

·综述·

OPG/OCIF:一种新发现的骨保护因子

黎慧清 陈璐璐

骨是一个有生命的器官,骨形成及骨吸收所致的骨改建贯穿着生命始终。成骨细胞和破骨细胞的活动及其相互作用决定骨形成和骨吸收之间的平衡,而其作用受全身激素及局部细胞因子调节,但其具体调节机制一直不甚明了。直至最近,OPG及其配体 OPGL 的发现才将人们对于破骨细胞分化及功能的调节机制的认识向前推进了一大步。

1997年,WS Simonet等在胎鼠小肠 cDNA 文库中克隆出一种新的 TNF 受体家族成员,具有降低破骨细胞分化和增加骨密度的功能,其在转基因鼠中的肝脏表达可导致骨质硬化,故命名为 OPG——骨保护素(Osteoprotegerin)^[1]。与此同时,E Tsuda 等亦从人胚胎纤维母细胞株 IMR90 的条件培养基中分离出来一种新的肝素结合蛋白,可特异性抑制破骨细胞生成,命名为 OCIF——破骨细胞生成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitory factor)^[2]。随后 Tan 等也发现一 TNF 受体家族新成员,命名为 TR1——TNF 受体样分子 1(TNF receptor-like molecule 1)^[3]。DNA 测序分析证明,TR1 与 OPG、OCIF 为同一种物质^[4]。

一、OPG 的基因序列

Morinaga T 利用 Southern 杂交证实人 OPG 为单拷贝基因,其序列全长 29 kb,包括 5 个外显子。转录起始部位有 3 个。信号最强的在转录起始区上游的 -67 个核苷酸处,命名为转录起始部位 1(TIS1),较弱的两个分别在 -646(TIS2)及 -667(TIS3)个核苷酸处。核苷酸保护分析证实 mRNA 多从 TIS1 开始转录。第一个外显子编码信号肽的 10 个氨基酸残基。外显子 2 编码 OPG 半胱氨酸富含区的前两个及第 3 个的 73%,外显子 3 编码第 3 个半胱氨酸富含区的剩余部分及第 4 个的全部。这一点不同于 TNF 受体家族其它成员,后者每个半胱氨酸富含区由 1 个外显子编码,中间由内含子分离。OPG 包含两个 DDH(死亡段同源区),分别由外显子 4、5 编码^[5]。

二、OPG 的表达

OPG 的转录产物有 4 种,长度分别为 2.4、4.2、6.5、3.0 kb。其中 2.4 kb 的 mRNA 为主要的一种转录产物,编码 401 个氨基酸。除外周血淋巴细胞外,几乎在人的所有组织中均可检测到其存在^[1]。原位杂交分析结果显示,OPG 转录产物高度表达于胚胎鼠发育骨组织软骨原基周围,尤以上颌骨、下颌骨、舌骨、蝶底座、枕骨底部、肋骨、椎骨显著。在头臂动脉及导管动脉、左主支气管、腹主动脉、中肠中 OPG 亦有高水平表达。Northern 杂交发现鼠的许多组织中如肝、脾、心、肾

存在 3.0 kb 的 OPG 转录产物。

三、OPG 的结构

OPG 为一分泌型糖蛋白,由 401 个氨基酸残基组成,其中包括 21 个氨基酸残基形成的信号肽。OPG 主要有 7 个区段,与 TNF 受体家族成员蛋白构成极其相似,但其缺乏疏水跨膜区。第 1~4 个区段为半胱氨酸富含区,具有 TNF 受体家族成员细胞外部分的典型特征,此部分在抑制破骨细胞活性方面起重要作用。第 5、6 区段各含一个 DDH(死亡段同源区),为唯一的一条多肽中含有两个 DDH 的蛋白质。DDH 与抑制破骨细胞形成、肝素结合或形成二聚体无关,但其缺失可导致 OPG 生物活性显著下降。第 7 个区段为肝素结合区域,然而 OPG 与肝素的结合在体外实验中未发现有何特殊意义,可能在体内具有某种重要生物学意义^[6]。

OPG 可以单体或二聚体的形式存在,第 7 区段为 OPG 形成二聚体的部位。WS Simonet 等认为,OPG 单体(分子量为 55 kd)首先在细胞内合成,两条单体的第 400 个氨基酸—半胱氨酸之间(Cys⁴⁰⁰)形成二硫键,即组成同型二聚体(分子量为 110 kd)。然后二聚体被分泌至胞外,亦有少量单体分泌^[1]。但 A Temoyasu 认为单体可能由二聚体裂解产生。单体及二聚体在稳定性、特异抑制破骨细胞形成、唾液酸含量方面无差异。但二聚体与肝素结合及降低血钙能力更强,故在治疗与破骨细胞形成有关的骨质疏松症方面可能更有效^[7]。

四、OPG 的功能

1. 对破骨细胞形成的影响

1997年,E Tsuda 等发现 OPG/OCIF 可特异抑制 1.25(OH)₂D₃、PTH、IL-11 三种不同途径所诱导的破骨细胞形成。1.25(OH)₂D₃ 及 PTH 可诱导小鼠骨细胞形成破骨细胞样细胞,但若培养体系中加入 1~40 ng/ml 的 OCIF,则破骨细胞样细胞形成受抑制。同样剂量的 OCIF 亦可抑制小鼠脾细胞形成破骨细胞样细胞。IL-11 在小鼠脾细胞及 PA6 细胞共培养体系中可促使破骨细胞样细胞形成,而 OCIF 则使其形成率下降^[1]。WS Simonet 在鼠脾细胞培养诱导破骨细胞形成的实验中亦发现若加入重组 OPG,则破骨细胞形成减少^[1]。

2. 对成熟破骨细胞功能的影响

体外实验发现 OPG/OCIF 可以抑制成熟破骨细胞在骨表面形成吸收陷窝的能力。在胎鼠长骨组织培养体系中,OPG/OCIF 可抑制 1.25(OH)₂D₃、PGE₂、PTH 及 IL-1α 引起的钙释放^[8]。此外还有研究发现,OPG/OCIF 可以促进成熟破骨细胞凋亡,这一效应可被 caspase3 的特异性抑制剂所抑制^[9]。

作者单位:430022 武汉,同济医科大学附属协和医院内分泌科

3. 对整体动物的影响

WS Simonet 利用转基因技术制造出可表达 OPG 的老鼠,发现其骨密度较对照组明显增加,甚至出现骨质硬化,并且其硬化程度与 OPG 及 OPGmRNA 的水平呈正相关。给予正常老鼠注射重组 OPG,其骨量增加。此外,重组 OPG 可对抗老鼠去势后所造成的骨丢失。重组 OPG 治疗鼠与对照组相比其骨体积增加,破骨细胞数量减少。

Mizuno 等发现 OPG/OCIF 基因敲掉的小鼠 13 周龄时股骨中无骨小梁形成,其骨量及骨应力均较野生型同窝鼠显著降低,破骨细胞数量明显增加^[10]。Bucay N 的研究亦证实此点^[11]。同时有不同学者发现,正常大、小鼠,患恶性肿瘤所致的高钙血症的裸鼠,增加 OPG 含量可迅速降低血钙水平(24 h 内)^[12]。

4. ODF 的发现及 OPG/OCIF 作用机理

1998 年 DL Lacey 及 H Yasuda 等分别同时发现 OPGL (OPG 的配体 Osteoprotegerin ligand)/ODF (破骨细胞分化因子 Osteoclast differentiation factor)——又被称作“TRANCE (TNF 相关的活化诱导因子 TNF-related activation-induced cytokine)”^[13]及 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)^[14], TNF 家族的一员。OPGL/ODF 表达于多种组织,在发育的骨骼中,由软骨基质周围的间充质细胞合成,在体外也可由被激活的具有诱导破骨细胞分化潜能的成骨/基质细胞株 MC3T3、ST2 产生。其通过激活破骨细胞膜上相应受体 RANK 影响破骨细胞分化及功能^[15-17]。MW Julian 等发现 OPGL/ODF 与 M-CSF 协同作用不需要成骨/基质细胞可直接诱导人和小鼠体外破骨细胞形成,并支持其存活^[18]。当两者与单核破骨细胞混合培养时,破骨细胞融合明显增加。此外,OPGL/ODF 还可促使骨陷窝形成。以上证据表明 OPGL/ODF 参与破骨细胞形成的全过程:分化、融合、生存、激活^[19,20]。而 OPG/OCIF 作为 ODF 的假诱导性受体 (decoy receptor) 主要通过 ODF 结合,竞争性抑制 ODF 与破骨细胞上受体 RANK (receptor activator of NF- κ B) 结合,从而消除 ODF 对于破骨发生的各阶段的作用,抑制骨吸收,增加骨量,降低血钙水平。

除上述途径外, Y Hakeda 等发现 OPG/OCIF 可直接抑制游离成熟破骨细胞的骨吸收活性。他利用破骨细胞较其他细胞吸附性更强这一特点分离出成熟破骨细胞,其 TRACP 阳性率超过 95%,其余细胞主要为造血细胞。然后使用¹²⁵I-OPG 单体(分子量为 60 kD)进行交叉连接 (cross-linking) 实验,发现破骨细胞上有一蛋白可与 OPG 结合。交叉连接带总分子量为 200 kD,故此蛋白分子量为 140 kDa,不同于 ODF 分子量(40 kD)。而且由于培养体系中不存在成骨/基质细胞,破骨细胞中也无 ODF 表达,故可认为此连接蛋白非 ODF, OPG 对成熟破骨细胞下调机制可能通过这种 140 kD-OPG 连接蛋白起作用。此外, Y Hakeda 还发现 OPG 可抑制成熟破骨细胞 f-肌动蛋白环形成,其抑制作用在加入 4 h 后即开始,并逐渐增强直至 24 h。f-肌动蛋白为细胞骨架结构, f-肌动蛋白环形成成为骨吸收先导。因此, OPG 抑制 f-肌动蛋白环形成可能为其抑制骨吸收机制之一^[21]。

5. 其他

如前所述, OPG 表达于多种组织器官,其中作用尚不明,但可能不仅限于中和 OPGL。如, OPG 作为 TRAIL 受体,在体内实验中可抑制后者介导的细胞凋亡^[22]。由于 OPG 存在于肠、肾、骨中,故可能与钙磷转运及平衡有关^[1,23]。OPG 还可能是血管钙化的生理性抑制剂,因为 OPG 基因缺失鼠出现主动脉及肾动脉钙化,钙化动脉中发现骨基质蛋白和无机矿物质存在^[11],此现象与人类血管钙化和骨质疏松常合并存在的现象一致^[24],说明 OPG 或其配体信号途径可能在骨质疏松及血管钙化相联系的现象中起作用。Kong YY 在研究 OPGL 基因缺失鼠时发现 OPGL 可调节淋巴结形成及淋巴细胞分化^[25], OPG 作为其假活性受体是否参与其中尚需进一步研究。

五、OPG 表达的影响因素

多种激素及细胞因子可影响破骨细胞形成及功能,研究表明其中大多数可调节 OPG 表达。T Murakami 等使用 Northern 杂交半定量分析发现 1, 25(OH)₂D₃、PGE₂ 及 PTH 可分别降低原始成骨细胞 OPGmRNA 水平至正常值的 57%、64%、34%。Dexamethasone 开始促 OPGmRNA 水平下降,随后(24 h 后)促其水平增加 30% 左右。便在 ST₂ 细胞中, Dexamethasone 促其表达下降^[26],与 H Yasuda 研究结果一致^[17]。O Vidal 等亦发现糖皮质激素可降低人成骨细胞样细胞及骨髓基质细胞 OPG 表达水平。而在同样条件下,雌激素、雄激素不影响其表达水平^[27]。H Brandstrom 等利用 RNA 酶保护分析发现 PGE₂ 可导致 OPGmRNA 水平下降,并呈时间、剂量依赖关系^[28]。上述研究结果表明全身性激素除可能直接作用于破骨细胞外,还可能通过调节成骨/基质细胞的 OPG 表达发挥作用。

细胞因子对骨吸收的影响亦可通过调节 OPG 表达来实现。T Murakami 证实 IL-1 α 可降低原始成骨细胞 OPGmRNA 水平, TGF- β 可促成骨/基质细胞 OPG 的表达^[26]。H Brandstrom 等发现 TNF- α 、 β 促使人骨肉瘤细胞株 MG-63 中的 OPGmRNA 水平升高^[28],而 O Vidal 等亦证明 MG-63 及人成骨细胞样细胞中 OPGmRNA 可被 IL-1 α 减少,而 IL-6 对 OPG 表达无影响^[29]。

除上述影响因素外, Yasuda H 发现钙离子可诱导成骨/基质细胞中 OPG 基因表达^[16]。K Yano 等人研究发现 OPG 血清浓度在正常日本男性及女性中均随年龄增加而增加,且在绝经妇女中明显上升,远超过未绝经组妇女。骨质疏松组中较低骨量组 OPG 血清含量高于较高骨量组。OPG 浓度在骨高转换率的绝经后妇女中亦明显升高,提示 OPG 可能受某种年龄相关因素调节,而且 OPG 增加可能为一骨吸收增强的代偿机制^[30]。

TRAIL 为一 TNF 相关配体,可促使细胞凋亡。OPG 为其第五个受体,可抑制其促细胞凋亡作用,同时 TRAIL 亦可阻断 OPG 的抑制破骨生成作用,说明两者存在相互调节机制^[22]。

六、OPG 的应用前景

S Morony 等发现给予老鼠注射人重组 OPG 的 Fc 嵌合体 (cOPG), 可预防 IL-1 β 、TNF α 、PTH、PTHrP、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 所致的高钙血症及骨吸收亢进, 并可维持破骨细胞数量在正常范围^[31]。此实验中 OPG 的抗骨吸收效应是短期的, 但转基因鼠中 OPG 过度表达呈持续性, 且骨吸收被抑制达 10 周以上^[1], 提示 OPG 的持续作用是可能的。因此治疗甲状旁腺功能亢进、恶性肿瘤、骨质疏松及骨的炎性疾病中, OPG 可能成为一种新的治疗选择^[31]。

参 考 文 献

- 1 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89:309-319.
- 2 Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234:137-142.
- 3 Tan KB, Harrop J, Reddy M, et al. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*, 1997, 204:35-46.
- 4 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.
- 5 Morinaga T, Nakagawa N, Yasuda H, et al. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *Eur J Biochem*, 1998, 254:685-691.
- 6 Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. Characterization of structured domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*, 1998, 273:5117-5123.
- 7 Tomoyasu A, Goto M, Fujie N, et al. Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245:382-387.
- 8 Tsukii N, Shima N, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$, prostaglandin E $_2$, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 246:337-341.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12:1260-1268.
- 12 Akatsu T, Murakami T, Ono K, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) exhibits hypocalcemic effects in normal mice and in hypercalcemic of malignancy. *Bone*, 1998, 23:495-498.
- 13 Wong BR, Rho J, Arron J, et al. Trance is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*, 1997, 272:25190-25194.
- 14 Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997, 390:175-179.
- 15 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93:165-176.
- 16 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.
- 17 Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253:395-400.
- 18 Quinn JMW, Elliott J, Gillespie MT, et al. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation *in vitro*. *Endocrinology*, 1998, 139:4424-4427.
- 19 Jinai E, Akiyama S, Tsurukai T, et al. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces fusion, survival and activation of osteoclasts. Second joint meeting of the ASBMR and the IBMS. San Francisco, CA, 1998. s222.
- 20 Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, et al. Osteoblasts/stromal cells activate osteoclast function through osteoclast differentiation factor (ODF). Second joint meeting of the ASBMR and the IBMS. San Francisco, CA, 1998. s220.
- 21 Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251:796-801.
- 22 Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*, 1998, 273:14363-14367.
- 23 Reddi AH. Bone morphogenesis and modeling: soluble signals sculpt osteosomes in the solid state. *Cell*, 1997, 89:159-161.
- 24 Banks LM, MacSweeney JE, Stevenson JC. Effect of degenerative spinal and aortic calcification on bone density measurements in postmenopausal women: links between osteoporosis and cardiovascular disease? *Eur J Clin Invest*, 1994, 24:813-817.
- 25 Kong YY, Yoshida H, Sarosi L, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, 397:315-323.
- 26 Morakami T, Yamamoto Michiko, Yamamoto Mikio, et al. Transforming growth factor- β increase mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 252:747-752.
- 27 Vidal O, Brandstrom H, Jonsson KB, et al. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinology*, 1998, 159:191-195.
- 28 Brandstrom H, Jonsson KB, Vidal O, et al. Tumor necrosis factor- α and- β upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248:454-457.
- 29 Vidal O, Sjogren K, Eriksson BI, et al. Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 α in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 248:696-700.
- 30 Yano K, Tsuda E, Washida N, et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:518-527.
- 31 Morony S, Capparelli C, Lee R, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF α , PTH, PTHrP and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *J Bone Miner Res*, 1999, 14:1478-1485.