

钙敏感受体拮抗剂溶钙素对小鼠骨密度和骨代谢的影响

董冰子¹ 孙晓方¹ 邓玉杰¹ 李鹏¹ 福本诚二² 李成乾¹

(1 青岛大学附属医院内分泌和代谢性疾病科, 山东 青岛 266003; 2 日本德岛大学藤井纪念医学中心)

[摘要] **目的** 探讨钙敏感受体(CaSR)拮抗剂溶钙素对骨密度和骨代谢的影响,为临床骨质疏松症的治疗提供新的思路。**方法** C57BL/6 雌性小鼠 36 只,随机分为对照组(A组)、高钙高维生素 D 饮食组(B组)、溶钙素 20 mg/kg 灌胃治疗组(C组)、溶钙素 50 mg/kg 灌胃治疗组(D组)、特立帕肽(PTH(1-34))20 μ g/kg 皮下注射组(E组),小鼠分别处理 12 周后,测定各组小鼠海绵骨、皮质骨、全骨骨密度及骨组织中成骨关键基因如骨钙素(Bglap2)、Runx 相关转录因子(Runx2)mRNA 的表达,并探讨溶钙素治疗对小鼠血、尿钙的影响。**结果** 干预 12 周后,B、C、D、E 组全骨骨密度与 A 组比较明显升高,差异均有显著性($F=39.82, P<0.05$);C、D 组全骨骨密度水平较 B 组明显升高,差异有显著性($P<0.05$);而 D 组全骨骨密度与 E 组比较,差异无显著意义($P>0.05$)。溶钙素可上调 Bglap2、Runx2 mRNA 的表达,改善骨转换,C、D、E 组 Bglap2、Runx2 mRNA 表达量均较 A 组显著上调,差异有显著性($F=27.96, 21.75, P<0.05$)。此外,与钙和维生素 D 补充和外源性 PTH 治疗干预组相比,溶钙素对血钙波动的影响较小,差异无显著性($P>0.05$)。溶钙素也可减少尿钙排泄,D 组尿钙水平较 B、E 组显著降低($F=2.68, P<0.05$)。**结论** 溶钙素可促进骨形成、增加骨密度,有可能成为骨质疏松症有效的治疗药物。

[关键词] 溶钙素;受体,钙敏感;骨生成;骨密度;甲状旁腺素;小鼠,近交 C57BL

[中图分类号] R336;R392.11 **[文献标志码]** A

EFFECTS OF CALCILYTIC ON BONE MINERAL DENSITY AND BONE METABOLISM IN MICE DONG Bingzi, SUN Xiaofang, DENG Yujie, LI Peng, FUKUMOTO Seiji, LI Chengqian (Department of Endocrinology and Metabolism, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To determine the effects of calcilytic, an antagonist of the calcium-sensing receptor (CaSR), on bone density and bone metabolism, and to provide new insights into the clinical treatment of osteoporosis. **Methods** Thirty-six female C57/BL6 mice were randomly divided into control group (group A), high-calcium and high-vitamin D group (group B), intragastric 20 mg/kg calcilytic group (group C), intragastric 50 mg/kg calcilytic group (group D), and subcutaneous 20 μ g/kg teriparatide ((PTH)1-34) (group E). The mice were administered the respective treatments for 12 weeks. Cancellous, cortical, and total bone mineral density, and mRNA expression levels of key osteogenic genes in the bone tissue, including osteocalcin (Bglap2) and Runx-related transcription factor (Runx2), were measured to determine the effects of calcilytic treatment on serum and urine calcium levels in mice. **Results** After 12 weeks of treatment, total bone mineral density was significantly higher in groups B, C, D, and E than in group A ($F=39.82, P<0.05$). Total bone density was also significantly higher in groups C and D than in group B ($P<0.05$), but not significantly different between group D and group E ($P>0.05$). Bglap2 and Runx2 mRNA levels were significantly upregulated in groups C, D and E than in group A ($F=27.96, 21.75, P<0.05$), which suggested that calcilytic increased Bglap2 and Runx2 mRNA expression and improved bone conversion. In addition, calcilytic treatment had minimal effect on serum calcium level, which was not significantly different than the effects of high-calcium and high-vitamin D treatment or exogenous PTH treatment ($P>0.05$). Urine calcium level was significantly lower in group D than in groups B and E, which demonstrated that calcilytic treatment reduced renal calcium excretion ($F=2.68, P<0.05$). **Conclusion** Calcilytic promotes bone formation and increases bone density, and is therefore a promising treatment for osteoporosis.

[KEY WORDS] Calcilytic; Receptors, calcium-sensing; Osteogenesis; Bone density; Parathyroid hormone; Mice, inbred C57BL

钙敏感受体(CaSR)由位于常染色体 3q13~21 上的 CaSR 基因编码,属于 7 次跨膜 G 蛋白耦联受体超家族(GPCR)。其结构包括细胞外 N 末端区域、跨膜区和细胞内 C 末端区域^[1-2]。CaSR 表达于

甲状旁腺、肾脏、消化道及骨组织等,通过感受细胞外钙离子浓度,调节甲状旁腺激素(PTH)的分泌和释放,并通过表达于肾小管的 CaSR 调节尿钙重吸收,从而维持体内的钙平衡^[3-4]。CaSR 在成骨细胞分化、成熟和骨代谢过程中起重要作用^[5-7]。CaSR 的拮抗剂溶钙素(calcilytic)与受体跨膜区氨基酸结合,通过变构调节改变 CaSR 与细胞外钙离子结合

[收稿日期] 2019-01-25; **[修订日期]** 2019-02-10
[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81600691);
山东省自然科学基金博士基金项目(ZR2016HB08)
[通讯作者] 李成乾,Email:lichengqian5213@163.com

力以及敏感性^[8],使细胞外钙应答曲线左移,模拟细胞外低钙状态^[9-11],通过下游 Gqα 蛋白激活 PKC-cAMP 通路,刺激甲状旁腺主细胞分泌和释放内源性 PTH^[4,12-13]。目前的抗骨质疏松治疗的药物中,外源性特立帕肽(PTH(1-34))可以促进成骨细胞的分化以及成熟,促进骨形成,增加骨密度^[14-16]。而 WATANABE 等^[17]的研究表明,长期使用外源性的 PTH(1-34)干预的大鼠有发生骨肉瘤的风险,并有 6%~11% 的患者出现不同程度的血钙升高^[18]。单纯补充钙和维生素 D 对骨密度的增加效果有限,而过多的钙和维生素 D 可使肾脏的尿钙排泄增加,加重肾脏负担,增加泌尿系统结石的风险^[19]。溶钙素通过刺激机体快速释放内源性 PTH,可以一定程度增加大鼠的骨密度^[20-22],被认为是抗骨质疏松治疗的潜在药物。同时,溶钙素还可以与肾小管上皮细胞的 CaSR 结合,抑制经肾脏的尿钙排泄^[9]。本实验旨在探讨溶钙素对小鼠骨密度的增加效果,并与单纯补充钙和维生素 D 或外源性 PTH(1-34)处理效果相比较,以期探讨溶钙素抗骨质疏松治疗的效果,为临床治疗骨质疏松症提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10~12 周龄 C57BL6 雌性小鼠 48 只,体质量 18~22 g,饲养于 SPF 级动物房内,自由活动、进食以及饮水,12-12 h 昼夜交替光照,环境温度维持在 22~25 ℃。

1.2 单次给予溶钙素对小鼠血清生化指标的影响

10 周龄 C57BL6 雌性小鼠(12 只)单次给予溶钙素 50 mg/kg 灌胃治疗,给药前及给药 4、12 h 后鼠尾静脉采集血标本,检测血清钙水平的变化。

1.3 其他小鼠分组及处理

另外 36 只小鼠随机分为对照组(A 组,6 只),高钙高维生素 D 饮食组(B 组,7 只),溶钙素 20 mg/kg 灌胃治疗组(C 组,7 只),溶钙素 50 mg/kg 灌胃治疗组(D 组,8 只),PTH(1-34) 20 μg/kg 皮下注射组(E 组,8 只)。自实验开始时 A 组小鼠即给予普通饲料喂养,B 组小鼠给予高钙高维生素 D 饮食喂养,C、D 组小鼠在普通饲料喂养的基础上分别将溶钙素 20、50 mg/kg 灌胃给予,E 组在普通饲料喂养的基础上将 PTH(1-34) 20 μg/kg 皮下注射给予,A、B 组同时给予等量生理盐水灌胃作为对照,各组小鼠连续干预 12 周后进行相关指标检测。其中,高钙高维生素 D 饮食饲料成分如下:含有质量

分数为 0.012 的钙,含有质量分数为 0.008 的磷,含有 4 kU/kg 的维生素 D^[9]。

1.4 骨密度测定

治疗 12 周后对小鼠进行 micro-CT 扫描,测定椎体骨密度,包括皮质骨、海绵骨及全骨骨密度等。

1.5 血、尿生化指标的检测

干预处理 12 周后实验终点时使用代谢笼饲养小鼠留取 24 h 尿液,检测尿钙、尿肌酐等的含量。随后处死各组全部小鼠后心脏采集血标本,离心分离血清检测血钙等的水平。

1.6 Real-time PCR 技术检测骨钙素(Bglap2)、Runx2 相关转录因子(Runx2)以及抗酒石酸酸性磷酸酶(Trap)等基因的相对表达量

各组干预处理 12 周后实验终点处死后的小鼠取右侧股骨,长约 1 cm,组织研碎后用 Trizol RNA 提取液提取组织 mRNA,使用 20 μL 的 DEPC 水溶解。参照逆转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA,然后遵照反应体系加入 FastStart SYBR Green (TaKaRa Bio Inc 试剂盒),同时加入 Master(ROX) 0.4 μL、cDNA 2 μL,引物 GAPDH、Bglap2、Runx2、Trap 各 0.8 μL 等进行 Real-Time PCR 反应,反应条件为 94 ℃ 预变性 1 min;然后 95 ℃ 20 s,56 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,共进行 35 个循环;最后 75 ℃ 延伸 5 min。以 GAPDH 为内参照计算 Bglap2、Runx2、Trap mRNA 的相对表达量^[9]。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 进行统计分析,计量的结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间相比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溶钙素对骨密度的影响

干预 12 周后,B、C、D、E 组小鼠椎体全骨骨密度较 A 组明显升高,差异均具有显著性($F = 39.82$, $P < 0.05$);C、D 组与 B 组比较,差异具有显著性,而 D 组与 E 组比较差异无显著性($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 溶钙素对骨形成和骨吸收的影响

Real-Time PCR 检测干预 12 周后各组小鼠股骨组织中 Bglap2 及 Runx2 的表达水平,结果证实,C、D、E 组与 A 组比较差异均有显著性($F = 27.96$ 、 21.75 , $P < 0.05$);A 与 B 组、D 与 E 组间 Bglap2 和 Runx2 mRNA 的表达量差异并无统计学意义($P > 0.05$)。同时各组间 Trap 基因的表达差异无显著意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 各组小鼠干预 12 周后骨密度变化比较 ($\rho/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	全骨骨密度	皮质骨密度	海绵骨密度
A 组	6	277.4 \pm 12.4	455.1 \pm 10.0	241.2 \pm 13.4
B 组	7	350.8 \pm 10.7	459.0 \pm 20.7	251.4 \pm 12.1
C 组	7	356.9 \pm 9.3	471.7 \pm 7.2	254.7 \pm 27.9
D 组	8	354.5 \pm 25.4	484.8 \pm 67.2	262.4 \pm 14.8
E 组	8	377.0 \pm 10.7	491.8 \pm 16.8	271.2 \pm 16.7

表 2 各组小鼠干预 12 周后骨组织内骨转换基因表达变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bglap2/Gapdh	Runx2/Gapdh	Trap/Gapdh
A 组	6	1.00 \pm 0.113	1.00 \pm 0.220	1.00 \pm 0.211
B 组	7	0.92 \pm 0.130	1.10 \pm 0.300	1.15 \pm 0.280
C 组	7	1.35 \pm 0.173	1.22 \pm 0.144	0.95 \pm 0.300
D 组	8	1.60 \pm 0.244	1.63 \pm 0.132	0.75 \pm 0.410
E 组	8	1.68 \pm 0.160	1.74 \pm 0.110	0.87 \pm 0.370

2.3 溶钙素对血钙、尿钙水平的影响

溶钙素给予前、单次将溶钙素 50 mg/kg 体质量灌胃 4、12 h 小鼠血钙水平分别为 (2.10 \pm 0.06)、(2.28 \pm 0.09)、(2.12 \pm 0.04) mmol/L, 给药后 4 h 较溶钙素给予前及溶钙素给予 12 h 明显升高, 差异有显著性 ($F=26.35, P<0.05$); 12 h 时血钙水平与溶钙素给予前比较, 差异无显著性 ($P>0.05$)。

长期干预 12 周后, A、B、C、D、E 组小鼠的血钙水平分别为 (2.1 \pm 0.06)、(2.15 \pm 0.24)、(2.19 \pm 0.13)、(2.28 \pm 0.18)、(2.24 \pm 0.35) mmol/L, 仅 D、E 组血钙水平略升高, 但组间比较差异无显著性 ($P>0.05$)。

干预 12 周后, A、B、C、D 和 E 组小鼠的尿钙/尿肌酐比值分别为 0.18 \pm 0.05、0.21 \pm 0.017、0.17 \pm 0.09、0.14 \pm 0.07、0.24 \pm 0.06, E 组小鼠尿钙/尿肌酐比值与 A 组相比较差异具有显著性 ($F=2.68, P<0.05$); D 组小鼠尿钙/尿肌酐比值与 B、E 组比较差异有显著性 ($P<0.05$)。

3 讨 论

溶钙素是 CaSR 拮抗剂, 与跨膜区域氨基酸结合后, 可钝化 CaSR 对细胞外钙离子的敏感性, 模拟低钙血症状态, 促进内源性 PTH 的快速释放和分泌^[9,23-24]。口服溶钙素治疗可以呈浓度依赖性地增加小鼠内源性 PTH 的水平, 其作用与外源性注射 PTH(1-34)类似, PTH 的脉冲式升高可以促进骨形成^[25], 成为抗骨质疏松症治疗药物的新选择。本研究结果证实, 溶钙素可以显著增加小鼠全骨骨密度, 50 mg/kg 溶钙素干预 12 周后可达到与外源性注射

PTH(1-34)类似的骨密度增加效果, 并可上调骨组织内 Bglap2、Runx2 mRNA 的表达水平, 提示溶钙素在增加骨密度的同时可促进骨转换, 改善骨代谢情况。

现有的抗骨质疏松药物如 PTH(1-34)、双磷酸盐类药物都会不同程度地影响血钙水平, 特别是外源性 PTH(1-34), 长期注射可能会引起血钙水平的波动^[9,26]。因此, 在治疗骨质疏松的同时, 使药物达到稳定的血药浓度, 并减少体内血钙水平的波动非常重要。避免高钙血症的发生可以减少肾脏排泄钙的负担, 并减少心血管系统和体内钙质异位沉积的损害。本动物实验表明, 溶钙素干预 12 周后, 血钙也仅较基线水平轻度升高。更为重要的是, 溶钙素可以作用于表达于肾小管的 CaSR, 减少尿钙排泄, 避免肾实质钙化和尿路结石的形成^[9,27]。且溶钙素对血磷、尿磷廓清的影响均较小, 避免磷代谢异常所引起的异位沉积和 FGF23/Klotho 等因子对骨组织的影响^[28]。溶钙素治疗的这一特点具有与维生素 D 和钙补充以及 PTH(1-34)治疗无可比拟的优势。

溶钙素可与甲状旁腺主细胞膜上的 CaSR 结合, 刺激甲状旁腺释放、合成 PTH。CABAL 等^[29]研究显示, 溶钙素对内源性 PTH 在体内的释放作用呈双峰, 具有两个独立的存储池 (reservoirs), 可以在数分钟内刺激快速分泌相, 和持续数小时的缓慢分泌相, 所以其作用时间更长, 血药浓度更加稳定。此外, 与 PTH(1-34)治疗相比, 溶钙素治疗不增加尿钙排泄, 同时亦可改善小鼠的骨强度, 有望成为有效的抗骨质疏松症治疗药物。

溶钙素可以上调骨组织内骨形成转录因子及关键基因的表达水平, 促进骨形成, 促进骨转换。然而, 溶钙素促进骨形成的具体分子机制是否依赖于对成骨细胞分化、成熟的调节尚不明确, 对此有赖于更多分子机制的研究。

总之, CaSR 抑制剂溶钙素可促进骨形成、增加骨密度, 且对血钙水平影响较小, 并不增加尿钙排泄, 有望成为有效的抗骨质疏松症治疗药物。

[参考文献]

[1] GOLTZMAN D, HENDY G N. The calcium-sensing receptor in bone: Mechanistic and therapeutic insights[J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(5): 298-307.

[2] MAGNO A L, WARD B K, RATAJCZAK T. The calcium-sensing receptor: A molecular perspective[J]. Endocr Rev, 2011, 32(1): 3-30.

[3] ALFADDA T I, SALEH A M, HOUILLIER P, et al. Calci-

- um—sensing receptor 20 years later[J]. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 2014,307(3):C221-C231.
- [4] GOLTZMAN D, MANNSTADT M, MARCOCCI C. Physiology of the calcium-parathyroid hormone-vitamin D Axis[J]. *Front Horm Res*, 2018,50:1-13.
- [5] RICHARD C, HUO R J, SAMADFAM R, et al. The calcium-sensing receptor and 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase interact to modulate skeletal growth and bone turnover[J]. *J Bone Miner Res*, 2018,33(11):2082-2083.
- [6] WANG S, NODA K, YANG Y Y, et al. Calcium hydroxide regulates transcription of the bone sialoprotein gene via a calcium-sensing receptor in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells[J]. *Eur J Oral Sci*, 2018,126(1):13-23.
- [7] CIANFEROTTI L, GOMES A R, FABBRI S, et al. The calcium-sensing receptor in bone metabolism: From bench to bedside and back[J]. *Osteoporos Int*, 2015,26(8):2055-2071.
- [8] MAYR B, GLAUDO M, SCHÖFL C. Activating calcium-sensing receptor mutations: Prospects for future treatment with calcilytics[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016,27(9):643-652.
- [9] DONG B Z, ENDO I, OHNISHI Y, et al. Calcilytic ameliorates abnormalities of mutant calcium-sensing receptor (CaSR) knock-in mice mimicking autosomal dominant hypocalcemia (ADH)[J]. *J Bone Miner Res*, 2015,30(11):1980-1993.
- [10] NEMETH E F, VAN WAGENEN B C, BALANDRIN M F. Discovery and development of calcimimetic and calcilytic compounds[J]. *Prog Med Chem*, 2018,57(1):1-86.
- [11] NEMETH E F, GOODMAN W G. Calcimimetic and calcilytic drugs: Feats, flops, and futures[J]. *Calcif Tissue Int*, 2016,98(4):341-358.
- [12] GORVIN C M, ROGERS A, HASTOY B, et al. AP2 σ mutations impair calcium-sensing receptor trafficking and signaling, and show an endosomal pathway to spatially direct G-protein selectivity[J]. *Cell Rep*, 2018,22(4):1054-1066.
- [13] BARAN N, BRAAK M, SAFFRICH R, et al. Novel activating mutation of human calcium-sensing receptor in a family with autosomal dominant hypocalcaemia[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015,407:18-25.
- [14] NAPOLI N, LANGDAHL B L, LJUNGGREN Ö, et al. Effects of teriparatide in patients with osteoporosis in clinical practice: 42-month results during and after discontinuation of treatment from the European extended forsteo® observational study (ExFOS)[J]. *Calcif Tissue Int*, 2018,103(4):359-371.
- [15] HARVEY N C, KANIS J A, ODEN A, et al. FRAX and the effect of teriparatide on vertebral and non-vertebral fracture[J]. *Osteoporos Int*, 2015,26(11):2677-2684.
- [16] FUJIHARA R, MASHIBA T, YOSHITAKE S, et al. Weekly teriparatide treatment increases vertebral body strength by improving cortical shell architecture in ovariectomized cynomolgus monkeys[J]. *Bone*, 2019,121:80-88.
- [17] WATANABE A, YONEYAMA S, NAKAJIMA M, et al. Osteosarcoma in *Sprague-Dawley* rats after long-term treatment with teriparatide (human parathyroid hormone (1-34)) [J]. *J Toxicol Sci*, 2012,37(3):617-629.
- [18] HORWITZ M J, AUGUSTINE M, KHAN L, et al. A comparison of parathyroid hormone-related protein (1-36) and parathyroid hormone (1-34) on markers of bone turnover and bone density in postmenopausal women: The PrOP study[J]. *J Bone Miner Res*, 2013,28(11):2266-2276.
- [19] RATHOD A, BONNY O, GUESSOUS I, et al. Association of urinary calcium excretion with serum calcium and vitamin D levels[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015,10(3):452-462.
- [20] KUMAR S, MATHENY C J, HOFFMAN S J, et al. An orally active calcium-sensing receptor antagonist that transiently increases plasma concentrations of PTH and stimulates bone formation[J]. *Bone*, 2010,46(2):534-542.
- [21] SAIDAK Z, BRAZIER M, KAMEL S, et al. Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications[J]. *Mol Pharmacol*, 2009,76(6):1131-1144.
- [22] DONG B, ENDO I, OHNISHI Y, et al. Persistent activation of calcium-sensing receptor suppresses bone turnover, increases microcracks and decreases bone strength[J]. *J Bone Miner Res Plus*, 2019:e10182.
- [23] HANNAN F M, KALLAY E, CHANG W H, et al. The calcium-sensing receptor in physiology and in calcitropic and non-calcitropic diseases[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018,15(1):33-51.
- [24] COSMAN F, GILCHRIST N, MCCLUNG M, et al. A phase 2 study of MK-5442, a calcium-sensing receptor antagonist, in postmenopausal women with osteoporosis after long-term use of oral bisphosphonates[J]. *Osteoporos Int*, 2016,27(1):377-386.
- [25] SHIMIZU M, NODA H, JOYASHIKI E, et al. The optimal duration of PTH(1-34) infusion is one hour per day to increase bone mass in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2016,39(4):625-630.
- [26] 董冰子,孙晓方. 骨质疏松症治疗新进展: 从分子机制到药物靶点[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2018,11(6):620-627.
- [27] RICCARDI D, VALENTI G. Localization and function of the renal calcium-sensing receptor[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016,12(7):414-425.
- [28] HU M C, KURO-O M, MOE O W. Renal and extrarenal actions of Klotho[J]. *Semin Nephrol*, 2013,33(2):118-129.
- [29] CABAL A, MEHTA K, ROSS D S, et al. A semimechanistic model of the time-course of release of PTH into plasma following administration of the calcilytic JTT-305/MK-5442 in humans[J]. *J Bone Miner Res*, 2013,28(8):1830-1836.