

·综述·

柠檬酸在骨质疏松疾病中作用的研究进展

张书勤^{1,2,3} 张群^{1,2} 谢登辉^{1,2,3}

【摘要】 柠檬酸盐是骨骼的重要组成部分,人体90%以上的柠檬酸都储存在骨组织,参与骨微结构和力学强度的维持。柠檬酸一直都作为三羧酸循环的重要中间体而被熟知,是一种必需的代谢物,参与多种生物过程,如能量代谢、成骨和血管生成。近年研究发现:柠檬酸在骨组织形成与骨矿化过程中可能发挥重要作用。进一步研究表明,骨质疏松症的严重程度与柠檬酸水平之间存在负相关,骨骼中柠檬酸盐的流失可能会加重骨质疏松症的发展。外源性柠檬酸补充剂以及基于柠檬酸的修复材料可能为防治骨质疏松和促进骨修复提供有效途径。本文综述了当前关于柠檬酸盐与骨质疏松之间关系的认识,阐述骨骼微环境中柠檬酸在骨形成、骨结构与功能发挥中的作用,探索其具体的调节机制,最后对柠檬酸补充剂和基于柠檬酸的骨修复材料的研究进展进行了总结和评价。这不仅进一步明确了骨生物学与骨代谢调控的关键科学问题,而且为新型骨修复材料的开发与应用提供理论依据。

【关键词】 柠檬酸; 基于柠檬酸的骨修复材料; 骨质疏松症

Progress of citrate mechanism in bone and osteoporosis Zhang Shuqin^{1,2,3}, Zhang Qun^{1,2}, Xie Denghui^{1,2,3}.

¹Department of Orthopedics Medical Center, Joint Surgery and Sports Medicine, ²Office of Clinical Trial of Drug, The Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, China; ³Orthopedic Hospital of Guangdong Province, Guangdong Academy of Orthopedics, Guangdong Provincial Key Laboratory of Bone and Joint Degeneration Diseases, Guangzhou 510000, China

Corresponding authors: Zhang Qun, Email: zq1979@smu.edu.cn; Xie Denghui, Email: 13802408767@163.com

【Abstract】 Citrate is an important part of bones. More than 90% of the citric acid in the human body is stored in bone tissue, which participates in the maintenance of bone microstructure and mechanical strength. Citric acid has always been known as an important intermediate in the tricarboxylic acid cycle. It is an essential metabolite involved in various biological processes, such as energy metabolism, osteogenesis, and angiogenesis. Recent studies have found that citric acid may play an important role in the process of bone tissue formation and bone mineralization. Further studies have shown that there is a negative correlation between the severity of osteoporosis and the level of citric acid, and the loss of citrate in the bones may aggravate the development of osteoporosis. Exogenous citric acid supplements and citric acid-based repair materials may provide effective ways to prevent osteoporosis and promote bone repair. This paper reviews the current understanding of the relationship between citrate and osteoporosis, expounds the role of citric acid in bone formation, bone structure and function in the bone microenvironment, explores its specific regulation mechanism, and finally summarizes and evaluates the research progress of citric acid supplements and citric acid-based bone repair materials. This not only further clarifies the key scientific issues in bone biology and bone metabolism regulation, but also provides a theoretical basis for the development and application of new bone repair materials.

【Key words】 Citric acid; Citric acid-based bone repair materials; Osteoporosis

骨质疏松是一种临床上常见的以骨量降低、骨脆性增加和骨微结构破坏为特征的全身性骨病,影响着全球2亿多

人。当骨重塑中骨吸收大于骨形成时,骨代谢平衡失调,继而发生骨丢失。骨质疏松症可分为原发性和继发性,由年龄

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2096-0263.2021.04.008

基金项目:南方医科大学第三附属医院2020年青年科研启动基金项目(QN2020018);广东省医学科学技术研究基金(B2021272);国家自然科学基金(81772315;81975328)

作者单位:510000 广州,南方医科大学第三附属医院,骨科医学中心,关节外科与运动医学科¹,临床药物研究基地²;510000 广州,广东省骨科医院,广东省骨科研究院,骨与关节退行性疾病广东省重点实验室³

通信作者:张群,Email: zq1979@smu.edu.cn; 谢登辉,Email: 13802408767@163.com

增长或激素缺失引发的骨量丢失是原发性骨质疏松的主要病因。骨质疏松性骨折亦称脆性骨折,是中老年最常见的骨骼疾病,也是骨质疏松症的严重阶段^[1]。随着人口老龄化的到来,骨质疏松性骨折的数量不断上涨,每年新发人数超过900万人,国际骨质疏松基金会的一份报告预测,2040年时全球50岁以上人群中将有超过3亿人口处于骨质疏松性骨折的高风险,给社会及家庭带来巨大的经济成本和负担。髌部骨折和椎体骨折被认为是典型的骨质疏松性骨折,且由于骨质疏松症的全身性,骨折风险的增加几乎影响到所有骨骼部位。预防脆性骨折是骨质疏松症患者治疗和管理的关键目标^[2-3]。应积极采用规范的抗骨质疏松药物治疗,其目的是缓解疼痛,抑制急性骨丢失,提高骨量,改善骨质量,降低骨折发生率。

柠檬酸是一种三羧酸类化合物,它的分子量为189 KDa, pKa值分别为2.9、4.8和5.6^[4]。天然柠檬酸在自然界中分布很广,存在于植物如柠檬、柑橘、菠萝等果实和动物的骨骼、肌肉、血液中。柑橘类水果如柠檬和青柠,在干燥之后,柠檬酸含量可达8%^[5]。食品柠檬酸盐也可以由微生物通过发酵过程以生物技术生产^[6]。已知在各种预制食品中使用工业规模的柠檬酸来代替新鲜柠檬汁,它还可以用作食品和饮料中的添加剂,起到防腐剂、酸度调节剂、调味物质或乳化剂的作用。由于应用的多样性,柠檬酸是世界上消耗量最大的有机酸,具有很高的商业价值^[7]。柠檬酸盐的通常营养摄入量约为每天4 g^[4],膳食柠檬酸盐通过Na⁺/二羧酸盐协同转运蛋白在小肠中被吸收。血浆柠檬酸盐在病理生理学中起重要作用。例如,肝脏通过溶质载体家族13成员5(the solute carrier family 13 member 5, SLC13A5)从循环中摄取柠檬酸盐暗示了2型糖尿病的可能发生^[8]。细胞外柠檬酸盐已被证明可以改变癌细胞代谢和癌症发展^[9]。血浆柠檬酸盐的其他功能还包括在低血糖条件下为细胞提供能量来源,并充当内源性抗凝剂以防止病理性血液凝固^[9-10]。细胞外柠檬酸盐的局部水平对于间充质干细胞的成骨发育很重要^[11],而人体的大部分柠檬酸盐(超过90%)存在于骨组织中^[12]。绝大多数循环柠檬酸盐被认为来自骨动员,并已经研发了一系列基于柠檬酸的骨修复材料。本文将对柠檬酸及基于柠檬酸的仿生骨材料在骨质疏松症与骨修复中作用的进展进行综述。

一、骨质疏松症治疗现状

骨质疏松症治疗的目的是减少骨质流失和预防骨质疏松性骨折的发生,目前临床上治疗骨质疏松症的药物主要包括促骨形成药物、抗骨吸收药物和骨健康营养补充剂。包括:双膦酸盐(阿仑膦酸、唑来膦酸等)、选择性雌激素受体调节剂(雷洛昔芬等)、特立帕肽、地舒单抗、罗莫珠单抗和适当的雌激素替代疗法等,同时钙和维生素D的补充也十分重要。以上这些药物具有激活骨重塑以形成新的骨组织的优点,但是也已经报道了它们的异常副作用,以及难以维持其长期有效性等缺点。而手术时应考虑骨质疏松性骨折骨质量差、愈合缓慢等不同于一般创伤性骨折的特点,可采取的措施包括:使用特殊固定器材,如锁定加压钢板、粗螺纹钉、

具有特殊涂层材料的固定器材或假体等;采用骨水泥或植骨材料充填等局部强化技术^[13-14]。然而目前临床应用和学术研究中广泛使用的骨填充修复材料存在细胞响应慢、有无菌炎症反应、骨分化能力不好、骨整合和骨再生速度慢等缺陷^[15]。导致其在临床应用上受到限制,因此有必要进一步开发新的骨填充修复材料。

有文献表明,与年龄相关的、卵巢切除术诱导的或视黄酸诱导的骨质流失的小鼠或大鼠骨骼中的柠檬酸盐含量显著降低。在骨质疏松动物中,血浆柠檬酸盐也被下调。重要的是,老年骨质疏松男性的血浆柠檬酸水平显著低于年轻健康男性,并且与腰椎骨密度和髌部骨密度呈正相关。这些研究结果建立了柠檬酸盐含量与骨质疏松症等骨质流失相关疾病之间的新关系。因此,血清柠檬酸水平可能是代表骨质疏松症的新标志物^[16]。另外,已经报道的一系列基于柠檬酸的仿生骨材料在动物模型中表现出极为良好的骨诱导和成骨性能,柠檬酸在调节代谢功能和维持骨骼结构完整性方面发挥了巨大作用。

二、柠檬酸认识的历史演化

体内柠檬酸稳态主要取决于四个方面,即营养摄入、肾脏清除、细胞代谢和骨骼重塑。外源性柠檬酸盐主要由食物提供,然后迅速进入循环系统,在肾小球水平过滤,最终根据生理需要被重新吸收。线粒体产生的柠檬酸盐(三羧酸循环的中间体)几乎都被细胞用作能量来源,或用于高度增殖细胞的脂质生物合成和支持特定细胞的组织相关功能,包括成骨细胞对细胞外基质的矿化作用^[17-19](见图1)。Dickens 1941年首次指出这种化合物与骨骼之间的密切联系^[18],随后很多报道证实骨组织与柠檬酸的关系^[19-20]。骨组织中柠檬酸含量约为20~100 μmol/g,约是软骨组织的10~20倍(前列腺组织例外)^[21-22]。柠檬酸占骨总成分的1.6%左右,占骨有机成分的5%,机体80%的柠檬酸存在于骨组织中^[23,12]。这些信息提示我们柠檬酸是骨组织不可或缺的成分,在正常骨发育及骨维持中应具有非常重要的功能/结构作用。但由于研究方法及技术限制,在很长一段时间,对骨中柠檬酸的研究相对较为停滞。直至Schmidt-Rohr及其团队使用多核磁共振及距离测量分析了骨微结构表面的柠檬酸^[12]。接着Davies等^[24]提出骨中柠檬酸参与形成骨的结构,水化层的柠檬酸在矿化片层之间形成桥梁,合理解释了一些已知的骨矿物结构特征。

早期的研究主要是寻找促钙激素[降钙素、甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)和维生素D]在代谢调节中的起源和作用。随着时间的推移,在理解柠檬酸盐如何参与骨代谢方面取得了相当大的进展。已知柠檬酸盐与储存在硬组织中的钙具有高结合亲和力,可以促进骨形成。关于成骨细胞在生产柠檬酸盐中的作用、柠檬酸盐如何进入骨的晶体结构以及它如何控制磷灰石纳米晶体的尺寸和形态,已有足够的认识^[25-18]。且柠檬酸盐作为骨基质磷灰石/胶原复合物的主要成分,为骨骼提供重要的生物力学特性,是骨骼稳定性和抗骨折能力的决定因素^[26-27]。因此,除了研究柠檬酸对骨质疏松症的治疗作用外,也已经开发出一系列骨科应用的

基于柠檬酸的生物材料,以促进骨的修复。基于柠檬酸在骨结构及功能中作用的研究,柠檬酸在骨质疏松及早发现及预防和治疗中有重要的临床意义。

三、柠檬酸的骨生物学作用及其机制

骨质疏松症最基本的发病特征是成骨细胞骨形成和破骨细胞骨吸收之间的不平衡。骨质疏松患者的柠檬酸代谢失调,参与骨重建的柠檬酸含量显著降低,骨吸收远大于骨形成,最终导致骨量减少。尽管人们早就知道柠檬酸盐在骨骼中积累并且骨质疏松症始终伴随着体外和体内柠檬酸盐水平的显著降低,但其在骨质疏松症的发展、维持和病理学中的作用仍然未知^[16,28]。2013年,Leslie首次提出了“成骨细胞柠檬酸盐”的新概念。随后,相关研究不断被报道^[29]。有研究发现:骨微环境中新生血管的长入,尤其是H型血管对骨形成与骨长入有极为重要的作用。柠檬酸(维持在10 uM梯度内)可以有效促进血管内皮细胞的增生和血管的生成,并初步认为其过程可能通过雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路介导^[30]。由此推测柠檬酸的促成骨作用,可能与其促血管形成机制有关。已知柠檬酸对成骨细胞的骨标志蛋白的基因表达有促进作用,能显著增加碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性以及成骨分化转录因子(osterix, OSX)的表达水平,促进钙结节的形成^[31],促进成骨细胞的分化。体外细胞研究也证实成骨细胞分化后期,柠檬酸编入羟基磷灰石/胶原基质中,促进矿化过程,而且发现骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)能够协调“柠檬酸化”和成骨矿化进程^[32,27]。但其具体作用条件尤其是深入的分子作用机制,尚不清楚。

有研究表明雌激素缺乏会导致“净柠檬酸盐损失”,雌激素缺乏一方面促进了NF- κ B配体的受体激活剂(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)的活性,这是破骨细胞分化因子;另一方面,成骨前体一部分要分化为脂肪细胞^[33],导致能够合成柠檬酸盐的成熟的成骨细胞减少,从而损害骨微结构的质量和稳定性^[34,12]。此外,破骨细胞分化和骨吸收是需要能量的过程,合成的柠檬酸盐不能积累,导致“净柠檬酸盐损失”^[35-36],这可以解释在绝经后妇女中观察到的柠檬酸盐排泄减少。另外,锌在调节柠檬酸盐在新矿化基质形成过程中的细胞外生物利用度方面起着至关重要的作用,因此,涉及锌转运蛋白的基因缺陷可能与柠檬酸盐代谢和骨病的改变有关。已经证明细胞外柠檬酸盐在间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨分化方面发挥了关键作用^[11],柠檬酸盐代谢、成骨细胞分化和矿化过程如下:(1)未分化状态下的MSCs里的柠檬酸通过三羧酸循环氧化。(2)在适当的刺激下,MSCs增殖并向成骨细胞分化。促进锌摄入的锌转运蛋白(Zinc transporter protein-1, ZIP-1)上调,ZIP-1的上调导致细胞内 Zn^{2+} 的积累,由于线粒体乌头酸酶的锌依赖性抑制,最终导致线粒体柠檬酸盐分泌增加。柠檬酸通过线粒体溶质载体(solute carrier family 25member 1, SLC25A1)和“柠檬酸转运蛋白”(citrate transport protein, CTP)进入胞质溶胶,使用胞质柠檬酸盐进行脂

肪生成过程。(3)柠檬酸盐从细胞质到细胞外液的输出的同时合成和释放无定形磷酸钙、胶原蛋白和非胶原蛋白。(4)“成骨细胞柠檬酸化”在矿化基质组装时完成。至此将“成骨细胞柠檬酸化”的概念与MSCs分化为成骨细胞的主要步骤结合起来^[25]。因此,寻求可促进成骨细胞中柠檬酸盐分泌的化合物来用于治疗骨质疏松症成为有效的策略,也有人提出促进细胞外柠檬酸摄取是代谢疾病的潜在治疗方法^[37-38]。

骨骼中沉积着极高水平的柠檬酸盐,其在骨骼形成和骨质疏松症治疗中起着重要作用。然而其生物矿化机制尚未阐明。研究发现柠檬酸盐分子可以显著降低生物基质与无定形磷酸钙前体之间的界面能,以增强其在生物矿化早期的润湿效果,依次促进羟基磷灰石的原纤维内形成,从而产生无机有机复合物。实验证明,只有含有约8.2 wt%结合柠檬酸盐(接近生物骨中的水平)的胶原纤维才能达到天然骨中的完全矿化。这一发现提供了关于小生物分子对生物矿化前沿的调节作用的物理化学观点^[39]。成骨细胞使柠檬酸盐以矿化的形式与骨整合,关于柠檬酸盐在纳米晶体结构中的作用的研究越来越多。天然骨骼磷灰石纳米晶体表面的柠檬酸与磷灰石、胶原蛋白能够紧密结合,这些柠檬酸能有效抑制骨组织中磷灰石纳米晶体的过度增厚,控制纳米晶体的生长,维持其有效晶体结构。上述机制说明柠檬酸的有效沉积对人体骨骼系统维持负载力学强度发挥着极其重要的调控作用。柠檬酸作为强效的多功能化学单体,被视为仿生单体元素纳入材料设计,为材料性质提供多种价值功能。首先,柠檬酸参与可降解聚合物的化学键形成,可提高聚合物的体液相容性,平衡其亲水/疏水性能;其次,柠檬酸提供氢键和生物活性分析结合的位点,赋予材料新的生物学特性;最后,柠檬酸高分子聚合物含有大量的羧基键,可与钙粒子产生螯合作用,结合高达65%的羟基磷灰石,形成聚合物/羟基磷灰石复合物,模拟天然骨骼的无基质成分,与传统聚乳酸聚合物相比,可有效避免复合物的强度降低和脆性增加。因此,基于柠檬酸的聚合物羟基磷灰石复合物被视为抗压强度高、生物仿生度高的骨支架制备的理想材料^[24,12]。

四、柠檬酸抗骨质疏松症中的研究进展

在研究了柠檬酸骨合成的作用机制后,针对以柠檬酸作为骨质疏松症预防和治疗的研究也在近年成为热点。目前许多动物实验和临床研究都已展开,并取得了新进展。

(一)作为检测骨量丢失相关疾病的标志分子

在人类血浆中柠檬酸盐水平很高,在健康个体中的范围为60~100 μ M,在某些疾病条件下可达到高达300 μ M的值^[37,40]。血浆柠檬酸盐在病理生理学中起重要作用。有研究表明,在发生骨质疏松的骨组织中,柠檬酸水平显著下降;在发生骨量丢失的动物模型中,循环柠檬酸水平也显著低于正常组。提示骨中柠檬酸可能在维持循环柠檬酸稳态中有重要作用,血清柠檬酸水平变化可能与年龄相关或激素缺失诱导的骨量丢失有关。一方面,骨形成与骨吸收之间的失衡可能会减少成骨细胞柠檬酸的合成。另一方面,骨髓间充质干细胞向脂肪细胞的分化可能需要更多的柠檬酸作为细胞乙

酰辅酶的来源用于脂肪酸的生物合成。这些与骨质疏松相关的病理条件可能导致骨质疏松时体内柠檬酸的产生下降,使参与骨结构的柠檬酸减少,骨质疏松性骨矿物的结晶度和生物力学性质也因此发生变化,降低了骨强度和骨质量,使骨质疏松人群易发脆性骨折。因此血清柠檬酸有可能是检测骨量丢失相关疾病如增龄性及绝经后骨质疏松的标志分子,为这些疾病的预防和早期诊断提供新的依据^[40-41]。

(二)柠檬酸盐补充剂

大多数关于抗骨折药物的主要临床试验都向对照组和干预组施用碳酸钙和维生素D。然而,在几项观察性研究中,碳酸钙的吸收比柠檬酸钙更依赖于胃酸分泌^[42]。柠檬酸钙表现出更高的生物利用度,溶解度增加,吸收比碳酸钙更少依赖于雌激素和维生素D的辅助^[43]。当前调查了柠檬酸钙(4项研究)^[44-47]、柠檬酸钾(7项研究)^[48-54]的作用效果,并有两项研究^[55,56]对上述治疗进行了比较。从研究的干预措施,试验剂量、给药时间和随访结果来看差异很大。在9项研究中,有共同给予额外的补充剂,即碳酸钙和/或维生素D3。有一项研究的参与者处于育龄期(22~30岁),大多数研究包括绝经后妇女($n=11$),其他试验旨在招募老年个体($n=1$)。九项研究控制了钙和/或蛋白质和/或盐的膳食摄入量;在五项研究中,受试者食用了提供的非素食饮食;在一项研究中,没有关于饮食习惯的描述。通过比较不同作者报告的结论,发现了两个关键点:(1)摄入足够的钙对于预防老年受试者和绝经后妇女的骨质流失至关重要,柠檬酸钙似乎比碳酸钙更有效^[44-47]。(2)柠檬酸钾可防止更年期、慢性酸血症和高盐摄入引起的骨吸收增加^[48,50-56]。有研究表明,柠檬酸的螯合作用会导致钾和钙的吸收增加,从而对骨密度和新陈代谢产生有益影响。另外,酸中毒这种代谢状况有利于骨吸收过程并抑制成骨功能^[45,25]。因此,可能中和酸中毒的基于柠檬酸盐的治疗也可能是预防骨质减少进展的有效策略。

然而,由于研究之间的异质性非常高,因此从这些临床试验中获得的结果很难具有说服力。根据临床治疗效果来看,膳食补充剂发挥的作用不是那么突出,因此不能简单被视为一种药物治疗。但根据目前的研究,可以引导临床医生和研究人员进一步深入探究基于柠檬酸盐治疗骨质疏松的有益结果。

(三)柠檬酸材料

各种创伤及慢性疾病如骨质疏松症等使骨折及骨缺损的发生率显著增加,如何使骨折及骨缺损更好更快地愈合已成为当前研究的热点问题之一。柠檬酸盐在骨生理学中的重要性表明,在设计骨科生物材料和支架时应考虑这种离子。它包含在骨生物材料中已经证明了许多有趣的结果:最近的一项研究表明,柠檬酸盐,无论是存在于生物材料表面还是补充到细胞培养基中,对基因表达都有独特的影响^[31]。柠檬酸盐骨水泥还对治疗骨质减少和骨质疏松症(骨质疏松性骨折)具有有益作用^[57]。研究表明,柠檬酸盐在低剂量下可提高成骨细胞的成骨功能,在更宽的剂量范围内还可提高血管内皮细胞的血管生成^[58]。该研究主要集中在材料的流

变学和机械性能上,并且柠檬酸盐通常包含在磷酸钙骨水泥中,揭示了柠檬酸盐对水泥的处理性能和可注射性的有益作用^[59-63]。最近,柠檬酸被包含在磷酸镁钙水泥中的结果表明,该设计可以得到具有令人满意的凝固时间、机械强度、良好的细胞相容性和骨诱导性的骨水泥^[64]。表明它们在骨再生方面的潜在应用。值得注意的是,对材料中柠檬酸盐释放的精细调节至关重要,因为柠檬酸盐浓度过高可能对细胞有毒,从而损害水泥的生物相容性^[65]。

目前已开发的基于柠檬酸的可降解复合生物活性材料还包括:聚(八亚甲基柠檬酸盐)POC (poly octamethylene-citrate)-based elastomers)材料、掺杂聚酯 CUPE (crosslinkedurethane-doped polyesters)材料、双相 POC-click 点击材料、双重交联 PAMC (poly alkylene maleate citrate)材料、自发荧光 BPLP (biodegradablephotoluminescent polymers)材料、光致发光生物可降解 BPLP-PSer (phosphoserine-based)材料以及可注射 iCMB (injectable citrate-based mussel-inspired bioadhesives)骨粘附性材料等^[11-12,26,66-71]。其中,CBPB/HA(citrate-based polymer blend/hydroxyapatite)与 POC/HA, POC-GP 复合材料体外研究结果显示:细胞毒性小,能迅速诱导骨的生成,且不引起慢性炎症反应。具备极大的应用前景。第二代 POC-click 材料在设计上通过点击化学(click chemistry)来引入双重交联机理,增强力学强度,断裂拉伸强度达到 45 MPa,同时还能通过点击化学有效键合生物活性因子从而有效促进内皮细胞的贴附生长。为模拟松质骨内骨微结构,通过工程学造孔技术,制作单相多孔和两相仿生骨支架可分别修复大鼠颅骨和尺骨缺损。在没有添加任何生长因子及体外种植细胞的情况下,除了修复骨缺损以外,柠檬酸盐基支架还能有效促进骨小梁内新生血管的形成和长入。由柠檬酸盐、磷酸丝氨酸和二醇组成的光致发光聚合物 BPLP-PSer/羟基磷灰石复合微粒支架,既可以实现多种成像功能,又可以从可生物降解的平台上控制释放生物活性因子柠檬酸盐和磷酸丝氨酸,通过代谢调节为人类干细胞提供燃料。

五、不足与挑战

目前没有足够的证据支持使用天然柠檬酸盐作为预防骨质流失的重要治疗方法。很难从不同的实验条件和治疗方法对外源性柠檬酸盐的成骨作用获得透彻和全面的了解。作为阴离子,柠檬酸盐是众所周知的金属离子螯合剂,在考虑柠檬酸盐的螯合特性时,调节其细胞外浓度很重要^[65]。一方面,成骨细胞能够合成柠檬酸盐并将其释放到细胞外基质中,使其可以与磷酸钙-胶原复合物结合,从而促进骨板中磷灰石纳米晶体的正常三维取向,从而保证骨骼的生物力学性能。另一方面,破骨细胞的再吸收活动导致柠檬酸盐进入矿化基质中,从而使其成为维持血浆稳态的最重要来源^[32]。因此,所有影响骨形成和骨吸收平衡的条件都可能影响柠檬酸盐稳态。多年来,在临床环境中已经提出了使用基于柠檬酸盐的补充剂用于治疗受骨重建障碍影响的患者,例如骨质减少和骨质疏松症。然而,涉及代谢性骨病临床管理的指南并没

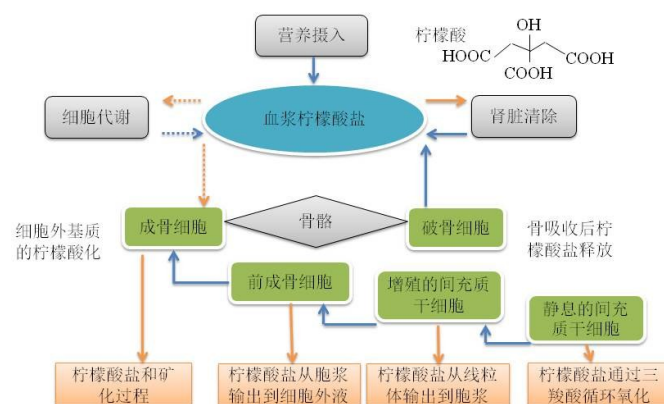


图1 柠檬酸体内循环和促成骨的概念示意图:营养摄入、肾脏清除、细胞代谢和骨骼重塑共同构成了体内柠檬酸稳态,重点强调了柠檬酸对间充质干细胞向成骨细胞分化的影响

有强调柠檬酸盐在维持骨完整性方面的作用。尽管如此,根据研究结果,在对出现骨密度改变的患者进行全面评估时,应考虑柠檬酸盐指标;在尿液中柠檬酸盐排泄量低的情况下,可以推荐基于柠檬酸盐的补充剂,以防止对骨骼的渐进性损伤和骨密度的渐进性降低^[72]。

总体而言,本综述强调了柠檬酸在机体中的主要功能,更具体地说,重点关注柠檬酸盐补充剂及不断发展的、基于柠檬酸的复合材料在代谢性骨病尤其是骨质疏松症的病理生理学和早期预防及临床治疗中的作用,并由表及里对其作用机制进行了总结。通过阐述柠檬酸当前的研究现状和总结分析,促进我们对柠檬酸在骨以及骨质疏松疾病中的认识,对后续研究具有重要的理论价值和临床意义。

参 考 文 献

- Xianzuo Zhang, Haiyi Liang, Nikolaos Kourkoulis, Comprehensive analysis of lncRNA and miRNA expression profiles and ceRNA network construction in osteoporosis [J]. *Calcif Tissue Int*, 2020, 106(4): 343-354.
- William D Leslie, Colleen J Metge, Mahmoud Azimace, et al. Direct costs of fractures in Canada and trends 1996-2006: a population-based cost-of-illness analysis [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(10): 2419-2429.
- Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis [J]. *Ann Intern Med*, 2018, 168(4): 306-307.
- Renata Caudarella, Fabio Vescini, Angela Buffa, et al. Citrate and mineral metabolism: kidney stones and bone disease [J]. *Front Biosci*, 2003, 8: s1084-s1106.
- Penniston KL, Nakada SY, Holmes RP, et al. Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products [J]. *J Endourol*, 2008, 22(3): 567-570.
- E Schuster, N Dunn-Coleman, J C Frisvad, et al. On the safety of aspergillus niger--a review [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(4/5): 426-435.
- Wei Hu, Wen-Jian Li, Hai-Quan Yang, et al. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(1): 201-209.
- Birkenfeld AL, Lee HY, Fitsum Guebre-Egziabher, et al. Deletion of the mammalian INDY homolog mimics aspects of dietary restriction and protects against adiposity and insulin resistance in mice [J]. *Cell Metab*, 2011, 14(2): 184-195.
- ME Mycielska, VM Milenkovic, CH Wetzel, et al. Extracellular citrate in health and disease [J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(10): 884-891.
- Mycielska ME, Dettmer K, Rümmele P, et al. Extracellular citrate affects critical elements of cancer cell metabolism and supports cancer development in vivo [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(10): 2513-2523.
- Chuying Ma, Xingui Tian, Jimin P Kim, et al. Citrate-based materials fuel human stem cells by metabonegenic regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(50): E11741-E11750.
- Y-Y Hu, A Rawal, K Schmidt-Rohr. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(52): 22425-22429.
- Adams J, Wilson N, Hurkmans E, et al. 2019 EULAR points to consider for non-physician health professionals to prevent and manage fragility fractures in adults 50 years or older [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(1): 57-64.
- J A Kanis, N C Harvey, E McCloskey, et al. Algorithm for the management of patients at low, high and very high risk of osteoporotic fractures [J]. *Osteoporos Int*, 2011, 21(1): 1-12.
- Zhe Wang, Yili Zhao, Yu Luo, et al. Electrospun attapulgite-doped poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Control Release*, 2015, 213: 247.
- Hongdong Chen, Yeyang Wang, Huaqian Dai, et al. Bone and plasma citrate is reduced in osteoporosis [J]. *Bone*, 2018, 114: 189-197.
- Renty B Franklin, Meena Chellaiah, Jing Zou, et al. Evidence that osteoblasts are specialized citrate-producing cells that provide the citrate for incorporation into the structure of bone [J]. *Open Bone J*, 2014, 6: 1-7.
- Dickens F. The citric acid content of animal tissues, with reference to its occurrence in bone and tumour [J]. *Biochem J*, 1941, 35(8/9): 1011-1023.
- Seifter E, Lavine LS. Aspects of citric acid chemistry related to bone

- [J]. Bull N Y Acad Med, 1961, 37(3): 156-166.
- 20 Dixon TF, Perkins HR. Citric acid and bone metabolism [J]. Biochem J, 1952, 52(2): 260-265.
- 21 Hamm LL. Renal handling of citrate [J]. Kidney Int, 1990, 38(4): 728-735.
- 22 Cooper JF, Farid I. The role of citric acid in the physiology of the prostate. A chromatographic study of citric acid cycle intermediates in benign and malignant prostatic tissue [J]. J Surg Res, 1963, 3(63): 112-121.
- 23 M Johnsson, C F Richardson, J D Sallis, et al. Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite [J]. Calcif Tissue Int, 49(2): 134-137.
- 24 Erika Davies, Karin H Müller, Wai Ching Wong, et al. Citrate bridges between mineral platelets in bone [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(14): E1354-E1363.
- 25 Donatella Granchi, Nicola Baldini, Fabio Massimo Olivieri, et al. Role of citrate in pathophysiology and medical management of bone diseases [J]. Nutrients, 2019, 11(11): 2516.
- 26 Ying Guo, Richard T Tran, Denghui Xie, et al. Citrate-based biphasic scaffolds for the repair of large segmental bone defects [J]. J Biomed Mater Res A, 2015, 103(2): 772-781.
- 27 Leslie C Costello, Renty B Franklin. Plasma Citrate Homeostasis: How It Is Regulated; And Its Physiological and Clinical Implications [J]. HSOA J Hum Endocrinol, 2016, 1(1): 005.
- 28 Wacili Da , Lin Tao, Kaicheng Wen, et al. Protective role of melatonin against postmenopausal bone loss via enhancement of citrate secretion from osteoblasts [J]. 2020: 00667.
- 29 Costello LC, Chellaiah MA, Zou J, et al. In vitro BMP2 stimulation of osteoblast citrate production in concert with mineralized bone nodule formation [J]. J Regen Med Tissue Eng, 2015,0(4):1.
- 30 Binu SJ, Sudhakaran PR. Metabolite control of angiogenesis:angiogenic effect of citrate [J]. J Physiol Biochem , 2013, 69(3): 383-395.
- 31 Tran RT, Yang J. Synthesis and characterization of biomimetic citrate-based biodegradable composites [J]. J Biomed Mater Res A , 2014, 102(8): 2521-2532.
- 32 Costello LC, Franklin RB. A review of the important central role of altered citrate metabolism during the process of stem cell differentiation [J]. J Regen Med Tissue Eng, 2013, 0 (2): 1.
- 33 Rharass T, Lucas S. Mechanisms in endocrinology: bone marrow adiposity and bone,a bad romance? [J]. Eur J Endocrinol , 2018, 179(4): R165-R182.
- 34 Xie B, Nancollas GH. How to control the size and morphology of apatite nanocrystals in bone [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (52): 22369-22370.
- 35 Lemma S, Sboarina M, Porporato PE, et al. Energy metabolism in osteoclast formation and activity [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 0 (79): 168-180.
- 36 Kim JM, Min BM. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation [J]. Cell Physiol Biochem , 2007, 20(6): 935-946.
- 37 Iacobazzi V, Infantino V. Citrate--new functions for an old metabolite [J]. Biol Chem, 2014, 395(4): 387-399.
- 38 Icard P, Fournel L, Alifano M, et al. Extracellular citrate and cancer Metabolism-Letter [J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 5176.
- 39 Shao CZ, Tang R. citrate improves collagen mineralization via interface wetting: a physicochemical understanding of biomineralization control [J]. Adv Mater, 2018, 30(8): 201704876.
- 40 Rudman DL, Kutner MH. Hypocitratemia in patients with gastrointestinal malabsorption [J]. N Engl J Med, 1980, 303(12): 657-661.
- 41 Watson JA, Lowenstein JM. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Fatty acid synthesis by a combination of cytoplasm and mitochondria [J]. J Biol Chem, 1970, 245(22): 5993-6002.
- 42 Straub D. Calcium supplementation in clinical practice: a review of forms, doses, and indications [J]. Nutr Clin Pract, 2007, 22(3): 286-296.
- 43 Palermo AM, Falchetti A. Calcium citrate:from biochemistry and physiology to clinical applications [J]. Rev Endocr Metab Disord , 2019, 20(3): 353-364.
- 44 Kenny AM, Raisz LG. Comparison of the effects of Calcium loading with Calcium citrate or Calcium carbonate on bone turnover in postmenopausal women [J]. Osteoporos Int , 2004, 15(4): 290-294.
- 45 Ikeda H, Iida T, Hiramitsu M, et al. Effects of lemon beverage containing citric acid with calcium supplementation on Bone metabolism and mineral density in postmenopausal women: Double-blind 11-month intervention study [J]. J Nutr Metab, 2021, 8824753.
- 46 Thomas SD, Nordin BE. suppression of parathyroid hormone and bone resorption by Calcium carbonate and Calcium citrate in postmenopausal women [J]. Calcif Tissue Int, 2008, 83(2): 81-84.
- 47 Ruml LA, Sakhaee K, Peterson R, et al. The effect of calcium citrate on bone density in the early and mid-postmenopausal period: a randomized placebo-controlled study [J]. Am J Ther,1999, 6(6): 303-11.
- 48 Jehle SN, Krapf R. Effect of Potassium citrate on bone density,microarchitecture,and fracture risk in healthy older adults without osteoporosis:a randomized controlled trial [J]. J Clin Endocrinol Metab , 2013, 98(1): 2012-3099.
- 49 Macdonald HM, Black AJ, Aucott L, et al. Effect of potassium citrate supplementation or increased fruit and vegetable intake on bone metabolism in healthy postmenopausal women: a randomized controlled trial [J]. Am J Clin Nutr, 2008, 88(2): 465-74.
- 50 Marangella MS, Isaia GC. Effects of Potassium citrate supplementation on bone metabolism [J]. Calcif Tissue Int, 2004, 74(4): 330-335.
- 51 Jehle SN, Krapf R. Partial neutralization of the acidogenic Western diet with Potassium citrate increases bone mass in postmenopausal women with osteopenia [J]. J (Basel), 2006, 17(11): 3213-3222.
- 52 Gregory NS, Rodman JS. Potassium citrate decreases bone resorption in postmenopausal women with osteopenia: a randomized, double-blind clinical trial [J]. Endocr Pract, 2015, 21(12): 1380-1386.
- 53 Sellmeyer DE, Sebastian A. Potassium citrate prevents increased urine Calcium excretion and bone resorption induced by a high Sodium chloride diet [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(5): 2008-2012.
- 54 Granchi D, Caudarella R, Ripamonti C, et al. Potassium citrate supplementation decreases the biochemical markers of bone loss in a group of osteopenic women: The results of a randomized, double-blind, placebo- controlled pilot study [J]. Nutrients, 2018,10(9): 1293.
- 55 Karp HJ, Lamberg-Allardt CJ. Acute effects of Calcium carbonate, Calcium citrate and Potassium citrate on markers of Calcium and bone metabolism in young women [J]. Br J Nutr , 2009,102(9): 1341-1347.
- 56 Sakhaee KM, Pak CY. Effects of Potassium alkali and Calcium supplementation on bone turnover in postmenopausal women [J]. J Clin Endocrinol Metab , 2005,90(6): 2004-2451.

- 57 Kwan P. Osteoporosis: from osteoscience to neuroscience and beyond [J]. *Mech Ageing Dev*, 2015, 145: 26-38.
- 58 Wu XD, Tu J. Magnesium Calcium phosphate cement incorporating citrate for vascularized bone regeneration [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(11): 6299-6308.
- 59 Yokoyama AY, Nakasu M. Development of Calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(01): 00221-00226.
- 60 Fukuda NT, Ishikawa K. Effect of citric acid on setting reaction and tissue response to beta- TCP granular cement [J]. *Biomed Mater*, 2017, 12(1): 015027.
- 61 Bohner MP, Lemaître J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a Calcium phosphate cement [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2000, 11(2): 111-116.
- 62 Kiminami K, Konishi T, Mizumoto M, et al. Effects of adding polysaccharides and citric acid into sodium dihydrogen phosphate mixing solution on the material properties of gelatin- hybridized calcium-phosphate cement [J]. *Materials (Basel)*, 2017, 10(8): 0.
- 63 Sarda SF, Planell JA. Kinetic study of citric acid influence on Calcium phosphate bone cements as water-reducing agent [J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61(4): 653-659.
- 64 Wang S, Xu C, Yu S, et al. Citric acid enhances the physical properties, cytocompatibility and osteogenesis of Magnesium Calcium phosphate cement [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2019, 0(94): 42-50.
- 65 Gelli RP, Ridi F. unravelling the effect of citrate on the features and biocompatibility of Magnesium Phosphate-Based bone cements [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(10): 5538-5548.
- 66 Tran RT, Ameer GA. Citrate-Based biomaterials and their applications in regenerative engineering [J]. *Annu Rev Mater Res*, 2015, (45): 277-310.
- 67 Guo J, Kim GB, Shan D, et al. Click chemistry improved wet adhesion strength of mussel-inspired citrate-based antimicrobial bioadhesives [J]. *Biomaterials*, 2016 (112): 275-286.
- 68 Xie DT, Yang J. development of injectable Citrate-Based bioadhesive bone implants [J]. *J Mater Chem B*, 2015, (3): 387-398.
- 69 He Y, Li Q, Ma C, et al. Development of osteopromotive poly(octamethylene citrate glycerophosphate)for enhanced bone regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2019 (93): 180-191.
- 70 Tang JB, Yang J. Fast degradable citrate-based bone scaffold promotes spinal fusion [J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(27): 5569-5576.
- 71 Guo J, Wang W, Hu J, et al. Synthesis and characterization of antibacterial and anti-fungal citrate-based mussel-inspired bioadhesives [J]. *Biomaterials*, 2016 (85): 204-217.
- 72 Perut F, Graziani G, Columbaro M, et al. Citrate supplementation restores the impaired mineralisation resulting from the acidic microenvironment: An in vitro study [J]. *Nutrients*, 2020, 12(12): 3779.

(收稿日期:2021-06-25)

(本文编辑:吕红芝)

张书勤, 张群, 谢登辉. 柠檬酸在骨质疏松疾病中作用的研究进展 [J/CD]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2021, 7(4): 245-251.