·综述·

破骨细胞质子泵调控的研究进展

扈英伟 于世凤

多核的破骨细胞(osteoclast, OC)是骨吸收的主要功能细胞,质子泵是其泌酸装置,对OC性骨吸收起关键作用。近几年来,随着实验技术的迅速发展,在OC的细胞生物学和分子生物学研究方面取得了很大进展;由于体内和体外模型系统的发展,对研究正常及病理情况下OC的生物学功能及质子泵调控提供了方便。

一、OC的形态、结构及特征

OC是体积大的多核巨细胞,直径达100 μm;胞核数在2~100个不等;OC与骨面接触时形成皱褶缘(ruffled border);紧邻皱褶缘周围的细胞膜与骨面紧密接触形成封闭缘(sealing zone,也称透明区 clear zone);在皱褶缘的深面为小泡区,其中主要为初级溶酶体和内吞泡,溶酶体内有各种水解酶;远离骨面位于小泡区深面的一端为OC的基底部,含有多个细胞核、大量的线粒体、发达的高尔基体和粗面内质网[1]。

OC含高活性的抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)可以作为OC的特征标志酶。OC的Ⅱ型碳酸酐酶(Carbonic anhydraese Ⅱ CAⅡ)的活性水平很高,CAⅡ将CO_2和H_2O结合形成$H_2CO_3 = H^+ + HCO_3^-$,为骨组织脱矿提供酸源。在分离的OC及骨器官培养中,CAⅡ的抑制剂可阻断OC性骨吸收。Asotra等[2]研究发现具有活跃骨吸收功能的兔OC的CAⅡ mRNA水平高于静态的OC。Inaoka等[3]发现兔OC组织蛋白酶K(Cathepsin K)在骨吸收中起重要作用、在酸性条件下可降解细胞外基质。OC另外一种特征酶——基质金属蛋白酶9(Matrix metalloproteinases 9, MMP-9),也称Ⅳ型胶原酶,可以裂解Ⅰ型胶原的α_2链及Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型胶原和明胶。降钙素受体(Calcitonin receptor, CT-R)可以作为OC最有特征性的标志。CT-R有两种亚型,OC表达的亚型为C1A。c-src:一种非受体性酪氨酸激酶,对从静态OC到具有骨吸收活性OC的激活有重要作用。缺乏c-src基因的动物可以正常形成OC,但由于OC不能发挥骨吸收功能而患骨硬化病,该类动物的OC不能形成皱褶缘。Src的底物可能为cortactin—在介导OC粘附到骨面中扮演重要角色。高活性的pp60-src主要集中表达在OC的皱褶缘[4]。

二、OC质子泵的结构、特征

在OC性骨吸收中酸脱矿是关键环节,OC的脱矿过程与其细胞膜上的质子泵密切相关。质子泵是一种存在于真核细胞质膜内、水解ATP产生能量、推动H^+逆浓度梯度跨膜转运的能量系统(简称H^+-ATPase)。根据所在质膜不同分为细胞膜型(P-ATPase)、线粒体型(F-ATPase)和空泡型(V-ATPase)。根据结构及功能不同分为E_1E_2型(即P-ATPase)、F_0F_1型(F-ATPase)和V_0V_1型(V-ATPase)。

Harry等[5]采用免疫杂交(Immunoblot)技术发现从牛肾脏分离的V-ATPase的抗体可以识别OC膜上ATP依赖性转运H^+的蛋白质;免疫细胞化学实验结果显示OC的H^+-ATPase位于OC与骨质接触部位;免疫电镜证实OC H^+-ATPase位于OC的骨吸收器官—皱褶缘处。该ATP依赖性H^+转运蛋白对H^+转运能力不受钒酸盐和Oligomycin的抑制,而对空泡型H^+-ATPase(V-ATPase)的特异性抑制剂NEM(N-乙基顺丁烯二酰亚胺)和7-Chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole敏感;肾脏H^+-ATPase的70、56、31 KD亚基抗体免疫反应在OC细胞膜上也可以显示。Vaananen H.K等[6]利用Western blot技术以Neurospora crassa V-ATPase的亚基抗体和胃H^+-K^+ ATPase抗体分别与富含OC的骨细胞微粒体片段杂交,结果显示:Neurospora crassa的57 KD亚基可与骨细胞中60 KD多肽发生交叉反应、Neurospora crassa的67 KD亚基可识别OC微粒体片段中分子量为70 KD的多肽,免疫组化及免疫电镜观察证实了Western blot的结果;而胃H^+-K^+ ATPase抗体即使在皱褶缘处也没发现交叉反应。甲状旁腺激素(PTH)可以增强Neurospora crassa V-ATPase的57、67 KD亚基抗体与OC皱褶缘的反应。从免疫学、结构及功能可确定OC膜上的质子转运装置为空泡型(vacuolar H^+-ATPase, V-ATPase)。

V-ATPase的主要功能之一是泌酸。静态OC的V-ATPase分布于胞浆内的空泡膜系统,当OC附着骨面时,细胞骨架发生改变,空泡膜系统向紧邻骨面的胞膜移动并与之融合,形成皱褶缘,质子泵就密集在皱褶缘上。

随着分子生物学技术的发展,对OC质子泵结构、性能有了更深的认识。Mattsson JP等[7]发现OC的H^+-ATPase转运H^+的机理为电子源性,在低温(0℃)下活性下降,而且该类H^+-ATPase对任何阴离子没有绝对"需要",但能穿透膜的阴离子可以提高其H^+转运活性,此类阴离子作为H^+的"伴随离子"。随后,它们将OC膜上的H^+-ATPase分离、重组,对其结构进行研究。SDS-PAGE, Western blot结果显示:OC的质子泵是由分子量为116、71、57、40、39、33、17 KD多亚基组成的复合体。Crider等[8]发现OC的质子泵主要包括胞质部分和跨膜部分,胞质部分主要作用为水解ATP、由70 KD(Subnit A)、58 KD(Subuni B)和40 KD、33 KD亚基组成,跨膜部分为质子通道、对V-ATPase特异性抑制剂Bafilomycin(Baf. A1)很敏感,由116 KD、39 KD、17 KD亚基组成。Wilken S等[9]用电镜观察到牛脑膜泡V-ATPase由顶部V_1(12 nm×14 nm)、中间柄部(6 nm×4 nm)和底部V_0(6.4 nm×13 nm)3个主要部分组成、整个复合体大小为28 nm×14 nm×14 nm,包括V_0中央3.6

作者单位:100081 北京大学口腔医学院病理研究室

nm×3.6 nm的空腔，V_1呈稍平的球形，中央的柄部在胞质一侧插入V_0的孔内。

Bartkiewicz等[10]运用PCR及Northern blot技术发现OC B亚基与脑组织中的V-ATPase B亚基同源，而非肾脏型。LI YP等[11,12]通过差异筛选人类破骨细胞瘤cDNA文库确定编码OC116KD亚基的序列由822氨基酸组成，与鼠、牛脑V-ATPase的116 KD亚基的同源性分别为46.9%、47.2%。他们克隆出一种编码OC V-ATPase的基因Atp6i，Atp6i缺陷的小鼠患有严重的骨硬化病。

OC V-ATPase有着与其他V-ATPase不同的特点。OC V-ATPase对NEM、Baf.A1及钒酸盐敏感，而钒酸盐为P-ATPase的特异性抑制剂；通过Western blot分析发现OC V-ATPase的A、B亚基与其他V-ATPase不同；OC V-ATPase A亚基分子量为63 KD，单核细胞、巨噬细胞及肾脏微粒体中V-ATPase的A亚基分子量为67～70 KD；OC V-ATPase对硝酸盐的敏感性比真菌的V-ATPase高20～100倍，比植物的V-ATPase高10～20倍；OC V-ATPase对磷酸盐、硫酸盐、醋酸盐不敏感，而这些盐类物质可以抑制其他的V-ATPase；OC的V-ATPase对局部底物及产物的量的调节比肾脏V-ATPase敏感[13,14]。

三、OC V-ATPase的调控

OC是骨吸收的功能细胞，其功能异常导致骨改建平衡失调，是多种代谢性骨病如骨质疏松症、Paget's病等的病理基础，而V-ATPase对OC性骨吸收起着关键作用。所以，学者们对OC V-ATPase的调控一直给予极热忱的关注。

Omeprazole是一种治疗消化性溃疡的药，其作用机理为对胃粘膜细胞H^+-K^+ ATPase有阻断作用，从而抑制了粘膜细胞分泌酸的能力。于世凤等[15]观察到Omeprazole在体外可以抑制OC性骨吸收。将灭活的牛骨片与分离的OC共同培养出现许多吸收陷窝，添加Omeprazole后骨的吸收受到抑制，由此推测该药对OC的泌酸能力有抑制作用。但Omeprazole抑制骨吸收的作用浓度较对胃粘膜细胞H^+-K^+ ATPase的有效浓度高30倍。

Baf.A1是一种大环内酯类的抗生素。1988年Bowan等发现在3种类型的质子泵中只有V-ATPase对Baf.A1极敏感。Baf.A1通过阻断OC皱褶缘上的V-ATPase而抑制OC性骨吸收。Sunquist等[16]体外实验表明Baf.A1在10^{-6}、10^{-7} mol/L的浓度下可以抑制OC的骨吸收能力及牙齿的萌出。由于OC V-ATPase是由多个亚基组成的复合体，Baf.A1对A-ATPase作用的具体机理一直没达成共识；Crider等[8]认为Baf.A1是与V-ATPase的质子通道17 KD亚基结合而抑制其对H^+的转运。Mattsson JP等[17]将Baf.A1以^3H标记，发现Baf.A1是通过与H^+通道区以非共价键的形式紧密结合而发挥其抑制作用。目前，已有31种Baf的衍生物问世，虽然它们的效能并不比Baf.A1更突出，但组织特异性上各有特色。

OC V-ATPase水解ATP产生能量，推动H^+逆浓度梯度转运，ATP是唯一的底物，磷酸盐(Phosphate)和ADP是两种产物。ATPase分解ATP先释放磷酸盐，随之是ADP，磷酸盐(Phosphate)和ADP对V-ATPase有抑制作用，前者为非竞争性抑制，后者为竞争性抑制。含有磷酸盐结构的物质如双膦酸盐(Bisphosphonate)对OCV-ATPase有无类似作用？David P等[18]基于此研究了几种双膦酸盐的作用机理。Pyrophosphate(PPi)、Biphosphate、Etidronate、Alendronate、YM-175、Tiludronate对H^+转运都有抑制作用，PPi抑制效能IC_{50} = 4.8 mmol/L，Alendronate、Etidronate、YM-175为IC_{50} = 5～10 mmol/L，而Tiludronate对肾V-ATPase抑制作用IC_{50} = 1 mmol/L，对OC膜泡V-ATPase质子转运抑制作用IC_{50}约为500 nmol/L。Baf.A1抑制V-ATPase并增加膜H^+的通透性，Tiludronate只对酶本身有作用，不影响泡膜的完整性。Tiludronate与V-ATPase作用不是以共价键，所以是可逆的，而且是非竞争性的，并明显受pH值的影响，最适pH为7.45～7.7。

近年来，研究OC及其质子泵成为热门课题，实验技术的迅速发展提供了极大方便。但由于OC自身的局限性，分离、纯化或获得更多的OC仍是学者们面临的问题，对质子泵的深入研究受到限制，已做了多方面的探讨，从不同动物、不同组织中分离培养OC及破骨细胞样细胞(Osteoclast-like cell, OLC)。赵宁侠等[19,20]研究发现骨巨细胞瘤(Giant cell tumor, GCT)中的多核巨细胞具有OC的主要特征：CT-R、TRAP染色阳性、在灭活的骨片上形成吸收陷窝；原位杂交及免疫组织化学结果显示V-ATPase和CAII呈阳性表达；王晓敏等[21]根据基因文库中OC V-ATPase的基因顺序设计特异引物，对GCT中的多核巨细胞mRNA行逆转录扩增，结果扩增片段长度与设计长度相符，从分子水平进一步说明GCT中多核巨细胞可能就是OC。Gerald J. Atkins等[22]利用RT-PCR技术，发现GCT表达OC分化、发育、成熟及行使功能所必需的各种因子基因，如CT-R、IL-1、IL-1R、IL-6、IL-6R、IL-11、IL-11R、IL-17、IL-18、M-CSF、PTHrP、PTHrPR、TRAP等。这些发现对将GCT中OLC作为OC的体外模型研究OC及其质子泵的结构、功能、调控提供了理论依据。

参 考 文 献

1 G. David Roodman. Cell biology of the osteoclast. Exper Hematol, 1999, 27:1229-1241.

2 Asotra S, Gupta AK, Sodek J, et al. Carbonic anhydrase II mRNA expression in individual osteoclast under "resorbing" and "unresorbing" conditions. J Bone Miner Res, 1994, 9:1115-1122.

3 Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, et al. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206:89-96.

4 G. David Roodman. Advances in bone biology. Endocr Rev, 1996, 17:308-332.

5 Harry G, Blair N, Steven L, et al. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. Science, 1989, 25:855-857.

6 Vaananen HK, Karhakorpi EK, Sunquist K, et al. Evidence for the presence of a proton pump of the vacular H^+-ATPase type in the ruffled border of osteoclast. J Cell Biol, 1990, 111:1305-1311.

7 Mattsson JP, Lorentzon P, Wallmark B, et al. Characterization of proton transport in bone-derived membrane vesicles. Biochem Biophys Acta, 1993, 1146:106-112.

8 Crider BP, Xie XS, Stone DK. Bafilomycin inhibits proton flow through the H^+ channel of vacuolar proton pump. J Biol Chem, 1994, 269:17379-17381.

9 Wilken S, Vasilyeva E, Forgac M, et al. Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. J Biol Chem, 1999, 224: 31804-31810.
10 Barekiewicz M, Hernando N, Reddy SV, et al. Characterization of the osteoclast vacuolar H^+-ATPase B-subunit. Gene, 1995, 160: 157-164.
11 Li YP, Chen W, Stashenko P, et al. Molecular cloning and characterization of a putative novel human osteoclast-specific 116KD vacuolar proton pump subunit. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 218: 813-821.
12 Li YP, Chen W, Liang Y, et al. AtP6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. Nat Genet, 1999, 23: 447-451.
13 Chatterjee D, Chakaborty M, Leit M, et al. Sensitivity to vanadate and isoforms of subunits A and B distinguish the osteoclast proton pump form other vacolar H^+-ATPase. Pro Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 6257-6261.
14 Chatterjee D, Chakaborty M, Leit M, et al. The osteoclast proton pump differs in its pharmacology and catalytic subunits from other vacuolar H^+-ATPase. J Exp Biol, 1992, 172: 193-204.
15 于世凤，金久纯也. 牙周炎骨吸收机理的研究—制酸剂 Omeprazole 对分离的破骨细胞性骨吸收的影响. 现代口腔医学杂志, 1991, 5: 85-87.
16 Sunquist KT, Sandy C, Marka JR. Bafilomycin A1 inhibits bone resorption and tooth eruption *in vivo*. J Bone Miner Res, 1994, 9: 1575-1582.
17 Mattsson JP, Keeling DJ. [^{3}H] Bafilomycin as a probe for the transmembrane proton channel of the osteoclast vacuolar H^+-ATPase. Biochem Biophys Acta, 1996, 1280: 98-106.
18 David P, Nguyen H, Barbier A, et al. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H^+-ATPase. J Bone Miner Res, 1996, 11: 1498-1507.
19 赵宁侠，于世凤，庞淑珍. 空泡型质子泵在骨巨细胞瘤的多核巨细胞中的表达. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3: 14-18.
20 赵宁侠，于世凤，庞淑珍. Ⅱ型碳酸酐酶在骨巨细胞瘤的多核巨细胞中的表达. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(3): 1-3.
21 王晓敏. 骨巨细胞瘤中多核巨细胞的特征研究. 北京医科大学博士生论文, 1999, 31-38.
22 Gerald J Atkins, David R Haynes, Stephen E Graves, et al. Expression of osteoclast differentiation signals by stromal elemants of giant cell tumors. J Bone Miner Res, 2000, 15: 640-649.

2001年第一届国际骨矿研究学术会议征稿通知

The First International Conference on Bone and Mineral Research [ICBMR]

2001年9月15日-19日，北京

主办单位：中国骨质疏松基金会(COF)　北京市门头沟区政府(BDMG)

协办单位：中国老年学学会骨质疏松委员会(OCCGS)　中国骨质疏松杂志社(CJO)

承办单位：中国骨质疏松基金会会议展览部(DCE of COF)　北京东方亚太骨矿研究中心(BEAPBMRC)

支持单位：国际骨质疏松基金会(IOF)　国际骨矿学会(IBMS)

国科外审字[2000]1827号文件批准，中国骨质疏松基金会、北京市门头沟区政府和北京东方亚太骨矿研究中心，经过一年多的筹备，定于2001年9月15日~19日在北京国际饭店召开"第一届国际骨矿研究学术会议"。现向国内骨矿及骨质疏松领域专家学者征集参会稿件。

征文内容：骨生物学、骨生物力学，骨质疏松及骨折的流行病学的诊断、治疗、预防、骨矿代谢及相关的临床实践、最新诊断设备及治疗技术，其他代谢性骨病，骨矿诊断技术及质量控制、骨质疏松的社会经济问题及宣传教育，中医、中药及中西医结合等。

征稿要求：论文按【题目、作者、单位、邮编、摘要、前言、材料方法、结果、讨论、参考文献】格式书写；摘要按【题目、作者、单位、前言、材料方法、结果、讨论、关键词】格式书写；未公开发表过；用A4纸激光打印并加盖单位公章；论文英文摘要的书写需符合背面的规定；会议不接收手抄稿。

只要报送了600字以内的中、英文摘要各2份的稿件作者即可得到参会资格。大会组委会与惠氏-白宫制药有限公司白宫OTC药物部共同设置了"中青年优秀论文奖"(年龄在55岁以下)，一等奖奖金人民币3000元(3名)、二等奖奖金人民币1500元(10名)、同时赠送奖牌、证书等纪念品。参加优秀论文评选的作者，应是中国老年学学会骨质疏松委员会的个人会员或团体会员；需另报送3200字以内的中英文全文各两份；并同时邮寄审稿费30元。截稿日期为2001年6月25日(以邮戳为准)。如果作者本人翻译中文摘要确有困难、大会组委会可协助翻译、翻译费人民币18元/100汉字。

会议期间，欢迎厂家、公司参展。有意者可来信索取通知。

来稿请寄：北京市9910信箱，北京东方亚太骨矿研究中心　邮编：100102

收件人：ICBMR会务组　李芳芳或朴俊红

联系电话：010-62389965　传真：010-82012243

E-mail：2001@china-osteofound.org/liuzhonghou@china-osteofound.org

网　址：www.china-osteofound.org/www.china-cof.com

中国骨质疏松基金会
2001年1月15日

北京东方亚太骨矿研究中心
2001年1月15日