

·综述·

整合素与骨重建

柯俐 陈璐璐

从胚胎期到整个一生中,骨形成和骨吸收周而复始,交替进行,这个过程称为骨重建(bone remodeling),它由成骨细胞(OB)和破骨细胞(OC)共同完成。在正常成年人,骨吸收和骨形成处于动态平衡。一旦平衡被破坏,就会导致骨质疏松症等骨病。骨重建的机制十分复杂,目前还不甚明确,但至少部分与整合素(integrin)有关。

1 整合素

1.1 结构:整合素是位于细胞表面、由一个 α 亚单位和一个 β 亚单位共价结合构成的异二聚体跨膜糖蛋白超家族。至少15种 α 亚单位和9种 β 亚单位经不同组合产生二十多种整合素,不同类型的细胞可选择性表达某些整合素而改变其粘附特性。 α 、 β 亚单位都由较长的胞外区、单个跨膜区和通常较短的胞内区三部分组成。胞外区能与细胞外基质(ECM)大分子结合,使细胞粘附于ECM;胞内区则与细胞骨架相互作用,将细胞骨架锚定于胞膜,藉此介导细胞与ECM之间的双向信号传递。一种整合素可以结合一种以上的配体,一种配体也能识别一种以上的整合素。最先被确认的结合位点是纤连蛋白(FN)、玻连蛋白(VN)等分子中的Arg-Gly-Asp(RGD)三肽序列,此三肽序列能被 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 及多种 $\alpha\beta$ 整合素识别。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 还能识别纤维蛋白原的KQAGDV序列, $\alpha_2\beta_1$ 还能结合I型胶原的DGEA序列。另外, α 、 β 亚单位都有二价离子结合区,二价离子是整合素行使功能所必需的,它使得 $\alpha\beta$ 异二聚体稳固^[1]。

1.2 作用:整合素的基本作用是介导粘附,因而参与胚胎发展、肿瘤细胞生长和转移、程序性细胞死亡、止血、骨吸收以及细胞对机械压力的反应等多种生理、病理过程,还可以调节特异性基因的表达^[2]。研究发现整合素只有被其他因子激活后才能发挥强大的粘附作用,这些因子可以是可溶性调节物(激素、细胞因子等),也可以是固相反应物(ECM或其他细胞)^[1]。整合素的信号传递途径尚未完全明了,但已有研究表明局部粘附激酶(FAK)和原癌基因产物c-src在其中扮演了中心角色。整合素激活后最早检测到的反应是蛋白磷酸化,酪氨酸激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶家族在蛋白磷酸化中起了重要作用;整合素激活后还可以触发胞内 Ca^{++} 浓度和pH值升高,并产生大量磷脂代谢产物,从而将信息传递下去^[2]。

2 整合素和骨吸收

2.1 骨吸收过程:大量研究已表明,OC来源于造血干细胞单核-巨噬系。当骨组织的某处在一定时间需重建时,OC前体细胞经血管系统迁移并粘附于吸收部位的矿化骨基质上,融合成多核巨细胞,并发生极化:与骨相对的膜形成皱褶缘(ruffled border),远离骨表面的膜则称为基侧膜(basolateral membrane),皱褶缘与骨表面之间的区域则称缝合区(sealing zone)。缝合区即电镜下所见的清亮区(clear zone),它与骨表面紧密接触构成有利于骨吸收的密闭腔隙,经皱褶缘排出的酸、溶酶体酶、酸性蛋白酶在腔隙中积累以降解骨基质。骨吸收完成时,骨表面形成吸收陷窝。

2.2 OC表面的整合素:不同种属OC的整合

素不完全相同,用不同方法检测同一种属 OC 的整合素也不完全一致。大量研究表明人类 OC 表达 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$,并认为 $\alpha_v\beta_3$ 是 OC 识别骨基质蛋白的主要整合素,而骨桥蛋白(OPN)、骨涎蛋白(BSP)是介导 OC 粘附于骨的主要基质蛋白。OC 前体则主要表达 $\alpha_v\beta_3$,它介导 OC 前体与骨基质的粘附,这是 OC 分化的基础。在分化过程中 $\alpha_v\beta_3$ 逐渐代替 $\alpha_v\beta_1$ 成为成熟 OC 上的优势整合素。大鼠 OC 主要有 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_2\beta_1$,鸟 OC 则表达丰富的 $\alpha_v\beta_3$ 、 β_1 [1]。

2.3 整合素与骨吸收: $\alpha_v\beta_3$ 的抗体或含 RGD 的肽类在体内、外均可抑制骨吸收,提示整合素是骨吸收的必要因子,但它在骨吸收中的确切作用尚不十分清楚。

首先整合素可能参与了 OC 前体细胞的迁移。后者在受到适宜刺激时,粘附于血管壁内皮细胞,然后渗出到骨组织分化为成熟 OC。Formigli 等观察到介导这一粘附的是 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 与 FN 的结合 [3]。Colucci 亦发现 OC 样细胞人巨细胞瘤细胞 GCT 虽能以非整合素依赖的方式粘附到血管基底层的层粘蛋白 LN-2 上,从而促进 OC 前体迁移,但 GCT 与 LN-2 的结合能引起非特异性 FN 分泌和 β_1 在局部的丛集, FN 与 β_1 结合后有助于细胞的有效迁移 [4]。该结果进一步提示了整合素在 OC 迁移中的重要作用。

目前的研究热点是整合素在 OC 与骨基质粘附中的作用,这是 OC 极化并完成骨吸收的必要条件。Ross 等研究证明,骨吸收依赖于 OPN 和/或 BSP 与 $\alpha_v\beta_3$ 的相互作用,而胶原虽然是构成基质的主要蛋白质,而且也有 RGD 序列,但它似乎并未在 OC 介导的骨吸收中发挥作用 [5]。Chenu 等观察到骨钙素(BGP)以不依赖 GRD 的方式促进 OC 粘附,同时 OC 合成并分泌 BSP、FN、OPN,使得 β_1 、 β_3 亚单位群集,然后才以 RGD 依赖的方式促进 OC 极化和骨吸收 [6]。

由于组织制备技术和所用的免疫细胞化学方法不同,对于 $\alpha_v\beta_3$ 是否存在于清亮区有争议,

所以对 $\alpha_v\beta_3$ 作用的诠释也有分歧。Lakkakorpi 等发现 $\alpha_v\beta_3$ 介导的是静息相和迁移相 OC 与骨的接触,但在吸收相 OC, $\alpha_v\beta_3$ 不存在于清亮区,而存在于基侧膜和皱褶缘,因而认为 $\alpha_v\beta_3$ 可能借改变信号传导途径来调整 OC 行为,而不是直接通过粘附实现 [7]。Väänänen 等也认为缝合区的间隙不足 10nm,太狭小而使整合素难以发挥作用 [8],但 Nakamura 等用针对 $\alpha_v\beta_3$ 胞内区的抗体证实了 $\alpha_v\beta_3$ 存在于清亮区,只不过不及基侧膜和皱褶缘丰富。而且用 GRGDS 肽处理后的 OC 能粘附于骨,却不能形成界限清楚的清亮区和皱褶缘,表明二者的发生和随后的骨吸收都离不开整合素-RGD 相互作用 [9]。

整合素还可能影响 OB 和 OC 的相互作用。OB 既能调节前体 OC 的分化,又能调节 OC 功能。这除了与 OB 产生的生长因子有关外,还必须由细胞-细胞接触来实现。Yamate 等报道 OPN 能加强这两种细胞的粘附,该作用可以被含 RGD 的肽抑制,表明整合素与该事件相关联 [10]。

2.4 作用机制:整合素的 α 、 β 链胞内区都很短,缺乏激酶活性或与 G 蛋白作用的典型结构域,但它们含有酪氨酸残基,如果磷酸化就可成为 SH_2 结合区,而 src 有 SH_2 、 SH_3 结构域,因此整合素能通过 src 传递信息。OC 表面存在着丰富的原癌基因产物 pp60^{c-src},src 基因缺陷的鼠 OC 不能形成皱褶缘,提示 src 可能参与了整合素介导的骨吸收。Berry 等用免疫荧光染色证实 OC 表面有高水平的 pp60^{c-src} 结合蛋白 FAK,而 FAK 的激活是由细胞和 ECM 相互作用所触发的细胞内信号途径中早期重要的一步 [11]。

另一方面,Hruska 等曾报道 OPN 与 $\alpha_v\beta_3$ 结合后,磷酸肌醇的磷酸化产物增多,导致胞内 Ca^{++} 浓度改变,通过细胞骨架重排刺激骨吸收。该产物增多是磷酸肌醇 3-羟激酶(PtdIns3-OH 激酶)活化所致。FAK 和 c-src 可能是整合素和 PtdIns3-OH 激酶之间的作用环节 [12]。

整合素的作用还与 Ca^{++} 有关。Zimolo 等

研究发现 $\alpha_v\beta_3$ 与其配体的结合触发胞内 Ca^{++} 浓度升高,该作用只能由 $\alpha_v\beta_3$ 的配体产生,而不能由其他 ECM 蛋白如胶原、层粘蛋白产生。 $[\text{Ca}^{++}]$ 升高对皱褶缘膜蛋白运输及蛋白酶的靶向分泌起调节作用,升高的机制与 1,4,5 三磷酸肌醇或 cADP 核糖有关^[13]。

此外,细胞外 Ca^{++} 能降低 OPN 与 $\alpha_v\beta_3$ 的亲和力,从而抑制 OC 粘附到 ECM。其机制可能有两点:① Ca^{++} 与含 RGD 的肽竞争结合 β_3 亚单位的同一结构域;② Ca^{++} 与 OPN 上 Ca^{++} 结合位点结合,改变 OPN 构象,隐蔽其 RGD 序列。该现象有很大意义,因为 OC 吸收骨质时释钙,微环境中 $[\text{Ca}^{++}]$ 上升,从而抑制 OPN 与 $\alpha_v\beta_3$ 结合,导致骨吸收活动的终止^[14]。

2.5 OC 整合素基因的表达及调控:现已证实 OC 有 $\alpha_v\beta_3$ mRNA 表达,而且通过人 OC cDNA 文库已成功克隆了 $\alpha_v\beta_3$ 基因。最近鸟 β_3 基因的启动子也已克隆,它含有 VitD 反应元件 (VDRE),因而其转录能被 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 调节。许多研究发现, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 能提高 OC 前体 $\alpha_v\beta_3$ mRNA 水平及蛋白水平,增加 $\alpha_v\beta_3$ 含量^[15],该作用能被雌激素加强。视黄醛酸也促进 β_3 转录而增加 $\alpha_v\beta_3$ 表达,但对 α_v 基因无影响。

许多细胞因子也可调节 $\alpha_v\beta_3$ 的表达。Kitazawa 等发现 IL-6、TNF-2、GM-CSF 均能促进 β_3 表达;IL-4 对 α_v mRNA 无影响,但能提高 β_3 mRNA 水平,并促进 $\alpha_v\beta_3$ 与 VN 结合,但不改变 $\alpha_v\beta_3$ 与 FN 的粘附;IL-1、IL-3、TNF- γ 、hTGF- β_2 则无此作用^[16]。

3 整合素和骨形成

3.1 骨形成:骨吸收完成后,间充质来源的 OB 在陷窝表面相继出现,并增殖、分化、合成骨基质。随后羟磷酸盐沉积,骨基质发生矿化。骨形成完成后 OB 被类骨质包埋,成为分化终末的骨细胞。

3.2 OB 上整合素的分布:正常人骨组织表达 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$,而体外培养的人 OB 则表达 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 仅在培养中出

现,而不见于原位^[17]。胎鼠颅骨及处于各分化阶段的培养 OB 均表达 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 在整个分化阶段较为恒定, $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 却在矿化时期水平下降^[20]。

3.3 整合素与骨形成:人们早已发现 GRGDSPK 肽能抑制骨形成,提示骨形成和整合素有关,但对二者关系的研究不够广泛和深入。目前已发现胶原和 FN 对 OB 分化有重大影响,很可能通过整合素来实现。Lynch 等首先观察到 I 型胶原与整合素的相互作用使 OB 在增殖期高表达的 FN、 $\alpha_v\beta_1$ 、actin 下调,而在增殖后期高表达的 BGP、OPN 提前表达且水平升高,同时 ALP 活性增高但其 mRNA 水平下降并且矿化加速。但信号如何从 ECM 传至细胞骨架然后到核来影响分化相关基因的表达,其确切机制还需进一步研究^[18]。Takeuchi 等则发现整合素参与了 TGF- β 对 OB 的作用。TGF- β 能刺激基质蛋白包括 I 型胶原、FN 的合成,从而促进骨形成;另一方面也抑制 OB 表达 ALP、BGP。而在 TGF- β 刺激下合成的 I 型胶原以其 DGEA 结构域与 OB 表面 $\alpha_2\beta_1$ 结合,能下调 TGF- β 受体,从而逃逸 TGF- β 对 OB 分化的抑制作用,使 ALP 水平升高,而基质合成受抑^[19]。Moursi 等认为,与胶原不同,FN 以其中中央细胞结合区(含 RGD 序列)与 OB 上 $\alpha_5\beta_1$ 的结合能促进 ALP、BGP 的表达,并为骨小结的形成提供必需的调节信号。FN 还借与整合素的相互作用增强 TGF- β 家族的表达以影响 OB 分化^[20]。

整合素还参与骨基质矿化。Ganta 等曾报道,减少培养液中 VitC 的浓度,会使胶原纤维结构异常,不能被 OB 整合素识别,整合素因而下调,细胞粘附力下降,而 OB 与 ECM 的粘附是骨形成的必要条件,所以最终导致矿化障碍^[21]。糖皮质激素也能通过降低 β_1 mRNA 水平抑制 OB 与 ECM 的粘附,并经整合素触发的第二信使改变 OB 形态及骨组织结构,最终抑制骨形成,提示整合素在糖皮质激素诱导的骨质疏松症中起作用^[22]。

4 应用展望

随着对整合素与 ECM 间分子作用机制研究的深入,人们有可能设计出新型药物治疗代谢性骨病。含 RGD 序列的蝥蛇毒素抑制骨吸收的作用使其成为治疗几种代谢性骨病的候选药物,它能用于治疗骨质疏松症及相关疾病、对抗皮质激素诱导的骨丢失,还能抑制骨转移瘤的生长及相关骨丢失。另一种小分子量、非生物降解的 RGD 类似物 SC56631 预防骨质疏松症 $\alpha_v\beta_3$ 的作用与雌激素一样有效。而单抗 10C4. 1. 3 能识别人类 OC 上的独特抗原决定簇,这种特异性使其有望成为副作用小、效果显著的抗骨吸收药物。另一方面,因为 FAK 和 c-src 在整合素介导的骨吸收中起重要作用,抑制它们基因表达和磷酸化的药物可能成为治疗骨丢失的新途径。整合素在骨形成中的作用也有助于研制出增加骨量、对抗骨丢失的新措施,这些都有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J Endocrinol*, 1997, 154: s47.
- 2 Clark EA, Brugge JS. Integrin and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 1995, 268: 233.
- 3 Formigli L, Orlandini SZ, Benvenuti S, et al. *In vitro* structural and functional relationships between preosteoclastic and bone endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors. *J Cell Physiol*, 1995, 162: 199.
- 4 Colucci S, Glannell G, Grano M, et al. Human osteoclast-like cells selectively recognize laminin isoforms, an event that induces migration and activates Ca^{++} mediated signals. *J Cell Sci*, 1996, 109: 1527.
- 5 Ross FP, Chappel J, Alvarez JL, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, 1993, 268: 9901.
- 6 Chenu C, Colucci S, Grano M, et al. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol*, 1994, 127: 1149.
- 7 Lakkakorpi PT, Helfrich MH, Horton MA, et al. Spatial organization of microfilaments and vitronectin receptor, $\alpha_v\beta_3$, in osteoclasts. *J Cell Sci*, 1993, 104: 663.
- 8 Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci*, 1995, 108: 2729.
- 9 Nakamura I, Gailit J, Sasaki T. Osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ is present in the clear zone and contributes to cellular polarization. *Cell Tissue Res*, 1996, 286: 507.
- 10 Yamate T, Mochizuki H, Taguchi Y, et al. Osteopontin expression by osteoclast and osteoblast progenitors in the murine bone marrow: demonstration of its requirement for osteoclastogenesis and its increase after ovariectomy. *Endocrinology*, 1997, 138: 3047.
- 11 Berry V, Rathod H, Pulman LB, et al. Immunofluorescent evidence for the abundance of focal adhesion kinase in the human and avian osteoclasts and its down regulation by calcitonin. *J Endocrinol*, 1994, 141: R11.
- 12 Hruska KA, Rolnick F, Huskey M, et al. Engagement of the osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ by osteopontin stimulates phosphatidylinositol 3-hydroxyl kinase activity. *Endocrinology*, 1995, 136: 2984.
- 13 Zimolo Z, Wesolowski G, Tanaka H, et al. Soluble $\alpha_v\beta_3$ -integrin ligand raise $[Ca^{++}]_i$ in rat osteoclasts and mouse-derived osteoclast-like cells. *Am J Physiol*, 1994, 266: c376.
- 14 Hu DD, Hoyer JR, Smith JW. Ca^{++} suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin $\alpha_v\beta_3$. *J Biol Chem*, 1995, 270: 9917.
- 15 Mimura H, Cao X, Ross FP, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D_3 transcriptionally activates the β_3 -integrin subunit gene in avian osteoclast precursors. *Endocrinology*, 1994, 134: 1061.
- 16 Kitazawa S, Ross FP, Mchugh K, et al. Interleukin-4 induces expression of the integrin $\alpha_v\beta_3$ via transactivation of the β_3 gene. *J Biol Chem*, 1995, 270: 4115.
- 17 Moursi AM, Gobus RK, Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation *in vitro*. *J Cell Sci*, 1997, 110: 2187.
- 18 Lynch MP, Stein JL, Stein GS, et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblast: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res*, 1995, 216: 35. (下转第15页)

各异,如圆形、月牙形、扇形和其他不规则形态。

3 讨论

本文通过体外培养 GCT,观察到只有 FSTC 可反复传代,而 OLC 及 MSTC 无增殖能力。该结果支持了以往的观点,即 FSTC 是 GCT 中的肿瘤成分,而 OLC 与 MSTC 是非肿瘤性细胞^[3,5]。组织学观察到 OLC 和 MSTC 大多围绕血管周围,也提示 MSTC 和 OLC 可能是由于肿瘤组织中分泌的某种趋化剂,使两者经循环系统进入瘤组织,说明 MSTC 和 OLC 是反应性细胞,是非肿瘤成分。

国内、外许多资料表明 GCT 中主要分三类细胞,一类是肿瘤的实质成分即 FSTC,另外两类与肿瘤免疫机制相关,即 OLC 及 MSTC。关于 OLC 及 MSTC 的来源及性质文献中尚有争议。多数报道认为^[6,8],MSTC 在形态和超微结构上与 OLC 部分相似,经传代培养皆不能长期存活,两者都具有巨噬细胞的特点,如耐胰蛋白酶作用、NSE 阳性和能与抗巨噬细胞的单克隆抗体结合等,说明 OLC 与 MSTC 可能来源于同一种细胞系,并且 MSTC 可能是 OLC 的前体细胞。本研究观察到的 OLC 与 MSTC 的胞浆宽,都无增殖能力,耐胰酶以及围绕血管周围分布等相似特点与文献报道的一致。

GCT 中含有大量的 OLC,一些研究表明 OLC 具有破骨细胞的特点,如具有降钙素受体,抗酒石酸酸性磷酸酶阳性,体外骨吸收功能以及具有皱褶缘结构等。本研究观察到其形态

与破骨细胞的许多相似之处,如多核、多空泡、多伪足、多形态等。因而,对研究 GCT 病理特点和破骨细胞生物学将有明显的意义。

本文通过比较三种分离培养 OLC 的方法表明:①酶消化法提纯程度较高,收集量较多。②机械分离法纯化程度居中,时间长短不便掌握。由于操作简单,对一些要求纯化程度不高的研究如原位杂交、免疫组化和骨吸收功能检测等,也同样具有一定的应用价值。③组织块培养法需要时间长,各细胞成分混杂,对研究各细胞成分之间的关系,以及三者分化发育过程,有一定帮助。

参 考 文 献

- 1 冯传汉,蔡玉辉,张嘉庆,等.骨巨细胞瘤体外培养观察.北京医学院学报,1980,12,(1),1-5.
- 2 张嘉庆,蒋化龙,冯传汉,等.骨巨细胞瘤体外培养观察.北京医学院学报,1980,12,(1)7-9.
- 3 Ishii S, et al. Intern Orthop. 1978, 2; 77.
- 4 Bayer VS, et al. Quantitative immunofluorescence studies of the tumour antigen-bearing cell in giant cell tumour of bone and osteogenic sarcoma. Cancer Res. 1975, 35; 2520.
- 5 冯传汉,张嘉庆,蔡玉辉.骨巨细胞瘤长期体外培养观察.北京医学院报,1980,12(2),79-81.
- 6 Lu Ping. Cytological observation on giant cell tumour of bone. Chin Med J, 1984, 97; 411.
- 7 卢平,张嘉庆,冯传汉,等.骨巨细胞瘤的巨噬细胞.中华外科杂志,1985,23(5),269-272.
- 8 郭卫,冯传汉,许万鹏.骨巨细胞瘤的多核巨细胞.中华骨科杂志,1994,11; 679-681.
- 19 Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. J Biol Chem, 1996, 271; 3938.
- 20 Moursi AM, Damsky CH, Cull J, et al. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. J Cell Sci, 1996, 109; 1369.
- 21 Ganta DR, McCarthy M, Gronowicz GA. Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. Endocrinology, 1997, 138; 3606.
- 22 Doherty WJ, Derome ME, McCarthy MB, et al. The effect of glucocorticoids on osteoblast function. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77; 396.

(上接第82页)