

破骨细胞分化中的信号环路与调节

张晔 吴小涛

骨的形态、结构通过不断的形成与吸收来维持。形成与吸收的不平衡造成以骨量改变为特征的代谢性骨病,如骨质疏松(Osteoporosis)和石骨症(Osteopetrosis)。而骨的生长、发育和维持是一个高度调节过程,受全身和局部因子调节。基因在其中起决定因素作用。

一、概述

成骨细胞(Osteoblasts, OB)是骨形成细胞,由基质干细胞起源。破骨细胞(Osteoclasts, OC)则主要负责骨吸收,来源于单核-巨噬细胞系的前体细胞。造血前体细胞在骨营养激素和骨髓环境产生的局部因子调节下,在骨吸收部位分化为破骨细胞,对骨的发育、塑形起作用。

在体外,将骨髓细胞或脾细胞与成骨细胞或骨髓基质细胞在有刺激骨吸收因子如 IL-6, PTH 的存在下共同培养,可以形成破骨样多核细胞(Osteoclast-like cells, OCLs),具有成熟 OC 的表型标志。而成骨/基质细胞在其中是必需的,它通过制造可溶性因子以及与破骨前体细胞直接作用的信号传导而作用于破骨细胞分化。1997年,Simonet 首先分离出了一种分泌蛋白^[1],具有调节骨密度的作用,取名为保骨素(Osteoprotegerin, OPG),又名破骨细胞形成抑制因子^[2](Osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)。属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族,以分泌的方式在胞外发挥作用。在体外 OPG 可以阻止 OC 的分化,给予重组 OPG 则可以防止卵巢切除模型的骨丢失^[3]。

由于 OPG 以分泌形式存在,对破骨细胞形成起负调节作用,因而推测中和了一个刺激 OC 发育的配体(OPG-ligand, OPGL),阻止 OC 的成熟^[4]。1998年,两个独立的实验小组分别发现了这种配体。它是膜相关 TNF 配体家族的成员,当受到骨吸收刺激剂作用时表达在成骨/基质细胞表面,传递信号给破骨前体细胞而诱导 OC 形成。Lacey 报道这种因子在体外不需要 VitD₃ 和基质细胞就可以在 CSF-1 存在情况下刺激破骨细胞形成^[5]。随后,Heu 鉴定出破骨前体细胞上的破骨细胞分化和激活受体,它正是 TNF 受体家族成员 RANK (Receptor activator of NF- κ B)^[6]。OPGL-RANK-OPG 组成了控制破骨细胞发育的关键调节蛋白环路。TNF 受体偶联因子(TrAF)家族成员和/或 JNK 则是 OC 发生的胞内信号传导者。

二、OPG、OPGL 的结构

1. OPG 基因定位在人染色体 8q²¹⁻²⁴, Southern 印迹显示

OPG 只有一个基因,长 27 kb,包含 5 个外显子^[2]。OPGcDNA 编码 401 个氨基酸多肽,是一个分泌性糖蛋白,由一个疏水引物肽,4 个富半胱氨酸结构域和两个与 Fas 类似的死亡结构域(death domain)串联排列组成。N-端的一半与所有 TNFR 超家族成员相似,是发挥生理功能必需的^[7]。C-端一半则不含任何已知蛋白基序。肽链的最大特点是没有疏水透膜序列,因而与其他 TNFR 分子不同,以分泌形式发挥作用。它有单、双体两种形式,双体比单体分布迅速,生物活性强。

2. OPGL 基因在染色体上的定位为人的 13q¹⁴, 鼠则为同源的 14 号染色体^[4]。在哺乳动物细胞指导表达 316 个氨基酸的产物。与鼠 OPGL 有 87% 同源,显示在进化过程中的高度保守。在氨基酸残基 49 与 69 位之间包含一个疏水透膜域,构成一个包含短 N-端胞内域和长 C-端胞外域的 II 型透膜蛋白。人 293 成纤维细胞全长 OPGLcDNA 产物为 45kD 细胞相连的蛋白,也可以释放 31kD 可溶 C 端部分产物到介质中。两种产物均可与 OPG 作用而发挥效应。

三、OC 分化中的信号传导环路

大量的研究揭示了 OC 发育、成熟过程中 OPGL-RANK-OPG 环路的作用^[1]:各种刺激骨吸收的因子根据信号传导途径分为三类:蛋白激酶 A 介导的信号(PTH 和 PGE₂),维生素 D 受体介导的信号[1,25(OH)₂D₃],和 gp130 介导的信号。它们作用于成骨/基质细胞,诱导其膜上表达 OPGL 分子,通过与 OC 前体细胞膜上 RANK 直接结合,将信号传入前体细胞,引起级联瀑布反应,使 OC 分化成熟和激活。而 OPG 则由成骨/基质细胞旁分泌发挥作用,竞争性与 OPGL 结合,封闭 OPGL 与 RANK 的结合,抑制 OC 分化、成熟(图 1)。OPGL/OPG 浓度比是 OC 分化诱导的决定性因素^[9]。除了自我调控机制外,OC 成熟、激活诱导的骨吸收、血钙浓度升高,也对环路起反馈调节作用。

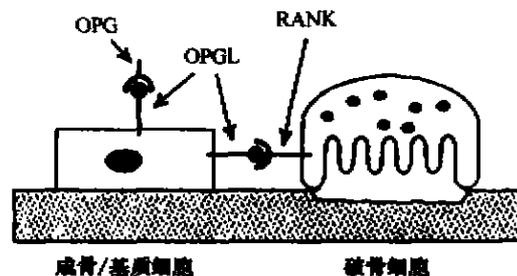


图 1 破骨细胞的分化信号传导过程

作者单位: 210002 南京,解放军第八一医院骨科(张晔);铁道医学院附属医院骨科(吴小涛)

1. 成骨细胞表达 OPGL

人和啮齿动物多种成骨/基质细胞系可以表达 OPGL mRNA。它有膜结合和溶解两种形式,是骨微环境中成骨细胞产生,调节 OC 形成的中枢因子。

3种不同骨吸收信号,通过 VitD 受体、蛋白激酶 A 和 gp130,各自独立上调 OPGL 基因在 OB 的表达,诱导膜上形成 OPGL。体外实验发现只有 OPGL 存在,才有 TRAP⁺ 细胞出现,作为破骨细胞标志的 C-SrC、 β_2 整合素的 mRNA 上升,在牛皮质片上可以形成吸收陷窝。OPGL 鼠模型显示有严重的石骨症,体内没有 TRAP⁺ 未成熟与成熟的 OC,表明 OC 分化完全依靠 OPGL 表达^[10]。鼠皮下注射重组 OPGL 可以升高血 Ca^{2+} 浓度,减少骨容量,OC 的形成也明显高于对照组。

2. RANK 结合 OPGL 传导 OC 形成信号

RANK 是一个 TNFR 相关蛋白,涉及激活 NF- κ B。所有分离的 OPGL 受体克隆编码 RANK,交联免疫反应表明 OPGL 能特异识别破骨前体细胞上的 RANK^[6]。

RANK 多克隆抗体竞争性激活 RANK,刺激 OC 分化,直接证明 OPGL 在破骨前体细胞发挥活性是经过 RANK。高水平表达 RANK mRNA 的细胞系很容易用 OPGL 分化为 OCLs。sRANK 通过结合 OPG 彻底抑制 OPGL 介导的 OC 形成,表明 RANK 是 OPGL 的唯一信号受体:传导 OC 分化、激活信号。直接皮下给予重组 RANK-Fc 导致剂量依赖性骨密度增加,而 RANK-Fc 转基因鼠则显示与 OPG 转基因鼠非常相似的表现。

3. RANK 在破骨前体细胞内的信号传导

RANK 的信号下游传导涉及 TNF 受体偶连因子(TNFR-associated factor, TRAF)蛋白^[6]。RANK 的胞内域可结合 TRAF2、5、6,研究表明 NF- κ B 和 Fos/AP-1(经过 JNK)在鼠的 OC 发育中均有作用,而 TRAF6 结合 RANK 胞浆部分、介导 NF- κ B 和 JNK 活动,则是发挥作用的根据。还发现高水平表达 RANK 的 RAW264.7 细胞系在 OPGL 处理 5 min 后即可测到激活的 JNK,30 min 快速下降,表明 JNK 是重要的 OC 形成信号传导者^[7]。

4. OPG 抑制 OC 形成与活化

OPG 是影响 OC 分化、成熟,调节骨代谢的关键因子。它被成骨/基质细胞作为局部因子表达,以旁分泌方式在骨微环境中发挥作用。在体外,它特异性地抑制 OC 形成,全身给予 OPG 可以增加骨密度,防止卵巢切除术后诱导的骨丢失。转基因鼠显示在远离骨部位的 OPG mRNA 表达导致骨密度显著增加,抑制 OC 成熟,表现的严重性与肝脏 OPG mRNA 表达及循环 OPG 蛋白水平一致。而 OPG 鼠模型则显示严重骨质疏松,髓部缺乏骨小梁,OC 数量增加^[11]。

OPG 抑制 OC 形成是通过直接结合成骨/基质细胞上的 OPGL,最终干扰 OPGL 与 RANK 之间的信号传递。OPG 充当 RANK 的可溶性竞争者,OPGL 的假受体。抑制发生在 TRAP⁺、 β_2 -整合素⁺的破骨前体细胞水平^[12]。此外,OPG 还通过诱导 OC 凋亡抑制 OC 的存活^[13]。

四、OC 分化的调节及与细胞因子的相互作用

各种全身及局部因子作为间接因子^[14],通过 3 个信号途

径作用于 OB,改变 OPG 与 OPGL 的比例,从而精确调节骨的吸收。OPG 与 OPGL 的适当平衡,是维持正常骨代谢的基础。

1,25-(OH)₂D₃ 和 PTH 在早期就可增加 OPGL,轻度下降 OPG,使 OPGL:OPG 分别达到 6:1 和 2.5:1。IL-11 虽然同时也使 OPG 增加,但 OPGL 上升更多,使二者达到 2:1,OPGL 相对丰富^[15]。PGE₂ 则通过增加 CAMP,降低 OPG mRNA 水平。相对丰富的 OPGL:OPG 是决定 OPGL 行动以及 OB 诱导 OC 形成的关键^[16]。同样,在骨吸收时,由 OC 释放和基质结合 TGF- β_1 产生的酸性微环境,反馈诱导基质细胞分泌 OPG 和抑制 OPGL 表达,从而精确调节骨的代谢和吸收。而 IL-1 α 及 TNF- α 、 β 诱导的 OPG mRNA 水平上升则可以保护高水平 TNF 损伤骨组织^[17]。

五、OC 分化环路的意义

OC 分化环路中的因子,尤其 OPG 和 OPGL 的水平是涉及生理和病理状态下经过 OC 调节骨密度的全身激素和局部因子的最终作用。

OPG 浓度反映骨代谢中年龄相关改变,骨质疏松妇女血清水平增加代表对过量骨吸收的生理反应^[18]。而骨巨细胞瘤^[19]、乳腺癌等的溶骨破坏与 OPG/OPGL 改变有关,在骨关节炎中吸引并活化的 T 细胞则通过分泌 OPGL 直接调节 OC 的形成和成熟 OC 的活性,参与骨代谢^[20]。

因此,随着研究的不断深入,可以彻底揭开骨细胞的代谢过程,进一步阐明骨代谢疾病机理和更有效地治疗骨质疏松、骨肿瘤、骨关节炎等疾病。

参 考 文 献

- 1 Simonet SW, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- 2 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.
- 3 Bateman TA, Dunstan CR, Ferguson VL, et al. Osteoprotegerin mitigates tail suspension-induced osteopenia. *Bone*, 2000, 26: 443-449.
- 4 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.
- 5 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
- 6 Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3540-3545.
- 7 Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, et al. Characterisation of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*, 1998, 273: 5117-5123.

- 8 Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The role of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2000, 15:2-12.
- 9 Atkins GJ, Haynes DR, Geary SM, et al. Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone*, 2000, 26:653-661.
- 10 Kong YY, Yoshida H, Sarosi L, et al. OPGL is a key regulation of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, 397:315-323.
- 11 Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247:610-615.
- 12 Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250:776-781.
- 13 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.
- 14 Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A, et al. Regulation of osteoclast activity. *Life Science*, 1999, 65:1087-1102.
- 15 Tsukii K, Shima N, Mochizuki SI, 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.
- 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, 39:4743-4746.
- 17 Brändström H, Jonason KB, Vidal O, et al. Tumor necrosis factor- α and β upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248:454-457.
- 18 Takai H, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 1998, 273:27091-27096.
- 19 Huang L, Xu J, Wood DJ, et al. Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in giant cell tumor of bone: possible involvement in tumor cell-induced osteoclast-like cell formation. *Am J Pathol*, 2000, 156:761-767.
- 20 Kong YY, Feige U, Sarosi L, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 1999, 402:304-308.

《江苏中医药》2002年征订启事

《江苏中医药》(原名《江苏中医》)创刊于1956年,月刊,为大型综合性中医药学术期刊,国际标准大16开,国际连续出版物,中国中文核心期刊和中医药核心期刊,是国内外权威数据库和文摘杂志的固定收录对象,在国内外医药界具有较高声誉。1992年以来曾两度被评为“全国优秀科技期刊”;两度荣获“江苏省双十佳期刊”称号;连续两届被评为“全国中医药优秀期刊”。《江苏中医药》凭借江苏地区整体中医药学术水平较高的优势,内容质量上乘,读者面不断扩大,发行范围已覆盖全国各地和世界30多个国家和地区。统一刊号ISSN1001—9537/CN32—1630/R。国内代号:28—8;国外代号:M1011。国内定价每册4元,编辑部地址:南京市汉中中路282号,邮政编码:210029。电话:(025)6612950,传真(025)6617285。

重要启事:根据国家科技部批复,决定自2002年起《江苏中医》更名为《江苏中医药》,欢迎读者、作者、各界新老朋友继续关心支持和订阅《江苏中医药》杂志。

《中华物理医学与康复杂志》已改由

华中科技大学同济医学院附属同济医院承办

根据中华医学会医社发[2001]5号文件精神,将《中华物理医学与康复杂志》与《中华理疗杂志》合为一刊,合刊后刊名为《中华物理医学与康复杂志》,刊期改为月刊。原《中华理疗杂志》刊名自然取消。经中华医学会杂志社组织的“重新确定《中华物理医学与康复杂志》承办单位评议组”的评议及中华医学会编辑工作委员的审议,决定从2002年第1期起,由华中科技大学同济医学院附属同济医院承办《中华物理医学与康复杂志》(中华医学会医社发[2001]5号文件)。

合刊后的《中华物理医学与康复杂志》将秉承原刊物的优良传统。作为中华医学会主办的唯一一本本专业的高水平学术刊物,继续坚持理论与实践并重的原则,重在提高,兼顾普及。热诚欢迎广大同仁惠寄各类稿件,包括物理因子治疗以及其他各类康复治疗的论著、综述、实验研究报告、经验交流、病例报告等稿件。同时欢迎垂询广告业务,欢迎订阅。

本刊新的联系地址为:武汉市解放大道1095号(同济医院内)《中华物理医学与康复杂志》编辑部;邮政编码:430030;

电话:027-83662874; Email: pmr@tjh.tjmu.edu.cn.