

成骨细胞骨形成机制研究进展

童安莉 陈璐璐 丁桂芝

骨不断地进行着重建,骨重建过程包括破骨细胞贴附在旧骨区域,分泌酸性物质溶解矿物质,分泌蛋白酶消化骨基质,形成骨吸收陷窝;其后,成骨细胞移行至被吸收部位,分泌骨基质,骨基质矿化而形成新骨。破骨与成骨过程的平衡是维持正常骨量的关键。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。目前,随着研究的不断深入,在骨形成过程中,成骨细胞发展及其调控的分子机制也逐渐得以揭示。

1 成骨细胞的起源

成骨细胞起源于多能的骨髓基质的间质细胞,除成骨细胞外,基质细胞还可分化成软骨细胞,成纤维细胞,脂肪细胞或肌细胞。成骨细胞来源谱系有以下几种:(1)骨髓克隆形成单位(成纤维细胞集落形成单位,CFU-F);(2)骨祖细胞,可分化成前成骨细胞和前软骨细胞谱系,常位于骨髓腔中,有很强的自身增殖能力;(3)前成骨细胞,即最近的成骨前体,能定向分化成成骨细胞,具有合成和增殖能力^[1,2]。成骨细胞由多能的间质干细胞在体内的各种调控因素的调节下发展而来,调控因素主要有 BMP-2, BMP-2能诱导基质细胞向成骨细胞分化,具体就是诱导间质干细胞分化形成骨祖细胞进而形成前成骨细胞^[3]。

2 成骨细胞发展阶段及骨形成机制

成骨细胞在骨形成过程中要经历成骨细胞增殖,细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和成骨

细胞凋亡四个阶段。很多因素可调节这几个阶段,从而最终调控骨形成。

成骨细胞增殖期成骨细胞数量增加,以形成多层细胞,并合成、分泌 I 型胶原以便最终可以矿化形成骨结节。对成骨细胞增殖的调控具体说来即是对细胞周期的调控,后者包括细胞在有丝分裂原作用下复制 DNA 和细胞分裂的调节机制,典型的成骨细胞细胞周期时间为 20~24 小时^[4]。抑制与细胞周期调节相关的基因会导致增殖的停止。与增殖激活有关的基因有 c-myc、c-fos、c-jun;与细胞周期有关的基因有组蛋白、细胞周期素基因。在颅盖骨成骨细胞培养中观察到细胞从颅盖骨中分离后很快即出现最高水平的 c-fos mRNA 表达,比 c-myc 和 H4 组蛋白基因表达早许多。c-myc mRNA 常在 1 天后表达达到高峰,H4 组蛋白基因表达伴随细胞内 DNA 合成,与增殖密切相关^[5]。c-fos、c-jun 基因表达在增殖晚期明显下调,同时伴随成骨细胞增殖减慢,细胞由增殖期进入分化期。c-fos 对成骨细胞增殖的作用在体内实验中也得到证实,如在人的长骨与胚胎骨生长旺盛的区域 c-fos 原癌基因高表达。另有报道,c-fos 高表达的小鼠中骨形成也会增加,这些均证明 c-fos 与成骨细胞增殖有关。而且 c-fos 与 c-jun 编码的蛋白质 c-fos、C-jun 能形成异二聚体,作为转录因子结合到基因启动子区的 AP-1 位点,已观察到在增殖的成骨细胞中有很高的 AP-1 结合活性,而在增殖下调后,这种高活性也明显改变,这说明原癌基因可能通过 c-fos/c-jun 复合物来调节细胞增殖^[3]。在成骨细胞增殖期,同时还能表达的基因有表皮生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、转化生长因子 β (TGF β)、I 型胶原、纤维连接素(fibronectin)

等基因^[6]。

在细胞增殖晚期,与细胞周期与细胞增殖相关的基因表达下降,而编码细胞外基质成熟的蛋白的基因开始表达,在分化早期主要是碱性磷酸酶表达,因此碱性磷酸酶被认为是细胞外基质成熟的早期标志,AKP mRNA 表达此时可增加10倍以上。有学者用羟基脲抑制成骨细胞增殖,加入羟基脲1小时后观察到 DNA 合成和 H4组蛋白 mRNA 下降90%,与此同时,AKP mRNA 增加4倍,证明增殖下调可提前诱导 AKPmRNA 表达^[5-7]。成骨细胞分泌 AKP 和钙盐结晶至细胞外基质中,AKP 使局部磷酸含量增高,促使基质矿化。在细胞外基质成熟期,胶原继续合成并相互交联、成熟。

在成骨细胞分化晚期,当培养细胞进入矿化期,细胞内的 AKP 活性下降,而与细胞外基质中羟磷灰石沉积相关的基因表达达到高峰,如骨桥蛋白(osteopontin)、骨钙素、骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein)基因。骨钙素等非胶原蛋白分泌至细胞外基质中,与钙、磷结合,然后,沿胶原分子的长轴,钙和磷结合到胶原分子的侧链的胶原氨基酸残基上,形成羟磷灰石结晶。在用羟基脲抑制增殖的实验中同时可观察到,与 AKP 不同,骨钙素、骨桥蛋白的 mRNA 表达不因增殖抑制而增加,证明它们与增殖无关而可能与矿化基质中成骨细胞分化有关。Owen 在体外实验中进一步观察 β -磷酸甘油(β -GP)对骨钙素产生的影响, β -GP 是羟磷灰石形成的原料,能被 AKP 迅速水解,释放出无机磷。如果培养中没有 β -GP 时,即使细胞通过细胞外基质成熟期进入矿化阶段,骨钙素基因也不能表达,说明在没有矿物质沉积时不能表达矿化阶段的基因^[8]。

体外培养的成骨细胞在骨矿化期骨钙素高度增加,此后,骨钙素逐渐降低,与此同时,可观察到胶原酶增加,成骨细胞开始凋亡,并出现代偿性细胞增殖和胶原合成^[9]。

3 成骨细胞性骨形成的调控机制

成骨细胞在产生、发展的各个阶段均需借

助于精细的调控,以最终完成正常的骨形成。已知很多全身激素和骨组织局部调节因子都对成骨细胞发挥作用并影响成骨细胞发展的各个阶段,调节成骨细胞功能。已知的全身激素如甲状旁腺激素(PTH)、甲状旁腺激素相关肽(PTHrp)、1,25-二羟维生素 D₃ [1,25(OH)₂D₃]、降钙素(CT)、糖皮质激素、生长激素、甲状腺激素、性激素等对骨形成均有影响。而近年来,骨组织局部调节因子对骨形成所起的作用尤受重视。

3.1 胰岛素样生长因子(IGFs)

IGFs 是骨细胞中含量最丰富的生长因子,对成骨细胞功能起重要的调节作用,目前已知的 IGF 主要为 IGF-1 和 IGF-Ⅱ,IGF-1、IGF-Ⅱ 由骨细胞生成并储存于骨中,在骨吸收时从骨中释放出来;成骨细胞在骨吸收时也能分泌增加量的 IGFs,以自分泌方式发挥作用,刺激成骨细胞增殖和分化;另外由破骨细胞产生的 IGFs 以旁分泌方式作用于成骨细胞。因为 IGF 对骨形成有很强的促进作用,因此 IGFs 在骨吸收时大量增加介导了骨吸收和骨形成之间的耦联作用,使骨吸收后骨形成增加^[9],有利于骨重建的正常进行。IGF-1、IGF-Ⅱ 对成骨细胞的作用基本相似,但 IGF-Ⅱ 作用较 IGF-1 弱。IGF-1、Ⅱ 在成骨细胞培养中均可刺激成骨细胞的增殖和 I 型胶原的生成,且与剂量有相关性,同时 IGFs 还可刺激碱性磷酸酶活性以及骨钙素的产生^[10]。离体实验显示 IGF-1、IGF-Ⅱ 促进鼠成骨细胞原癌基因 c-fos 的表达,后者可能在诱导成骨细胞增殖中起重要作用。不仅如此,IGFs 还能介导全身激素如糖皮质激素、PTH、1,25(OH)₂D₃、雌激素及机械压力对成骨细胞增殖和分化的作用。另外 IGFs 与其他生长因子产生协同作用,共同刺激成骨细胞增殖和分化。骨组织中 IGF 受其自身合成,IGF 受体数目及其亲和力、IGFBPs 等调节^[3,11]。TGF β 也能调节 IGF-1 表达,TGF β 增加人成骨细胞 IGF-1 表达,而抑制鼠成骨细胞的 IGF-1 表达。

IGFs 为小蛋白,在血循环中半衰期很短,

IGFs 在体内与胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBPs) 结合后半衰期延长很多。骨组织中共存在6种结构相关的 IGFBPs, IGFBPs 可调节 IGF 作用。骨中 IGFBP1-6除 IGFBP-1外, 其余均由成骨细胞产生, IGFBP-3、IGFBP-5可促进 IGF 对成骨细胞的刺激作用。而其他 IGFBPs 尤其是 IGFBP-4阻止 IGFs 结合到胰岛素样生长因子受体 (IGFR) 上, 抑制 IGF 活性。很多因素可调节 IGFBPs 产生, 从而影响骨形成。骨细胞中, IGFs 能调节 IGFBPs 水平, 使 IGFBP-4 减少而 IGFBP-5 增加。TGF β 减少 IGFBP-4 mRNA 表达, 同时显著增加 IGFBP-4 蛋白分解。在 SaOS-2 细胞系中, PTH 增强 IGFBP-4 的结合活性及抑制 IGFBP-4 蛋白酶活性, 从而对成骨细胞产生抑制作用, 而雌二醇可以消除 PTH 的这些作用。此外, 皮质激素能抑制 IGFBP-5 表达而 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 刺激 IGFBP-4 表达从而二者均抑制成骨细胞增殖^[9, 12]。

3.2 转化生长因子(TGF β)

TGF β 超家族包括 TGF β s, 骨形态蛋白 2-7 (BMPs 2-7), 肌动蛋白 (actin), 抑制素 (inhibitin)。TGF β 合成初期是一种无活性的大分子复合物。骨基质中有大量的无活性 TGF β , 当 pH 降低或纤溶酶及组织蛋白酶激活时, 可使无活性的 TGF β 活化。骨组织中骨吸收区 pH 值较低, 可使 TGF β 活化, 因为 TGF β 对成骨细胞骨形成产生重要影响, 因此 TGF β 可以调节骨吸收区新骨的形成。TGF β 对骨形成作用很复杂。在体外培养中 TGF β 可以抑制或刺激成骨细胞增殖。这些矛盾的结果部分由于各个实验中所使用的 TGF β 浓度, 细胞密度, 细胞来源不同^[13]。TGF β 刺激非转化的成骨细胞 DNA 合成及细胞增殖, 同时, TGF β 诱导 c-fos 原癌基因表达, 而用 c-fos 反义 mRNA 能阻断 TGF β 的致有丝分裂作用, 证明 c-fos 表达在 TGF β 诱导的成骨细胞增殖中有重要意义。目前, 对 TGF β 对成骨细胞分化功能的影响存在不同的结论, 有报道, 在原代成骨细胞培养中, TGF β 抑制 AKP 和骨钙素的合成。但另有学者报道, TGF β 可以明显促进细胞外基质的合成,

刺激胶原、骨连接素 (osteonectin) 和骨桥蛋白合成, 增加骨基质沉积率^[14]。另外, TGF β 1 减少胶原酶转录并加速胶原酶 mRNA 降解, 这有利于维持骨中的胶原基质。在体实验中, 实验动物接受 TGF β 2 系统性治疗能使其小梁骨的形成增加, 并且在鼠股骨骨膜下注射 TGF β 1 和 TGF β 2 也能促使骨发生^[15]。这些均证明 TGF β 对骨形成起重要作用。TGF β 在人骨中的量随年龄增加而下降。体外研究中发现 1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 、E $_2$ 可以增加鼠成骨细胞 TGF β 产量。1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 并能调节 TGF β 受体表达。在人成骨细胞中, 睾酮和 PTH 同样能增加 TGF β 产量, 除此之外, BMP-2 也能增加 TGF β 表达, 而且 TGF β 可自身诱导 TGF β 表达^[9]。

3.3 骨形态蛋白(BMPs)

BMPs 是 TGF β 超家族成员, 具有刺激成骨的作用。BMP 可由成骨细胞产生, 产生的 BMP 主要与骨基质结合, 很少释放到骨外。BMP 的主要生物学作用是诱导未分化的间质细胞分化形成软骨和新生骨, 前面已提到, BMP-2 诱导成骨细胞的前体细胞分化成成骨细胞。在 MC3T3-E1 小鼠成骨样细胞培养中, BMP 能增加 AKP 活性和胶原合成, 但对成骨细胞增殖不起作用^[2]。在鼠骨肉瘤 ROS17/2.8 细胞系培养中, BMP-7 抑制细胞增殖, 而在人成骨细胞培养中, BMP-7 刺激细胞增殖。BMPs 与其他生长因子相互作用, 共同诱导新骨形成, 如 TGF β 、VitD 可使 BMP-2 增加。糖皮质激素促进 BMP-2、BMP-4 对成骨细胞分化的诱导作用并在分化早期促进 BMP-6 合成, BMP-6 在成骨细胞分化早期有重要作用, 它介导糖皮质激素诱导的成骨细胞分化。BMPs 对其他生长因子的影响表现在 BMP-2 增加大鼠成骨细胞 IGF- I、IGF- II, BMP-4 增加单核细胞 TGF β , 而 BMP-7 能增加 IGF- I 型受体的数量和减少 IGFBP-4 的产生及增加 IGFBP-3、-5 的产生。BMPs 通过调节这些生长因子而诱导成骨作用^[9, 16, 17]。

3.4 白细胞介素1(IL-1)

IL-1 由单核巨噬细胞和骨髓基质细胞产

生,可自分泌、旁分泌发挥作用。现已证明,它不仅对破骨细胞性骨吸收有明显促进作用,而且它还能影响成骨细胞性骨形成。IL-1对成骨细胞增殖有促进作用,而它对成骨细胞分化的作用比较复杂,不同的研究结果显示,IL-1可以刺激或抑制胶原合成、AKP活性和骨钙素合成。实验结果的不同是由于实验中所采用成骨细胞培养方法、细胞密度、IL-1剂量和IL-1处理时间、方式的不同^[2]。最近,Shadman用大鼠骨髓基质细胞进行实验,观察到IL-1短暂作用于成骨细胞时,骨结节形成增加且呈剂量依赖性;而IL-1较长时间作用于成骨细胞时可产生双向作用,低剂量增加骨结节形成,而较高剂量对骨结节形成不产生影响或产生抑制作用。不仅如此,IL-1对骨形成的作用也与细胞密度有关,抑制作用只在采用最高的细胞密度接种时出现。在体实验研究表明,间断注射IL-1导致骨吸收的短暂增加,而随后伴随较长时间的骨形成增加^[2,5,18]。

IL-1的产生受全身激素的调控,雌激素能抑制成骨细胞分泌IL-1,而1,25(OH)₂D₃作用于成骨细胞使其产生IL-1增加^[19]。

3.5 肿瘤坏死因子α(TNFα)

TNFα是17KDa的细胞因子,由破骨细胞样细胞及成骨细胞合成。现已证明TNFα可以直接作用于成骨细胞,对其增殖、分化产生影响。TNFα对成骨细胞的作用较复杂,TNFα在非转化的成骨细胞系中能刺激DNA合成,而在大鼠骨肉瘤细胞系(ROS 17/2.8)培养中,TNFα不影响DNA合成或在低剂量时抑制DNA合成。最近,Frost在人成骨细胞(hOBs)培养中发现,TNFα低剂量时刺激成骨细胞增殖,而在高剂量时抑制增殖。现在,学者们在TNFα对成骨细胞分化的作用的研究结果比较统一,均认为TNFα抑制胶原合成、AKP活性和骨钙素合成^[2,19,20]。

TNFα在骨组织中产生的调控也与IL-1有相似之处。E₂可抑制TNFα的产生,而1,25(OH)₂D₃则促进TNFα基因转录,增加TNFα形成^[19]。这些全身激素常通过调控骨组织中的

细胞因子产生从而调节骨形成。

除以上局部因子外,其他因子如表皮生长因子(EGF)、TGFα、血小板源性生长因子(PDGF)及一氧化氮等均对骨形成有明显作用。

参 考 文 献

- 1 Franklin HE. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. *N Engl Med*, 1995,332:305.
- 2 Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. *Pathol Res Pract*, 1992,188:1104.
- 3 Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology*, 1992,130:1318.
- 4 McCabe LR, Last TJ, Lian JB, et al. Expression of cell growth and bone phenotypic genes during the cell cycle of normal diploid osteoblasts and osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*, 1994,56:274.
- 5 Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1990,143:420.
- 6 Jane BJ, Gary SS. Osteoblast biology. In: Robert M, Davd F, Jennifer K, eds. *Osteoporosis*. San Diego, California, U. S. A, Academic Press, 1996. 23-59.
- 7 McCabe LR, Kundu BR, Harrison RJ, et al. Developmental expression and activities of specific *fos* and *jun* proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of *Fra-2* and *jun D* during differentiation. *Endocrinology*, 1996,137:4398.
- 8 Lynch MP, Stein GS, Stein L, et al. Apoptosis during *in vitro* bone formation. *J Bone Miner Res*, 1994,9:S352.
- 9 Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGFβ and BMP. *Bone*, 1996,19:1S.
- 10 Schmid C, Ernst M. Insulin-like growth factors. In: Maxine G, eds. *Cytokines and bone metabolism*. CRC Press, 1992. 229.
- 11 丁桂芝. 类胰岛素生长因子对骨代谢的调节作用. *中国骨质疏松杂志*, 1995,1:73.
- 12 Kanzaki S, Hilliker S, Baylink DJ, et al. Evidence that HBC in culture produce IGFBP-4 and -5 proteases. *Endocrinology*, 1994,134:383.
- 13 Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, et al. Trans-

- forming growth factor- β gene family members and bone. *Endocrine Rev.* 1994,15;27.
- 14 Hock J, Canalis E, Centrella M. Transforming growth factor beta(TGF-beta-1) stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology.* 1990,126;421.
- 15 Rosen D, Miller SC, DeLeon E, et al. Systemic administration of recombinant transforming growth factor beta 2 (rTGF- β 2) stimulates parameters of cancellous bone formation in juvenile and adult rats. *Bone.* 1994,15;355.
- 16 Knutsen R, Honda Y, Strong DC, et al. Regulation of IGF system components by OP-1(Osteogenic Protein-1) in human bone. *Endocrinology.* 1995,136;857.
- 17 Kanzaki S, Baxter RC, Knutsen R, et al. Evidence that HBC in culture secrete IGF- I and IGFBP-3, but not acid-labile subunit both under basal and regulated conditions. *J Bone Miner Res.* 1995,10;854.
- 18 Shadman S. Interleukin-1 α has biphasic effects on bone formation by rat bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 1995,10;T219.
- 19 Roodman GD. Advances in bone biology;the osteoclast. *Endocr Rev.* 1996,17;308.
- 20 Frost A, Jonsson KB, Nission O, et al. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblast. *Acta Orthop Scand.* 1997,68;91.

(上接第9页)

TNF 是十分重要的破骨细胞激活因子,它刺激前祖细胞产生新的破骨细胞,并可间接激活成熟的破骨细胞导致破骨细胞性骨吸收的增强。Zheng 发现绝经后骨质疏松病人外周血中单个核细胞释放的 TNF 明显高于非绝经妇女或雌激素替代治疗绝经妇女^[4]。我们采取直接测定骨匀浆 TNF- α 的方法,发现老年组骨匀浆中 TNF- α 的含量明显高于青年组,TNF- α 含量与骨矿含量呈显著的负相关。Ammann 将转基因高水平表达可溶性 TNF 受体(sTNFR1-FcIgG3)小鼠和对照小鼠切除卵巢,12周后对照小鼠骨量减少,骨转换加快,而转基因小鼠骨代谢无变化,高水平表达的 sTNFR1-FcIgG3 融合蛋白可中和 TNF 生物作用,防止卵巢切除后的骨丢失^[7]。Kitazawa 在小鼠的研究表明,切除卵巢可使骨髓细胞分泌的 IL-1 和 TNF 增加,若体内给予 IL-1ra、TNFbp (TNF 结合蛋白,一种 TNF 的抑制剂),可明显抑制卵巢切除后的骨吸收增强,减少骨髓内破骨细胞样多核细胞的形成^[6]。据此,我们认为骨骼局部 TNF- α 升高,导致破骨细胞性骨吸收增强,造成骨丢失,这可能是骨质疏松发生的机理之一。

参 考 文 献

1 Greenspan SL, Matland LA, Myers ER, et al. Femoral

bone loss progresses with age; a longitudinal study in women over age 65. *J Bone Miner Res.* 1994,9(12);1959-1965.

2 Poli V, Balena R, Fattari E, et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *Eur Mol Biol Organ J.* 1994,13(5);1189-1196.

3 Soutar RL, Dillon JM, Brown D, et al. Cytokine expression in multiple myeloma and monoclonal gammopathy; analysis by reverse transcription/polymerase chain reaction and quantitative PCR. *Leuk Lymphoma.* 1996,24(1~2);111-120.

4 Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas.* 1997,26(1);63-71.

5 Kania DM, Binkley N, Checovich M, et al. Elevated plasma levels of interleukin-6 in postmenopausal women do not correlate with bone density. *J Am Geriatr Soc.* 1995,43(3);236-239.

6 Kitazawa R, Kimble RB, Vannice JL, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest.* 1994,94(6);2397-2406.

7 Ammann P, Rizzoli R, Bonjour J, et al. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest.* 1997,99(7);1699-1703.