality of some key enzymes like tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP). Recently, deciphering these key enzymes is an objective of prime importance with the ultimate goal of synthesizing inhibitors of them in order to provide efficient alternate therapeutic strategies that will slow down the pathologic mineralization and complement the arsenal of anti-inflammatory drugs. In this review we reviewed the mechanism of the pathological mineralization and the progress on the development of the enzymatic inhibitors for the disease.

Key words: Pathological mineralization; Hydroxyapatite; Matrix vesicle; Pyrophosphate; Alkaline phosphatase

Chinese Library Classification: R593 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4985-03

强直性脊柱炎(AS)、骨关节炎(OA)、婴儿广泛性动脉钙化(GACI)、血管钙化、软骨钙质沉着(CC)和假痛风等骨病均与钙化异常密切相关。由于绝大多数过渡钙化型骨病都伴随炎症反应,因此,一直以来在骨病的治疗中常采用抗炎药物以减缓患者的疼痛。非甾体类抗炎药(NSAIDs)和肾上腺皮质激素常用于治疗控制焦磷酸钙型骨病。尽管NSAIDs对于骨病治疗效果不错,但它会对胃肠、心血管及肾脏等系统产生副作用,因此,作为对现有抗炎型药物的补充,新药的研发对于骨及关节疾病的治疗是十分有益和必要的。近年来研究发现,该钙化异常与一些重要酶的功能异常有关,破解这些酶的致病机理并研发能减缓异常钙化进程的相关酶抑制剂,并作为传统抗炎药物的重要补充,已成为该领域研究人员的关注热点。

1 伴随骨病发生的异常钙化

目前,研究人员对于钙化类型和骨病本质两者之间的关系还存在较大分歧。本文中,我们将按照钙结晶类型对骨病类型

加以区别,一类是羟磷灰石(HA)钙结晶异常沉积型,如强直性脊柱炎(AS)、骨关节炎(OA)、婴儿广泛性动脉钙化(GACI)和血管钙化等;另一类是二水焦磷酸钙结晶(CPPD)异常沉积型,如软骨钙质沉着(CC)和假痛风等。前者常表现为在软组织如筋腱及韧带(腱鞘炎和强直性脊柱炎)、软骨(骨关节炎)和动脉血管(慢性肾病导致的血管钙化)等处基质囊胞中发生HA钙结晶异常沉积^[1-3]。后者(CPPD异常沉积)常发生在关节组织中(如软骨钙质沉着^[4]、急/慢性焦磷酸钙关节炎,常称假痛风^[5])。婴儿广泛性动脉钙化(GACI)是一种由染色体隐性紊乱导致的罕见且严重的疾病,典型症状为全身大动脉钙化狭窄。由于该病案例较少,其钙化类型尚未明确,研究认为极有可能是HA钙结晶异常沉积所致。HA沉积型和CPPD沉积型这两种骨病的区别不仅在于钙结晶的化学性质不同,还体现在诱导钙沉积的两种作用相反的生物酶上。事实上,除了慢性焦磷酸盐关节炎和焦磷酸钙型骨关节炎的形成可能与两种钙结晶沉积都有关联之外,其它大多都只与其中一种钙化异常类型有关。此外,

* 基金项目:吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目(吉教科合2010225)

作者简介:张丽萍(1969-),女,副教授,博士,研究方向:生物超分子谱学。E-mail:jlgsxyzlp@126.com

(收稿日期:2012-03-23 接受日期:2012-04-18)

研究表明 HA 的沉积和 CPPD 的沉积是两个对抗的过程,因此,对于不同类型的骨病必须采用特异性的治疗药物。

2 药物治疗骨病的现状

由于绝大多数过渡钙化型骨病都伴随炎症反应,因此,一直以来在骨病的治疗中常采用抗炎药物以减缓患者的疼痛^[6-10]。非甾体类抗炎药(NSAIDs)和肾上腺皮质激素常用于治疗控制焦磷酸钙型骨病。NSAIDs 可有效缓解多种钙化或非钙化型骨及关节疾病,该药通过抑制环氧化酶(COX 1 和 2)进而抑制前列腺素的产生,非选择性的 NSAIDs(例如布洛芬和萘普生)同时抑制这两种酶,而选择性的 NSAIDs(例如塞来昔布 Celecoxib)仅与 COX2 作用,该作用有助于降低肌骨系统紊乱的炎症。对于焦磷酸钙型骨病的慢性炎症,还常使用秋水仙碱。对一些难控制的骨病,选用抗炎剂量的氨甲叶酸效果不错。

尽管 NSAIDs 对于骨病治疗效果不错,但它会对胃肠、心血管及肾脏等系统产生副作用^[8],因此,作为对现有抗炎型药物的补充,新药的研发对于骨及关节疾病的治疗是十分有益和必要的。研究发现,一些肿瘤坏死因子抑制剂(anti-TNF),例如,英夫利昔单抗(infliximab)、阿达木单抗(adalimumab)和 etanercept 等,可显著提高强直性脊柱炎患者的生活质量。一些二膦酸酯如阿仑唑奈(alendronate)和唑来磷酸(zoledronate)能够缓解帕哲氏病患者的骨痛症状。研究表明,这些二膦酸酯可以和 HA 结合从而延缓了钙化的进程,可用于治疗骨关节炎。最近,有研究评估了含氮的二膦酸酯 risedronate NCBP(阿仑唑奈 alendronate、唑来磷酸 zoledronate、伊班磷酸 ibandronate、利塞膦酸 risedronate)对亚临床心血管病的治疗效果,发现 NCBP 和他汀类药物有一些共同的药理学作用。NCBP 与老年人心血管钙化的降低有关,但也与年轻人心血管钙化的增加有关。然而,由于异常钙化型骨病涉及多种过程,其致病机理非常复杂,所以很难找到能直接作用于钙化过程的特异性药物治疗靶标。令人惊喜的是,近期研究发现多种生物酶对于异常钙化的形成与发展起着关键作用,它们将是很有前途的治疗过度钙化骨病的药物靶标。

3 在焦磷酸盐(Pi)动态平衡过程中起相反调节作用的两类生物酶

PPi 可抑制 HA 的形成,近期研究表明细胞外 PPi 可在生理和病理上调节钙晶体沉积^[11,12],其动态平衡主要由三种酶调节:分别是能水解 PPi 从而降低其浓度的组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)^[13]、增大细胞外 PPi 浓度的进行性关节僵硬酶(ANK)^[14,15]和核苷焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1(NPPI^[3])。

确定生理性或病态钙化的关键因素之一是细胞外 PPi 的浓度。较低的 PPi 浓度可能促进 HA 沉积,而较高的 PPi 浓度则有利于 CPPD 的形成。HA 型和 CPPD 型异常钙沉积的发生情况取决于无机磷酸盐与焦磷酸盐的比率(Pi/PPi)^[16,17],比值过大(Pi/PPi>70)有利于 HA 沉积,比值过小(Pi/PPi<25)则有利于 CPPD 沉积。当比值介于这两者之间则不会出现 HA 和 CPPD 沉积^[36]。当然,也可能出现两种沉淀共存的现象,尤其是在 CPPD 型骨关节炎患者的关节软骨组织中^[18]。然而,它们的沉淀发生还是有先后顺序的,并可反映出这些酶的活性在时间空间上

的显著差别。反过来,PPi 又依赖于两类敌对酶的相对活性。显然,TNAP 酶的抑制剂可用于防止 HA 异常沉积型骨病,如 AS、OA、GACI 及血管钙化等,而 ANK 酶和 NPPI 酶的抑制剂则可用于减缓 CC 和假痛风等 CPPD 沉积型骨病的进程。由此可见,对 HA 型和 CPPD 型异常钙化相关疾病加以区分是非常必要的,因为它们是由截然不同的功能相反的酶的功能紊乱造成的。

4 用于骨病治疗的酶抑制剂药物研发

4.1 二水焦磷酸钙结晶(CPPD)异常沉积型骨病

CPPD 异常沉积型骨病常发生在关节组织中,如软骨钙质沉着(CC)、急/慢性焦磷酸钙关节炎等。为了阻止 CPPD 的沉积,需要提及两种重要的酶,一个是负责焦磷酸盐传输的进行性关节僵硬酶(ANK),另一个是负责水解核苷三磷酸生成细胞外焦磷酸盐(ePPi)的核苷焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1(NPPI)。研究发现,一些患有家族性软骨钙质沉着疾病的患者都伴随有与 ANK 相关的基因突变^[19],该突变增加了 ANK 的活性,因此,ANK 酶的抑制剂对 CC 具有潜在的治疗作用。另有研究发现 Enpp1 基因突变的老鼠存在钙化异常情况,这证明 CPPD 沉积型骨病还与 NPPI 酶有关。到目前为止,对于人软骨钙质沉着病,还未发现其与 Enpp1 基因突变有关。可见,研发针对 ANK 酶和 NPPI 酶的抑制剂对于 CPPD 异常沉积型骨病的治疗将起到积极的作用。该酶抑制剂通过抑制 ANK 和 NPPI 的酶活性,减少焦磷酸盐的产生,起到减缓 CPPD 沉积的治疗作用。此外,这种特异性抑制剂还可以阻止 CPPD 在关节软骨处的进一步钙化沉积。当然,这种抑制剂也可与抗炎药物联合使用,两者互为补充,起到良好的镇痛治疗效果。

4.2 羟磷灰石(HA)异常沉积型骨病

羟磷灰石(HA)异常沉积型骨病,如强直性脊柱炎(AS)、骨关节炎(OA)、婴儿广泛性动脉钙化(GACI)和血管钙化等,常表现为在软组织、软骨和动脉血管等处基质囊胞中发生 HA 钙结晶异常沉积。

目前还没有治疗 OA 的药物处方。尽管该病的特点之一是伴随有碱性磷酸钙的沉积,然而这种沉积一般在疾病的晚期才出现,相比之下,炎症症状出现的要早很多。常采用扑热息痛、口服 NSAIDs 和阿片类(opioids)药物等抗炎药物以缓解患者的疼痛。然而,随着患者年龄的增长,这些药物的副作用也逐渐表现出来。手术治疗方面,膝关节和髋关节的疗效要好于手关节。与这些安慰剂相比,葡萄糖胺、软骨素及两者的联合使用不能减轻疼痛症,也不能改善关节腔狭窄的情况。因此,一些替代性疗法如抗细胞因子疗法、生长因子传递、干细胞疗法和滑润剂正在研发中^[20]。有研究表明,HA 型骨关节炎软骨基质囊胞中 TNAP 酶活性增加 30 倍,因此,TNAP 酶可作为治疗 HA 型的骨关节炎的一个潜在药物靶标^[21]。

NPPI 相关性基因突变导致 NPPI 活性降低,与 GACI 发生有关,TNAP 酶抑制剂可使焦磷酸盐浓度增加,可用于弥补由于 Enpp1 变异引起的焦磷酸盐浓度的降低。

用于治疗肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的生物制剂对 AS 具有显著的止痛、抗炎和减轻其他症状的功效^[22]。然而,X-射线鉴定结果表明,TNF- α 抑制剂可能不会减缓该病的进程,至少对于

那些在诊断患有 AS 后即采用抗肿瘤坏死因子治疗的患者情况如此。关于其替代药物的研发难度较大,原因是还没有找到该病的易感性相关基因。采用 TNAP 酶抑制剂有助于减缓 HA 沉积导致的钙化过程。

4.3 焦磷酸钙型骨关节炎

焦磷酸钙型骨关节炎是一种与 CPPD 异常沉积有关的骨关节炎,此外,可能也伴随羟磷灰石(HA)的沉积。由于 Pi/PPi 的比率是由作用相反的两类酶, TNAP 与 ANK / NPP1, 共同决定,所以 CPPD 和 BCP 钙晶体不会同时出现在同一位置,而是出现在有明显区别的两个位点,并可能先后出现^[23]。TNAP 酶抑制剂用于富含 HA 的组织或是以 HA 沉积为主的阶段,而 ANK / NPP1 酶抑制剂应用于富含 CPPD 的组织或以 CPPD 沉积为主的阶段。多种抑制剂如聚羧酸盐、聚磷酸盐、双膦酸盐、聚丙烯酸化物、柠檬酸、氨基酸、核苷以及带有羧酸盐的天然蛋白等均可限制 HA 生成。近年来发现的磷酸化三羧酸磷酸枸橼酸盐是一种针对 CPPD 和 HA 的高亲和性抑制剂^[24]。

小结

近年来针对骨异常钙化型疾病的基因研究使人们对于过度钙化相关的骨病如 AS, CC, GACI 和 OA 等有了更深入的认识。这些研究证实了一点,即生理性钙化是一个由具有钙化能力的细胞调节的过程,而病理性钙化是由那些在软组织内在病态条件下具有钙化能力的细胞引发。研究发现一些特殊的生物酶,如与 CC 病相关的 ANK / NPP1, 以及 OA 和软组织钙化(AS、GACI 和血管钙化)相关的 TNAP 等酶在这些疾病中起着关键作用,它们有望成为治疗骨异常钙化疾病的药物靶标。更确切的说,设计合成 ANK/ NPP1 酶抑制剂有助于减缓 CPPD 型异常钙化过程,而 TNAP 酶抑制剂则阻止伴随骨关节炎和血管钙化等病发生的 BCP 和 HA 异常钙化进程。

参考文献(References)

- [1] Sampson, H.W., Davis, R.W., Dufner, D.C. Spondyloarthropathy in progressive ankylosis mice: ultrastructural features of the intervertebral disk [J]. *Acta Anat. (Basel)*, 1991, 141: 36-41
- [2] Anderson, H.C. The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification [J]. *Curr. Opin. Orthopaed.*, 2007, 18: 428-433
- [3] Shao, J.S., Cai, J., Towler, D.A. Molecular mechanisms of vascular calcification Lessons learned from the aorta [J]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26: 1423-1430
- [4] Williams, C.J. Familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease and the ANKH gene [J]. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2003, 15: 326-331
- [5] Richette, P., Bardin, T., Doherty, M. An update on the epidemiology of calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease [J]. *Rheumatology*, 2009, 48: 711-715
- [6] Singer, F.R. Paget disease: when to treat and when not to treat [J]. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009, 5:483-489
- [7] Altman, R.D. Early management of osteoarthritis [J]. *Am. J. Manag. Care*, 2010, 16 :S41-S47
- [8] Amer, M., Bead, V.R., Bathon, J., et al. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in patients with cardiovascular disease: a cautionary tale [J]. *Cardiol. Rev.*, 2010, 18: 204-212
- [9] Toussiro, E. Late-onset ankylosing spondylitis and spondylarthritis: an update on clinical manifestations, differential diagnosis and pharmacological therapies [J]. *Drugs Aging*, 2010, 27: 523-531
- [10] Chollet-Janin, A., Finckh, A., et al. Methotrexate as an alternative therapy for chronic calcium pyrophosphate deposition disease: an exploratory analysis[J]. *Arthritis Rheum.*, 2007, 56:688-692
- [11] Hesse, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., et al. Tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99: 9445-9449
- [12] Harnay, D., Hesse, L. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1 and Ank [J]. *Am. J. Pathol.*, 2004, 164: 1199-1209
- [13] Gollub, E.E., Boesze-Battaglia, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization [J]. *Curr. Opin. Orthopaed.*, 2007, 18: 444-448
- [14] Wang, W., Xu, J., Du, B., Kirsch, T. Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization [J]. *Mol. Cell. Biol.*, 2005, 18: 181-186
- [15] Zaka, R., Williams, C.J. Role of the progressive ankylosis gene in cartilage mineralization [J]. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2006, 18: 181-186
- [16] Garimella, R., Bi, X., Anderson, H.C., Camacho, N.P. Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: an FTIR imaging study[J]. *Bone*, 2006, 38: 811-817
- [17] Thouveney, C., Bechhoff, G., Pikula, S., Buchet, R. Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17: 64-72
- [18] Mornet, E. Hypophosphatasia. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2008, 22: 113-127
- [19] Hughes, A.E., McGibbon, D., Woodward, E., et al. Localisation of a gene for chondrocalcinosis to chromosome 5p [J]. *Hum. Mol. Genet.*, 1995, 4: 1225-1228
- [20] Chevalier, X. Intraarticular treatment for osteoarthritis: New Perspectives [J]. *Curr. Drug Targets*, 2010, 11: 546-560
- [21] Li, L., Chang, L. Synthesis and evaluation of benzo [b]thiophen derivatives as inhibitors of alkaline phosphatases [J]. *Bioorg. Med. Biochem.*, 2009, 17: 7290-7300
- [22] Pradeep, D.J., Keat, A., Gaffney, K. Predicting outcome in ankylosing spondylitis [J]. *Rheumatology*, 2008, 47: 942-945
- [23] Pritzker, K.P.H. Counterpoint: hydroxyapatite crystal deposition is not intimately involved in the pathogenesis and progression of human osteoarthritis [J]. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2009, 11: 148-153
- [24] Sallis, J.D., S. Cheung, H.S. Inhibitors of articular calcium crystal formation[J]. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2003, 15: 321-325