

癌基因和抑癌基因在骨代谢中的作用

魏海燕 林华

癌基因和抑癌基因是近年来医学和生物学研究的热点,并取得了重大进展。随着研究的深入,人们认识到癌基因和抑癌基因不仅仅是能导致和抑制癌变的原因,还是机体各种细胞维持正常细胞形态和功能所必不可少的。在骨代谢过程中,癌基因和抑癌基因则通过对成骨细胞和破骨细胞的不同作用而影响着骨代谢。本文将就有关此方面的内容作一综述。

1 癌基因和抑癌基因的概念

癌基因的本质是一段具有促使细胞恶性转化的DNA核苷酸序列。但在正常情况下,细胞癌基因是维持细胞正常功能的重要成分,在控制细胞生长分化中起重要作用。一般将正常细胞中以非激活形式存在的细胞癌基因称为原癌基因。

抑癌基因或抗癌基因是一大类可抑制细胞生长并能潜在抑制癌变作用的基因群。抑癌基因应有抑制细胞生长(对某些组织)的作用,但具有抑制生长作用的基因并不都是抑癌基因,如干扰素、TNF等。凋亡是细胞的程序性死亡,某些癌基因可能有抗凋亡作用,而凋亡基因有抑制细胞生长的作用。广义上讲,凋亡基因也属于抑癌基因。

2 癌基因和抑癌基因在骨代谢中的作用

2.1 c-fos 原癌基因

(1)对骨形成的作用

骨形成的过程即是成骨细胞形成类骨质并

矿化的过程,成骨细胞是骨形成所必不可少的。c-fos 原癌基因对成骨细胞的分化和成熟具有重要作用。Closs 等^[1]研究发现体外培养的静止期软骨细胞中有 c-fos 的高水平表达,在 c-fos 表达之后,软骨细胞中接着有代表成骨细胞分化的基因的表达。并且在培养的第7天,软骨细胞型小囊中可见到具有典型的成骨细胞超微结构特点的细胞,其周围被骨样基质所包裹,提示这些细胞是从软骨细胞中分离出来并向成骨细胞分化。Closs 等认为 c-fos 在成骨细胞分化的调节中起决定性作用。Machwate 等^[2]报道新生小鼠颅骨和股骨的 c-fos mRNA 水平在出生时有一过性的增加。免疫组化分析表明 Fos 蛋白在软骨膜和骨膜的骨母细胞中表达,而在成熟的成骨细胞中却无表达,表明小鼠出生后的一过性的 c-fos 原癌基因表达可能与成骨细胞前体细胞向成熟细胞转化有关。

(2)对骨吸收的作用

骨吸收是由破骨细胞来实现的,破骨细胞的缺乏会导致骨硬化症的发生。分化受阻是造成破骨细胞缺乏的主要原因,而 c-fos 原癌基因也有促进破骨细胞分化的作用。Miyachi 等^[3]将 c-fosDNA 转入破骨细胞前体细胞后3天,转化细胞的抗酒石酸盐酸性磷酸酶(TRAP)及骨吸收活性较对照组提高2倍以上,表明 c-fos 的延长表达可促进破骨细胞的分化。另一方面,有报道表明缺乏 c-fos 原癌基因的小鼠可发生骨硬化症,其破骨细胞完全缺失,造成此缺陷的本质原因有人认为是造血祖细胞分化到破骨细胞早期阶段即无法继续下去^[4],而 Fos 蛋白突变的小鼠其破骨细胞分化受阻,骨髓移植和异位 c-fos 表达可克服此分

化阻滞。另外, Fos 蛋白缺乏可使骨髓中破骨细胞向巨噬细胞转化, 导致巨噬细胞数量增加, 破骨细胞减少, 从而影响骨吸收^[3]。

c-fos 原癌基因还有促进破骨细胞的骨吸收作用。研究表明持续表达 c-fos 原癌基因的 MC₃T₃-E₁ 转化细胞的培养基上清液能促进破骨细胞的骨吸收作用: 在骨吸收区, 由破骨细胞溶骨作用造成的凹陷数目显著高于对照组。表明 c-fos 原癌基因持续表达可释放出体液调节因子以刺激破骨细胞的骨吸收作用^[6]。

(3) 作用机制及其调节

c-fos 和 c-jun 原癌基因的产物形成的二聚体是转录因子 API, 可与基因的转录启动子中的 API 结合位点 (TRE) 相结合而激活一组基因的表达。目前发现在启动子中存在 API 结合位点的基因有骨钙素、胶原酶、神经生长因子等。研究发现正是在 c-fos 原癌基因表达之后才接着有代表成骨细胞分化的基因如骨钙素的表达^[1,2], 表明 c-fos 对基因的调控作用影响着细胞的分化及功能。

c-fos 原癌基因及其产物在细胞内信息传递过程中有重要作用, 一些与骨代谢有关的因子在发挥其作用时需要 c-fos 的存在。转化生长因子 (TGF- β) 诱导成骨细胞生长作用与 c-fos mRNA 的短暂蓄积有关, 而且 TGF- β 的作用在 c-fos 的反义寡聚核苷酸存在时被消除^[7]。c-fos 基因在甲状旁腺激素 (PTH) 和甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHrP) 及糖皮质激素等对骨的细胞的调节中都有重要作用^[8,9]。

c-fos 原癌基因及其产物在发挥其调节作用时同时也受到其他因子的调节及自我调节, 而且这种调节作用是必不可少的, 因为作为原癌基因, 其过度表达可导致骨肉瘤的发生。PTH、糖皮质激素、维生素 D 等对 c-fos 基因的表达有刺激作用, 其中以维生素 D 与 c-fos 之间的相互调节最为奥妙。在 c-fos 启动子中有一维生素 D 反应元件 (VDRE), 维生素 D 受体 (VDR) 复合物与其结合可刺激 c-fos 的转录, 而 c-fos 的产物 Fos 蛋白可与 VDR 复合物结

合形成 Fos-VDR 复合物, 抑制 VDR 复合物与 VDRE 的结合以避免出现过度表达^[10]。

2.2 c-src 癌基因

c-src 是 Bishop 等于 1976 年发现的一个细胞癌基因。c-src 编码分子量为 60kD 的蛋白质, 称为 PP60c-src, 具有酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 活性。

(1) 对骨代谢的作用

c-src 癌基因对骨代谢的作用主要表现为对骨吸收的促进作用。破骨细胞中有高水平的 Src 蛋白表达, 缺乏 c-src 原癌基因的小鼠与缺乏 c-fos 一样也会发生骨硬化症, 但与缺乏 c-fos 不一样的是: 小鼠体内有破骨细胞的存在, 但破骨细胞缺乏骨吸收活性。体外实验证实, 破骨样细胞 (OCLs) 的骨吸收作用可被 c-src 和 c-cbl 的反义寡聚核苷酸所抑制, 而 c-cbl 是 c-src 的下游效应器, 表明 c-src 原癌基因是破骨细胞发挥活性所不可或缺的^[4,11]。

c-src 基因与骨形成的关系尚未见明确报道, 但有研究表明 Src 蛋白的激酶活性的调节在软骨内成骨中可能起重要作用^[12]。

(2) 作用机理

c-src 原癌基因对破骨细胞的作用实际上完全依赖于其编码的 PP60c-src 的活性。由于 c-hrk 也是 c-src 基因族的一员, 其编码的蛋白也具有 TPK 活性, 故 Hck 和 Src 蛋白在破骨细胞中的作用有部分交叉, Hck 在 c-src 完全缺失的破骨细胞中的表达可改善其功能缺陷^[13]。而可抑制 c-src 的选择性酪氨酸蛋白激酶抑制剂可抑制破骨细胞的骨吸收作用也支持此点^[14]。

破骨细胞的激活首先需要其粘附到骨表面, PK2 是与破骨细胞的粘附有关的细胞质激酶, 研究表明 PK2 在破骨细胞中的磷酸化是依赖于 Src 蛋白的, PYK2 依赖于 Src 的酪氨酸磷酸化作用与破骨细胞骨吸收所需的粘附诱导的密封带形成有关^[15]。因此 PP60c-src 蛋白的表达及其酪氨酸蛋白激酶 (TPK) 活性与激活的破骨细胞数目紧密相关, 三者同受到 PTH

的向上调节及CT的向下调节,总是相平行的^[16]。

2.3 其他癌基因

Bcl-1原癌基因有抑制凋亡的作用,有报道表明Bcl-2有助于维持软骨细胞及成骨细胞生存直到其最终成熟^[17]。Bcl-XL和(或)SV40大T抗原可使破骨细胞抵抗凋亡的能力增加,存活时间延长而使其数目增加^[18]。

2.4 p53抑癌基因

p53基因有野生型和突变型之分,野生型是一种抑癌基因,而突变型则是一种癌基因。野生型p53的功能是抑制细胞生长,调节细胞周期,其缺乏可导致细胞无限制地分裂增殖,有报道表明从p53基因缺失的小鼠颅骨中可获得永久生存的成骨细胞株^[9]。

p53在成骨细胞的分化过程中可能有一定的作用。Lynch等^[20]在矿化的骨组织小结中发现有p53、bcl-XL、Bax、c-fos等基因的表达。但p53在其中的具体作用尚不清楚。

在p53完全缺失的小鼠骨髓组织中,可出现一种可自发地形成包含有脂肪细胞或成骨细胞的中心灶的细胞,但还有一种数量最多的细胞,其最初表型与成骨细胞一致,但可被诱导分化成脂肪细胞,而骨质疏松时脂肪细胞的增加似乎是以成骨细胞的减少为代价的,提示p53的缺失可能与发生骨质疏松的条件有关^[21]。

3 临床检测与前景展望

癌基因和抑癌基因的检测方法多种多样,如PCR-SSCP、原位分子杂交(in situ hybridization, ISH)、原位PCR和免疫组织化学(immunohistochemistry, IH)等方法。最为常用的是免疫组化和原位分子杂交,这两种方法各有优点,但免疫组化方法因其简单、方便,在临床上的应用更为广泛。

相对于目前已发现的百余种癌基因和十几种抑癌基因来说,本文所涉及到的只是其中的极少的一部分在骨代谢中的作用,而且大多是动物和体外研究,因此还有广阔的研究领域尚

待探究。在正常情况下,骨代谢的过程是骨形成和骨吸收的动态平衡,如果机体受到内源性和(或)外源性因素的影响而使此平衡发生紊乱,将会导致代谢性骨疾病的发生。随着基因工程技术的发展提高,基因治疗应用于临床已成为现实,而如何将其应用于代谢性骨疾病的治疗中将具有极为诱人的研究前景。

参 考 文 献

- 1 Closs EI, Murray AB, Schmidt J, et al. c-fos expression precedes osteogenic differentiation of cartilage cells *in vitro*. J Cell Biol. 1990, 111(3):1313-1323.
- 2 Machwate M, Julienne A, Moukhtar M, et al. Temporal variation of c-fos proto-oncogene expression during osteoblast differentiation and osteogenesis in developing rat bone. J Cell Biochem. 1995, 57(1):62-70.
- 3 Miyauchi A, Kuroki Y, Fukase M, et al. Persistent expression of proto-oncogene c-fos stimulates osteoclast differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 1994, 205(3):1547-1555.
- 4 Felix R, Hofstetter W, Cecchini MG, et al. Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteoporosis. Eur J Endocrinol. 1996, 134(2):143-156.
- 5 Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al. c-fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. Science. 1994, 266(5184):443-448.
- 6 Kuroki Y, Shiozawa S, Sugimoto T, et al. Constitutive c-fos expression in osteoclastic MC₃T₃-E₁ cells stimulates osteoclast maturation and osteoclastic bone resorption. Clin Exp Immunol. 1994, 95(3):536-539.
- 7 Machwate M, Julienne A, Moukhtar M, et al. c-fos protooncogene is involved in mitogenic effect of transforming growth factor-beta in osteoblast cells. Mol Endocrinol. 1995, 9(2):187-198.
- 8 Kano J, Sugimoto T, Kanatani M, et al. Second messenger signaling of c-fos gene induction by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in osteoblastic osteosarcoma cells, its role in osteoblast proliferation and osteoclast-like cell formation J Cell Physiol. 1994, 161(2):358-366.
- 9 Birek C, Huang HZ, Birek P, et al. c-fos oncogene expression in dexamethasone stimulated osteogenic cells in chicken embryo periosteal cultures. Bone Miner. 1991, 15(3):193-207.

- 10 Kuraki Y, Shiozawa S, Kano J, et al. Competition between c-fos and 1,25(OH)₂ vitamin D3 in the transcriptional control of type I collagen synthesis in MC 3T3-E1 osteoblastic cells. *J Cell Physiol*, 1995, 164(3): 459-464.
- 11 Tanaka S, Aming M, Neff L, et al. c-bcl is downstream of c-src in a signaling pathway necessary for bone resorption. *Nature*, 1996, 383(6600): 528-531.
- 12 Uoe MR, Summers JA, Parsons SJ, et al. Matrix mineralization in hypertrophic chondrocyte cultures. Beta glycerophosphate increase type X collagen messenger RNA and the specific activity of pp60 c-src kinase. *Bone Miner*, 1992, 18(2): 91-106.
- 13 Lowell CA, Niwa M, Soriano P, et al. Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hemopoiesis. *Blood*, 1996, 87(5): 1780-1792.
- 14 Hall TJ, Schaeublin M, Missbach M. Evidence that c-src is involved in the process of osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 199(3): 1237-1244.
- 15 Duong LT, Lakkakorai PT, Nakamura I, et al. PYK2 in osteoclasts is an adhesion kinase localized in the sealing zone, activated by ligation of alpha(v) beta 3 integrin, and phosphorylated by src kinase. *J Clin Invest*, 1998, 102(5): 881-892.
- 16 Yoneda T, Niewolna M, Lowe C, et al. Hormonal regulation of pp60c-src expression during osteoclast formation *in vitro*. *Mol Endocrinol*, 1993, 7(10): 1313-1318.
- 17 Wang Y, Toury R, Hauchecorne M, et al. Expression of Bcl-2 protein in the epiphyseal plate cartilage and trabecular bone of growing rats. *Histochem Cell Biol*, 1997, 108(1): 45-55.
- 18 Hentunen TA, Roddy SV, Boyce BF, et al. Immortalization of osteoclast precursors by targeting Bcl-XL and Simian virus 40 large T antigen to the osteoclast lineage in transgenic mice. *J Clin Invest*, 1998, 102(1): 88-97.
- 19 Ghosh Choudhury N, Harris MA, Wozney J, et al. Clonal osteoblastic cell lines from p53 null mouse calvariae are immortalized and dependent on bone morphogenetic protein 2 for mature osteoblastic phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 231(1): 196-202.
- 20 Lynch MP, Capparelli C, Stem JL, et al. Apoptosis during bone-like tissue development *in vitro*. *J Cell Biochem*, 1998, 68(1): 31-49.
- 21 Thompson DL, Lum KD, Nygaard SC, et al. The derivation and characterization of stromal cell lines from the bone marrow of p53-mice: new insights into osteoblast and adipocyte differentiation. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(2): 195-204.