

· 综述 ·

破骨细胞分化因子及生成抑制因子

黄琳 郑绍豪 丘钜世

破骨细胞来源于骨髓中的单核-巨噬细胞克隆形成单位(GM-CFU)^[1,2]。破骨细胞的分化和/或其功能的改变所导致骨改建平衡状态的失控,是多种代谢性骨病如骨质疏松症、骨硬化症、Paget's 骨病等形成的病理基础。目前已经证实多种钙调节激素和局部因子,如活性维生素 D₃ [1, 25 (OH)₂D₃], 甲状旁腺激素(PTH)、前列腺素(PGE₂), 白介素 IL-6、IL-11 等, 不仅能促进破骨细胞的生成(osteoclastogenesis), 而且可以调控破骨细胞极化状态(Polarisation)的转化过程。值得指出的是, 这些因子主要作用于成骨/基质细胞, 从而间接地调控破骨细胞的形成及功能^[3]。前破骨细胞与成骨/基质细胞的直接接触和相互作用是诱导破骨细胞形成的必要条件, 但其确切的分子机制直到近期才有所明了。新近发现的“破骨细胞分化因子”(osteoclast differentiation factor, ODF)被认为是介导各种刺激因子诱导破骨细胞生成及功能信号传导的最终因子, 为阐明激素调节破骨细胞分化及功能的分子机制提供了新的依据。

1 破骨细胞生成抑制因子(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)

破骨细胞生成抑制因子 OCIF 最先由 Tsuda E 等^[4]从人胚胎肺纤维母细胞细胞株 IMR-90 的条件培养基中分离出来, 能特异性

抑制体外破骨细胞的形成, 因此命名为破骨细胞生成抑制因子(OCIF)。几乎与此同时, Simonet WS 等^[5]在测序胎鼠小肠 cDNA 文库时发现了一种新的肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员, 根据其具有降低破骨细胞分化和增加骨密度的功能而命名为护骨因子(osteoprotegenin, OPG), 意思为保护骨(Protect bone)。DNA 测序分析证明了 OCIF 与 OPG 由同一基因编码^[6]。

OPG/OCIF 是一种含有 401 个氨基酸残基的分泌型糖蛋白, 其 N-端一半的序列与 TNF 受体(TNFR)超家族的成员具有高度的保守性, 尤其与 TNFR-2 和 CD40 相似, 而其 C-端序列未发现与任何已知的蛋白具有同源性。与其它已知的 TNFR 分子不同的是, OPG/OCIF 没有疏水跨膜区的编码序列, 因而通常以分泌型的形式组成一种分子量约为 110kD 的二聚体存在于细胞外基质中。

OPG/OCIF mRNA 表达于人的多种组织器官, 如肺、心、肾和胎盘, 在小鼠肝脏、肺、心、肾等组织中也有高水平表达。原位杂交结果显示 OPG 基因转录产物高度表达于胚胎鼠发育骨组织的软骨原基周围, 提示它的分布与其在骨骼发育中的作用相一致。重组 OPG 可以特异性抑制体外培养系中破骨细胞的形成, 并且可以刺激正常鼠骨总体积的增加和改善去势鼠的骨量丢失。OPG 过量表达的转基因鼠中其成熟破骨细胞的数量明显减少, 而骨密度则显著增加。然而与其它骨质硬化症的小鼠模型相比, 这些转基因鼠中前破骨细胞的数量正常, 骨骼的大小和形状也无缺陷, 小鼠出牙无异常, 提示 OPG 可能主要作用于破骨细胞分化的末期

作者单位: 510089 广州, 中山医科大学病理教研室(黄琳、丘钜世); Department of Orthopaedic Surgery, The University of Western Australia, WA6009(郑绍豪)

阶段,通过阻断成骨细胞激活破骨细胞分化的功能而导致骨质硬化。与此相反,OPG 基因缺陷的小鼠则表现出由于破骨细胞动员和激活亢进而引起的骨吸收增加,造成严重的骨密度减低,类似人的骨质疏松症,骨质表现出严重的多孔性,脆性和易骨折性^[7]。进一步有证据表明 OPG/OCIF 还能抑制成熟破骨细胞的存活^[8]和成熟破骨细胞的骨吸收活性^[9]。以上资料表明,新近发现的 OPG/OCIF 是破骨细胞分化和功能的生理性抑制因子,在维持骨吸收和骨形成的平衡方面起到重要的调节作用。

2 破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)的发现及生物学特征

随着 OPG/OCIF 的发现及研究,Lacey DL 等^[10]推测 OPG 可能通过中和一种属于 TNF 家族成员的“破骨细胞发育刺激因子”的作用从而抑制破骨细胞的分化,因而进一步克隆出 OPG 的配位基(osteoprotegenin ligand, OPGL),并证实其在体外能诱导破骨细胞的形成,在体内能促进破骨细胞性骨吸收。与此同时,Yasuda H 等^[8]研究发现体外共培养小鼠骨髓基质细胞株 ST₂ 细胞和脾细胞诱导破骨细胞形成时,OCIF 为可以特异性结合到经 1,25(OH)₂D₃ 和地塞米松(Dex)刺激后的 ST₂ 细胞表面,这种被结合的 ST₂ 细胞丧失了支持破骨细胞形成的能力,其表面与 OCIF 结合的是一种分子量为 40kDa 的膜结合蛋白,符合以前假设的破骨细胞分化因子(ODF)的生物学特征,并证实这种 OPG/OCIF 结合蛋白即为 OPGL^[11]。

人的 ODF/OPGL 基因最先从人淋巴结的 cDNA 文库中克隆出来,它编码一种具有 317 个氨基酸残基的多肽,与小鼠 OPGL 基因(编码 316 个氨基酸)具有 87% 的同源性。ODF 同时也在 T 细胞中被克隆出来,并被命名为 TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine)^[12]或 RANKL(ligand of receptor activator of NF- κ B)^[13]。TRANCE/RANKL 可

由激活的 T 细胞释放(在 B 细胞无表达),通过与其相应受体 RANK 的相互作用,激活转录因子 NF- κ B (nuclear factor κ B),从而增强 T 细胞和树突状细胞(dendritic cells)的相互作用,促进树突状细胞的生存并加强其在混合性淋巴细胞反应中激活 naive T 细胞的功能。此外,ODF 与诱导凋亡的细胞因子 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)/APO-2L^[14,15] cDNA 序列具有 34% 同源性,提示 ODF 与细胞的凋亡也密切相关。

ODF/OPGL 是 TNF 家族的一员,属于 I 型跨膜蛋白,有一段较短的 N-端的细胞内区域和一段较长的 C-端细胞外区域。C-端细胞外区包括了从亮氨酸(leucine 70)至甘氨酸(glycine 157)的一段 stalk 区域和从赖氨酸(lysine 158)至 C-末端的活性配基区域,后者与 TNF 相关蛋白具有高度同源性。其氨基酸 49 至 60 之间的序列编码了疏水性的跨膜区,因而决定了 ODF/OPGL 可以膜结合的形式或以分子量为 31kDa 的可溶性形式存在。

ODF/OPGL 在类淋巴样组织如淋巴结、胸腺、骨髓、脾等有高度表达,在心、胎盘、骨骼肌、胃和甲状腺等非淋巴样组织仅有低度表达^[10,12,14]。在发育的骨骼中,ODF/OPGL 由软骨原基周围的间充质细胞合成,分布于肥大的软骨以及骨化或骨改建的部位,见于小梁骨的周围。ODF/OPGL 在体外也可由被激活的、具有诱导破骨细胞分化潜能的成骨/基质细胞株如 MC3T3、ST2 产生。ODF/OPGL 在骨骼系统中表达和分布的形式提示了其在局部骨代谢中的作用。

3 破骨细胞分化因子(ODF)的生理功能

与已知的大多数钙调节因子相比,ODF/OPGL 可能是唯一能够直接诱导破骨细胞分化和功能的细胞因子。其它钙调节因子诱导破骨细胞分化的作用可能都是通过激活 ODF 所产生的^[11,16]。

在小鼠骨髓/脾细胞和成骨/基质细胞体外

共培养系统中, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 Dex 等钙调节因子可激活成骨/基质细胞生成大量的巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF), 后者作用于前破骨细胞, 从而诱导这些细胞的增殖和分化。M-CSF 已被证实是破骨细胞生成的必要条件^[13]。新近的研究发现, 在这一培养体系中如加入可溶性小鼠 OPGL 衍生物, 可不需要 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 Dex 的作用就能诱导破骨细胞的生成^[10,11]; 如果 OPGL 和 M-CSF 协同作用, 在不需要成骨/基质细胞的情况下可直接诱导人和小鼠体外破骨细胞的形成^[10,17,18]。此外, Lacey DL 等^[10]在实验中还观察到, 经 M-CSF 诱导的骨髓培养细胞中可形成大量能被 OPGL 结合的细胞, 这些细胞形态类似前破骨细胞, 体外可经诱导形成具有吸收功能的成熟破骨细胞。以上结果提示, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 Dex 等钙调节因子可能通过诱导成骨/基质细胞合成 M-CSF 和 OPGL 两种因子, 前者能促进前破骨细胞表面 OPGL 受体的表达, OPGL 与其受体的相互作用介导了成骨/基质细胞与前破骨细胞的直接接触, 促进前破骨细胞分化成为破骨细胞。OPG/OCIF 作为 ODF/OPGL 的假活性受体(decoy receptor), 竞争性抑制了 ODF/OPGL 与其受体间的信号传导, 因而导致特异性抑制破骨细胞的生成。

ODF/OPGL 除了能诱导破骨细胞形成外, 还可直接激活成熟破骨细胞的骨吸收活性^[10,19]。OPGL 能显著增强体外分离的新生大鼠破骨细胞的吸收功能; 小鼠体内注射重组

OPGL 可引起胫骨近端骨体积减少, 成熟破骨细胞大小和核数量增加。抗 ODF 的多克隆抗体抑制 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、 PGE_2 和 IL- α 体外诱导的骨质吸收, 进一步证实了 ODF 能介导这些因子诱导骨吸收的信号传导^[19]。

ODF/OPGL 对破骨细胞分化及功能的影响是通过膜受体的激活而产生的。依据 ODF/OPGL 与 TRANCE/RANKL 的一致性, 推测原在 T 细胞表面表达的 TRANCE/RANKL 的相应受体——RANK 是前破骨细胞表面介导 ODF/OPGL 信号传导的膜结合受体。Fuller K 等^[20]研究证实重组 TRANCE 受体(RANK-Fc)在体外可以抑制 ODF/TRANCE 诱导破骨细胞生成的作用。新近 Nakagawa N 等^[21]从小鼠巨噬细胞样前破骨细胞细胞株 C7 中克隆出 ODF 受体(ODFR), 测序证实其与 RANK 由同一基因编码, 进一步肯定了 RANK 作为 ODF 的活性受体在破骨细胞发育过程中的重要作用。

综上所述, ODF/OPGL、OPG/OCIF 和 RANK 可能构成了直接调节破骨细胞分化和功能的基本系统。鉴于目前命名的混乱, 现将这些因子及相关受体的名称列于表 1。诱导破骨细胞生成和功能的系统激素及局部因子通过上调 ODF/OPGL 和/或下调 OPG/OCIF 的基因表达, 从而调控成骨/基质细胞与前破骨细胞和破骨细胞之间的信号传递。骨组织局部微环境中 ODF 和 OPG 表达的相对水平(ODF:OPG)可能是决定破骨细胞形成及活性的关键。

表 1 三种破骨细胞分化相关因子及受体的不同命名

破骨细胞分化因子	osteoclast differentiation factor	(ODF)
	osteoprotegerin ligand	(OPGL)
	ligand of receptor activator of NF- κ B	(RANKL)
	TNF-related activation-induced cytokine	(TRANCE)
破骨细胞生成抑制因子	osteoclastogenesis inhibitory factor	(OCIF)
	osteoprotegerin	(OPG)
破骨细胞分化因子受体	receptor activator of NF- κ B	(RANK)

参 考 文 献

- 1 Zheng MH, Nicholson GC, Warton A, et al. What's new in the osteoclast oncogeny? (Review) *Pathol Res Pract*. 1991, 187:117-125.
- 2 文剑明, 郑铭豪. 破骨细胞的形成、功能及细胞因子的调节. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4:64-68.
- 3 Suda T, Udagawa N, Nakamura I, et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995, 17:87s-91s.
- 4 Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997, 234:137-142.
- 5 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin, a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997, 89:309-319.
- 6 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG), a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*. 1998, 139:1329-1337.
- 7 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998, 12:1260-1268.
- 8 Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 250:229-234.
- 9 Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 251:796-801.
- 10 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998, 93:165-176.
- 11 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95:3597-3602.
- 12 Wong BR, Rho J, Arron J, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*. 1997, 272:25190-25194.
- 13 Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997, 390:175-179.
- 14 Wiley SD, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995, 3:673-682.
- 15 Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*. 1996, 271:12687-12690.
- 16 Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, et al. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology*. 1998, 139:4743-4746.
- 17 Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 246:199-204.
- 18 Juhan MW, Quinn, Elliott J, Gillespie MT, et al. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation *in vitro*. *Endocrinology*. 1998, 139:4424-4427.
- 19 Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 246:337-341.
- 20 Fuller K, Wong B, Fox S, et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*. 1998, 188:997-1001.
- 21 Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 253:395-400.
- 22 Iotsova V, Caamano J, Loy J, et al. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappa B₁ and NF-kappa B₂. *Nature Med*. 1997, 3:1285-1289.
- 23 Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1998, 273:14363-14367.