

骨生长因子的生物学作用与增龄改变

于明香 王洪复

骨重建是一个复杂的生理生化过程,主要包括成骨细胞(Osteoblast, OB)的骨形成与破骨细胞(Osteoclast, OC)的骨吸收。骨重建受甲状旁腺激素、降钙素、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和多种细胞因子的调控。在调控的细胞因子中,以骨局部生长因子的作用最为重要。随着年龄的增长与衰老,骨生长因子在骨组织中的含量以及对骨组织的作用均发生相应改变。本文作者就骨生长因子的特性、在骨重建中的作用以及随增龄而发生的改变作一综述。

一、骨生长因子的种类与特性

1. 骨生长因子的种类

多种组织可合成生长因子,存在于骨组织中的生长因子可能来自血循环或由骨组织中多种细胞所合成。骨细胞可合成胰岛素样生长因子-I和-II(Insulin-like growth factor-I和-II, IGF-I和IGF-II)、转化生长因子 β 多肽超家族成员,包括转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF β)和某些骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)、成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)、血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)和多种免疫造血系统的细胞因子^[1]。

2. 主要骨生长因子的特性

人IGF-I为70个氨基酸组成的多肽,其中有3个二硫键交联,定位于12号染色体,包含5个外显子和4个内含子。人IGF-II为67个氨基酸组成的多肽,其中也有3个二硫键交联,基因定位于11号染色体,包含3个启动子、5个非编码外显子和3个编码外显子。IGF-I和IGF-II同源率为62%。IGF的作用是通过其膜受体介导的,IGF受体有两种类型,即I型和II型受体,其cDNA及其氨基酸顺序已弄清楚。I型受体是一个450kDa $\alpha_2\beta_2$ 异二聚体亚单位结构,其实质是一个内在性配体激活酪氨酸激酶。I型受体对IGF-I具有很高的亲和性,也可与IGF-II结合,但亲和性较低。II型受体是由分子量为250kDa组成的多肽,没有内在性酪氨酸激酶活性,对IGF-I亲和性很高,对IGF-II亲和性较低。在血液、组织浸出液和细胞培养基中均含有IGF结合蛋白(Insulin-like growth factor binding protein, IGFBP)。IGF通常与IGFBP结合成复合物的形式存在,现分离出6个功能不同的IGFBP,分别命名为IGFBP1至IGFBP6,IGFBP对决定IGF在体内生物效应及生物活性方面起关键作用,在靶细胞水平可抑制或增强IGF的作用^[2]。

TGF β 为同种二聚体肽物质,已证实有5种TGF β ,分别命名为TGF β 1至TGF β 5,均属于TGF β 超家族成员。TGF β 1与TGF β 2同源率为71%。TGF β 以潜隐和大分子复合物形式存在于骨基质中,潜隐性TGF β 可被酸、某些蛋白酶和去糖基作用激活。TGF β 生物作用是由特异性膜受体介导,骨中TGF β 的浓度大约比其他组织高100倍,而且成骨细胞有高浓度的TGF β 受体^[3]。

FGF由两种蛋白质组成,即酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。aFGF具有不同的结构形式,但其主要的结构形式由140个氨基酸组成,aFGF具有酸性等电点(5.6),bFGF具有碱性等电点(9.6)。aFGF与bFGF的氨基酸顺序同源率为55%。bFGF也有多种存在形式。aFGF存在于骨细胞浸出液中,其含量只有bFGF的1/10,bFGF的生物作用是由细胞表面高亲和性受体介导的。

PDGF由A、B两条多肽链组成,A链与B链的氨基酸顺序同源率为56%。已知至少有3种不同的PDGF相关分子,即A-A、B-B同二聚体和A-B异二聚体。

二、骨生长因子对骨组织的作用

骨细胞可合成和分泌骨生长因子,骨生长因子进而以自分泌和旁分泌的方式作用于骨细胞和骨基质,对骨形成和骨吸收发挥着重要的局部调节作用。IGF-I、-II是较弱的骨细胞丝裂原,但对成骨细胞的分化具有强烈刺激作用,这可通过检测骨钙素和I型胶原合成增加予以证明,刺激作用的结果可增加骨基质沉积率和骨形成^[1]。另外,IGF可降低胶原降解和间质胶原酶表达,提示在骨基质的保持方面发挥作用。IGF-I、-II的同化特征、对基质降解的抑制作用及其在骨组织中丰富的含量提示这些因子在骨量维持方面发挥主要作用。Kudo等发现IGF-I能剂量依赖性促进OB DNA和胶原合成,但这种作用受IGFBP4抑制,新生大鼠OB加IGF-I培养6d,细胞内碱性磷酸酶活性迅速升高,说明OB活性和数量增加^[4]。D'avis等应用人OB培养研究了增殖期和融合期细胞外基质代谢中IGF-I的作用,在增殖期重组人IGF-I以剂量和年龄依赖的方式增加^[5]胸腺嘧啶核苷的掺入,在增殖后细胞株,重组人IGF-I(0.1-100 ng/ml)可增加I型胶原、纤维粘连蛋白的水平^[5]。Tanaka等在离体情况下评价了IGF-I对骨髓基质细胞的影响,50 ng/ml IGF可刺激大鼠基质细胞的碱性磷酸酶、前胶原 α 1、骨桥蛋白和骨钙素mRNA表达^[6]。Wakisaka等观察了局部输注IGF-I对老年大鼠股骨OB相关基因表达的影响。Northern杂交与点杂交分析

作者单位:200032 上海,上海医科大学老年医学研究中心骨代谢研究室

表明,IGF-I治疗的股骨前胶原I、骨桥蛋白、碱性磷酸酶和骨钙素的表达较对照组增加0.4~1.5倍,同时进行的组织形态计量分析表明小梁骨体积、小梁骨数量和小梁骨厚度均明显增加,而小梁骨间隙明显降低,IGF-I治疗组明显增加类骨质沉积、类骨质表面积、OB数与OB表面积,并刺激矿物质沉积率和骨形成的动力学参数。治疗组与对照组相比骨形成率增加81%,而骨吸收面积、OC表面积、骨吸收相关参数不受影响,这些结果提示对老年大鼠股骨局部应用IGF-I可刺激基质蛋白表达,通过刺激骨形成而改变骨小梁状况,且不影响骨吸收^[7]。

TGF β 和BMP均能刺激正常OB增殖,但仅BMP诱导OB分化并增强分化的OB表型表达。OC能创造酸性微环境,进而激活潜隐的TGF β ,TGF β 进一步激活OB以形成新的骨基质,因而认为TGF β 是OC与OB相互调控的偶联因子之一。离体研究表明TGF β 可增加OB产生I型胶原、纤维粘连蛋白、骨桥蛋白、骨粘连蛋白和碱性磷酸酶^[8]。TGF β 还抑制基质金属蛋白酶的作用,因而阻止细胞外基质的降解。另有研究提示TGF β 可抑制OC形成和功能,还可增加细胞粘附分子受体和整合素合成。大多数离体研究表明TGF β 可增加OB分化标志,如碱性磷酸酶、I型胶原、骨粘连蛋白的表达,而且可与1,25(OH)₂D₃协同作用增加碱性磷酸酶水平。另有研究表明雄激素对骨的某些同化和抗骨吸收作用可能是由于骨的微环境中自分泌和旁分泌因子,如TGF β 、IGF-I及其结合蛋白的调节所介导^[9]。

Tanaka等应用大鼠骨祖细胞观察了bFGF对OB相关基因的DNA合成和表达的影响,低浓度bFGF(0.1 ng/ml)即可刺激DNA合成,bFGF还可增加骨桥蛋白的mRNA水平,降低I型胶原的mRNA水平。bFGF能部分抑制地塞米松对碱性磷酸酶、I型胶原mRNA的刺激作用,而且还能抑制由1,25(OH)₂D₃和地塞米松作用过的细胞的骨钙素mRNA的表达。结果提示bFGF作为一种局部的正性和负性调节因子对骨祖细胞的增殖和成骨系细胞的表达各自发挥双重作用^[10]。

PDGF可刺激骨细胞增殖,但不促进OB分化。Tanaka等研究了PDGF对成年和老年大鼠的骨髓基质细胞OB标志物的DNA合成和mRNA表达,用地塞米松对成年大鼠骨髓细胞进行处理可诱导形成OB样细胞,PDGF能部分抑制地塞米松诱导的基质细胞的分化,在低血清基质细胞培养液中,PDGF可剂量依赖性地刺激^{[3}H]胸腺嘧啶核苷掺入到DNA,500 ng/ml达15倍的最大刺激。PDGF与IGF-I对DNA合成的影响是相加的,融合的成年大鼠骨髓基质细胞经PDGF处理可使骨桥蛋白mRNA水平增加4倍,而对碱性磷酸酶与I型胶原mRNA没有明显影响,PDGF可明显抑制骨钙素mRNA的表达水平,而IGF-I可刺激I型胶原表达,对骨桥蛋白和碱性磷酸酶的表达没有明显影响,IGF-I可放大PDGF对骨桥蛋白表达的刺激作用,提示PDGF是一个强有力的丝裂原^[11]。

三、骨生长因子的增龄改变

随年龄增长,骨细胞合成生长因子的能力也相应发生改变,而且骨生长因子对骨细胞的作用也随增龄而改变。Nico-

las等报道股骨皮质骨中的IGF-I含量随增龄而降低,作者发现皮质骨中免疫活性IGF-I含量从20岁到60岁下降50%,而性别之间没有差异。作者还报道,骨中IGF-I含量大约是TGF β 的20倍,肯定了IGF-I在骨组织中的优势,TGF β 也随增龄而下降,但改变较小。骨组织中IGF-I的降低可能代表IGFBP的合成或含量的改变,骨细胞合成6种IGFBP,这些结合蛋白在促使IGF-I,IGF-II沉积于骨基质中发挥重要作用,骨组织中生长因子含量的改变也可能与血清浓度改变有关,已有报道从20岁到60岁血清中IGF-I浓度降低约50%,其降低可能由于生长激素分泌减少所致,这种降低对皮质骨中IGF的改变具有同样的重要性^[12]。Seck等由533例早期乳腺癌手术中获取的髂嵴活检骨组织检测了IGF-I和IGF-II的浓度,并观察了骨基质中IGF-I和-II与年龄、绝经、骨转换、骨体积以及与血清中IGF的关系。结果发现髂嵴中IGF-I浓度与年龄呈负相关,80岁组髂嵴IGF-I浓度较30岁组降低35%,血清中也有类似变化。骨基质中IGF-I浓度不受绝经影响。骨基质中IGF-II浓度比IGF-I高8倍,血清中IGF-II浓度与年龄不相关,骨基质中IGF-II浓度与年龄呈轻度正相关,与绝经无关。上述结果表明,髂嵴骨基质中IGF浓度与血清中IGF相比是一个较好的局部骨转换和骨量的预测指标^[13]。Boonen等检查了74例23~92岁(男35,女39)来自尸体解剖的股骨颈区皮质骨和小梁骨中IGF-I含量,发现小梁骨中IGF-I明显低于皮质骨,IGF-I明显随增龄而降低,23~92岁之间,皮质骨和小梁骨平均每年各丢失0.3和0.21 ng/mg蛋白。在女性,小梁骨IGF-I下降速率明显快于皮质骨,而在男性,皮质骨和小梁骨IGF-I的年龄依赖性改变类似,骨相关性IGF-I的这些变化与OB功能随增龄性降低相一致^[14]。对不同年龄人OB样细胞培养结果表明,重组人IGF-I对培养的人OB样细胞增殖和表达的影响呈年龄依赖性,来自年轻病人的OB样细胞对重组人IGF-I的反应较好,增殖率较高,且I型胶原与纤维粘连蛋白的表达水平高^[1]。

与IGF结合的IGFBP也随增龄而改变,Mohan等检测了血清与骨中IGFBP5以及血清中IGFBP4的水平随增龄发生的改变,结果表明血清中IGFBP4随增龄而增加,但IGFBP5却随增龄而降低,骨中IGFBP5也随增龄而下降,推测IGFBP4和IGFBP5的增龄相关性改变可能部分的与骨形成中OB增殖和分化降低有关^[15]。

Erdmann等研究了增龄是否影响TGF β 对人骨祖细胞克隆形成能力的刺激作用,TGF β (10⁻¹¹ M)可明显增加每个克隆的估计细胞数,这一刺激作用随供体年龄增长而明显降低,TGF β 可使50岁以下供体培养物中每个克隆的平均细胞数增加(136 \pm 50)%,而60岁以上供体仅平均增加(43 \pm 16)%^[16]。Gazit等的研究表明老年小鼠长骨骨基质中所含TGF β 明显低于年轻小鼠;从老年小鼠分离的OB祖细胞离体情况下产生的TGF β 明显少于年轻小鼠;来自老年小鼠的骨髓OB祖细胞表达的TGF β 受体(I~III型)明显高于年轻小鼠,这些细胞在离体情况下对外源的重组TGF β 呈高反应性。以上结果可进一步推测老年小鼠骨基质中TGF β 合成

降低或活性降低可能导致骨髓祖细胞群的大小和发育潜力降低^[17]。

Tanaka 等通过对成年大鼠和老年大鼠的骨祖细胞进行比较,发现 bFGF 诱导的促有丝分裂活性随增龄明显降低,对骨桥蛋白基因表达的影响不随增龄而改变^[10]。

Tanaka 等的研究表明 PDGF 对骨髓基质细胞的促有丝分裂作用随增龄而降低,但对骨桥蛋白表达的刺激作用呈年龄非依赖性^[11]。

四、骨生长因子的应用前景

OB 骨形成功能衰退是老年性骨质疏松症的发生原因之一,因而延缓 OB 衰老、保护 OB 的骨形成功能对维持老年人骨量、预防骨质疏松症的发生至关重要。综上所述,骨生长因子的增龄性降低在骨组织衰老改变中可能起着关键的作用,因此推测如适当补充某些生长因子,有望改善 OB 的骨形成功能,有助于增加骨量,减少骨丢失,从而预防骨质疏松的发生。Johansson 等对一例 59 岁男性特发性骨质疏松病人皮下注射超生理剂量的重组人 IGF- I,发现骨形成与骨吸收均有增加,但骨形成的持续时间及强度明显高于骨吸收作用,认为 IGF- I 间断使用可能对骨质疏松症治疗有明显作用^[18]。Rosen 提出中老年人补充 IGF- I 可预防和减少骨质疏松的发生,且推荐用 IGF- I 治疗骨质疏松^[19]。另有报道,在增龄、雌激素缺乏或失重所致的骨量减少模型中,低剂量 IGF- I 或 TGF β 能增加 OB 增殖和分化,导致骨小梁形成增加和骨丢失减低。有人设想通过增加骨局部 IGF- I 的合成而达到促进骨形成的目的,已知甲状旁腺激素如间歇使用在离体和活体均可增加骨形成,其离体作用是由于增加 IGF- I 合成以及可能激活或释放 TGF β 所致,然而在活体的作用是否由于骨生长因子的产生或活性改变所致尚难定论,应用 PTH 可导致副作用,如高钙血症,而且尚缺乏在骨质疏松症治疗中长期观察的资料,因此尚需详细的监控试验。目前,骨生长因子对延缓骨衰老预防保健作用的研究资料虽然不多,但随着有关基础研究的深入,将会不断显示其广阔的应用前景。

参 考 文 献

- Canalis E, Pash J, Varghese S. Skeletal growth factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Express*, 1993, 3:155-166.
- Conover CA, Kiefer MC. Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76: 1153-1159.
- Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: multiple actions and potential clinical applications. *JAMA*, 1989, 262: 938-941.
- Kudo Y, Itatsu S, Iwashita M, et al. Effects of estrogen and parathyroid hormone on osteoblast activity via regulating the binding activity of insulin-like growth factor binding protein-4 in SaOS-2 cells: implications for the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1245: 402-406.
- D'Aviss PY, Frazier CR, Shapiro JR, et al. Age-related changes in effects of insulin-like growth factor I on human osteoblast-like cells. *Biochem J*, 1997, 324(Pt 3): 753-760.
- Tanaka H, Quarto R, Williams S, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of insulin-like growth factor- I (IGF- I) on femoral mRNA expression in old rats. *Bone*, 1994, 15: 647-653.
- Wakisaka A, Tanaka H, Barnes J, et al. Effect of locally infused IGF- I on femoral gene expression and bone turnover activity in old rats. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 13-19.
- Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, et al. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 855-863.
- Hofbauer LC, Khosla S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur J Endocrinol*, 1999, 140: 271-286.
- Tanaka H, Ogasa H, Barnes J, et al. Actions of bFGF on mitogenic activity and lineage expression in rat osteoprogenitor cells: effect of age. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 150(1-2): 1-10.
- Tanaka H, Liang CT. Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *J Cell Physiol*, 1995, 164: 367-375.
- Nicolas V, Prewett A, Bettica P, et al. Age-related decreases of insulin-like growth factor- I and transforming growth factor- β in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78: 1011-1016.
- Seck T, Scheppach B, Scharla S, et al. Concentration of insulin-like growth factor (IGF)- I and- II in iliac crest bone matrix from pre- and postmenopausal women: relationship to age, menopause, bone turnover, bone volume, and circulating IGFs. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83: 2331-2337.
- Boonen S, Aerssens J, Dequeker J, et al. Age-associated decline in human femoral neck cortical and trabecular content of insulin-like growth factor I: potential implications for age-related (type 2) osteoporotic fracture occurrence. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61: 173-178.
- Mohan S, Baylink DJ. Serum insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 levels in aging and age-associated diseases. *Endocrine*, 1997, 7: 87-91.
- Erdmann J, Kogler C, Diel I, et al. Age-associated changes in the stimulatory effect of transforming growth factor beta on human osteogenic colony formation. *Mech Ageing Dev*, 1999, 110(1-2): 73-85.
- Gazit D, Zilberman Y, Ebner R, et al. Bone loss (osteopenia) in old male mice results from diminished activity and availability of TGF-beta. *J Cell Biochem*, 1998, 70: 478-488.
- Johansson AG, Lindh E, Ljunghall S. Insulin-like growth factor I stimulates bone turnover in osteoporosis. *Lancet*, 1992, 339(8809): 1619.
- Rosen CJ. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the senescent skeleton: Ponce de Leon's fountain revisited? *J Cell Biochem*, 1994, 56: 348-356.