

细胞因子 RANKL 对破骨细胞的分化调节作用

谢东北 刘锡仪 郭惠兰

骨是一个代谢活跃的器官,在整个生命周期中都在进行不断的更新与改建。其形态发生和重建由两个对立统一的过程所控制:破骨细胞(ostoclast, OC)介导的骨吸收过程和成骨细胞(osteoblast, OB)介导的骨基质合成过程。OC、OB 之间功能的失调将导致骨骼形态结构的异常,如骨质疏松时骨量减少,而骨硬化症时骨量增多。Udagawa 等^[1]首次发现,许多激素、细胞因子影响 OC 的分化、激活,而这种作用是由 OB/ST 介导的,并且是通过细胞膜与细胞膜的直接接触或旁分泌机制而实现的^[2,3],但其分子学基础一直不清楚。Suda 等^[4]提出一种假设:OB/ST 表面存在一种能使 OC 分化与激活的分子,该分子的表达受骨吸收相关因子的调控,将其命名为破骨细胞分化因子(osteoclast differential factor ODF)。近几年,若干实验室相继报道了一种新的肿瘤坏死因子配体成员:OPGL(osteoprotegerin ligand)^[5]、TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine)^[6]、RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)^[7],经比较发现它们是同一种分子。OB/ST 对 OC 的发生、激活等作用就是由它来介导的。其生物学功能符合 Suda 当年假设的 ODF 分子。令人意外的是,激活的 T 细胞也能介导 OC 的发生、分化与激活,其分子基础也是 OPGL^[8]。风湿性关节炎、哮喘、慢性病毒感染如丙型肝炎、HIV 以及某些肿瘤如前列腺癌和乳腺癌等疾病过程中都有骨密度的减小和 T 细胞的激活。这表明,该分子不仅是 OC 分化、激活的重要因子,而且在免疫系统有着重要的作用。这一发现使人们对骨细胞与免疫系统之间的内在联系产生浓厚的兴趣,有人为此提出一个新的名词:骨免疫学(osteimmunology)^[9]。笔者就 RANKL 的研究近况作一简要介绍。

一、发现回顾

Simonet 等^[10]于 1997 年发现了一种能阻断 OC 的正常发生与活化,也能阻断病理性状态下 OC 的数量增多及功能增强的分泌性蛋白质,与 TNFR 具有高度同源性,作者将其命名为 osteoprotegerin(OPG),意为对骨具有保护作用。作者提出 OPG 可能是作为圈套受体(decay receptor)通过中和了一种能促使 OC 分化和活化的细胞因子而起作用。随后 Lacey 等^[5]用重组的 OPG-Fc 融合蛋白作免疫探针探查不同细胞系上的 OPG 结合蛋白,也在鼠类骨髓单核细胞系 32D 上有 OPG 结合分子的表达,并将其克隆成功,并确认它就是 OPG 的配体 OPGL。几乎同时 Yasuda 等^[11]发现,OPG 能结于 1, 25(OH)₂D₃ 和地塞米松刺激后的 ST₂ 细胞(为来源于小鼠的骨

髓基质细胞,在体外能支持破骨样细胞的形成)上,而没有受这种刺激的 ST₂ 细胞则没有这种分子的表达。作者同时发现,ST₂ 细胞上 OPG 结合位点被 OPG 全部占据后,ST₂ 支持 OC 形成的能力就消失了。这说明 ST₂ 细胞受刺激的后表达的这种分子是 OPG 的配体 OPGL,而正是 OPGL 介导了 OC 的发生。OPG 对破骨细胞的抑制效应正是通过阻断 OPGL 的作用来实现的。OPGL 是 OC 与 OB 之间膜接触的分子基础。cDNA 的序列比较表明,OPGL 和 Wong 等^[5]于 1997 年在筛选 T 细胞杂交瘤凋亡基因时发现的 TRANCE 及 Anderson 等^[7]在研究树突状细胞与 T 细胞相互关系时发现的 RANKL 为同一分子。美国骨与骨矿协会推荐使用 receptor activator of NF- κ B(PANK)作为膜上受体分子的名称,其配基则相应称为 RANKL,而其圈套受体(decay receptor)称为 osteoprotegerin(OPG)。

二、RANKL 的结构特点和表达分布

1. RANKL 的结构

RANKL 基因有较长的开放读码框,利用 CMV 作为启动子。鼠类的 RANKL 基因编码是一个含 316 个氨基酸残基的二型跨膜蛋白,人的编码则是 317 个氨基酸。49~59 之间的氨基酸残基为疏水性,推测其为跨膜片端;细胞内有较短的 N 末端。(含 48 个氨基酸残基);细胞外有较长的 C 末端(含 247 个氨基酸残基),C 末端的 160 个氨基酸残基构成活性配体结构;人的 RANKL 基因定位于 18q22.1^[5,7];T 细胞上 RANKL 基因的表达受抗原受体活化的诱导,由 calcineurin 调节的转录因子所调控^[6]。鼠 RANKL 与人的相比,氨基酸顺序有 85%~87%是一致的。RANKL 分子为膜结合蛋白,以三聚体的形式存在。金属蛋白酶可将其胞外部分水解下来而成为可溶性分子;膜结合的 RANKL 比可溶性的 RANKL 对 OC 的发生具有更强的作用^[12,13]。

2. RANKL 的表达分布特点

RANKL 主要在骨组织和免疫系统以及肺组织中^[11]。在胎盘、心脏、外周血白细胞、骨骼肌、胃及甲状腺中有弱表达^[7]。原位杂交表明,RANKL 在中枢免疫器官和外周免疫器官都有表达。小鼠胚胎从 15.5 天开始,RANKL 表达细胞局灶性出现于脾骨髓、胸腺髓质;在淋巴结则呈弥漫性表达。成年后这些组织同样有 RANKL 的表达。在骨组织中的表达分布与 OC 的功能活跃区的分布是一致的,主要存在于骨的构建与重建部位:软骨原基周围的原始间充质细胞和原基内部的肥大软骨细胞;长骨发育过程中的骨化中心及生长板软骨;在成年骨中,初级海绵体、长骨骨髓端的梭形间充质细

作者单位:524023 广东 湛江,广东医学院组胚教研室(谢东北、郭惠兰);生理教研室(刘锡仪)

胞上有高表达。在骨干和骨外膜处的间充质细胞则不见有表达^[6]。

三、RANKL 分子的功能

1. RANKL 对免疫系统的作用

Kong YY 等^[8]发现 RANKL 不但是 OC 的分化因子,而且是免疫器官的发育、免疫细胞的分化及 T、B 淋巴细胞之间的相互作用的重要调节因子。

(1) 对淋巴器官发育的影响

RANKL 基因敲除的小鼠淋巴结完全缺乏,而且淋巴结原基样的早期组织都不存在,但脾结构和集合淋巴小结却是正常的^[8]。这表明 RANKL 对淋巴结的发育具有特殊的必不可少的作用。RANKL 在淋巴结形态发生中的作用显然不同于 LT β R 和 TNFR-1,其调节淋巴结形态发生的细胞机制以及淋巴结与集合淋巴小结在发生上的内在联系尚需进一步阐明。

(2) 对 T 细胞发育的影响

RANKL 在 CD $_4^+$ CD $_8^-$ 的前 T 细胞上有表达^[7],且 RANKL 基因敲除小鼠前 T 细胞其表型在从 CD $_4^+$ CD $_8^-$ CD $_{44}^+$ CD $_{25}^+$ 向 CD $_4^+$ CD $_8^-$ CD $_{44}^+$ CD $_{25}^-$ 转化受阻,这说明肿瘤坏死因子 RANKL 在 T 细胞发育早期起着重要的作用。令人意外的是,RANKL 基因敲除的小鼠并不出现任何明显的 T 细胞发育异常,这是 RANKL 基因敲除小鼠和 RANK 基因敲除小鼠唯一可觉察的区别,提示 RANKL 在早期 T 细胞发育过程中可能作用于不同于 RANK 的另一受体^[14,15]。

(3) 在 B 细胞发育过程中的作用

RANKL 基因或 RANK 基因敲除小鼠的脾和淋巴结中具有 B $_{220}^+$ IgD 和 B $_{220}^+$ IgM 标志成熟的 B 细胞数量减少,初级脾小结中 B 细胞的组织排列也轻度紊乱^[8,16]。进一步的研究发现 RANKL 能调控具有 B $_{220}^+$ CD $_{43}^+$ CD $_{25}^+$ 表型的原 B 细胞向具有 B $_{220}^+$ CD $_{43}^+$ CD $_{25}^+$ 表型的前 B 细胞的转化,表明 RANKL 是 B 细胞早期分化的调节因子^[8]。但前 B 细胞上是否直接有 RANKL 和 RANK 的表达,抑或在骨髓来源的基质细胞上表达,目前还不清楚;RANKL 是作为早期 B 细胞和 T 细胞发育的必需存活因子,还是直接影响抗原受体驱动的淋巴细胞成熟过程,还有待进一步的研究。

(4) 对树突状细胞的作用

树突状细胞(dendritic cell, DC)是抗原递呈细胞。树突状细胞、T 细胞、B 细胞的相互接触启动相应的免疫反应^[14,15]。携带抗原的树突状细胞与处女型抗原特异的 T 细胞直接接触后迅速消失。树突状细胞在完成向 T 细胞的抗原递呈后必需有效的清除以避免过度的免疫反应。其生命周期的长短是免疫耐受、慢性炎症的重要调控点。在组织培养中,分化的树突状细胞迅速凋亡,但激活的 T 细胞表达或分泌的一些肿瘤细胞坏死因子如 CD $_{40}$ L、RANKL 能延迟其凋亡的发生。提示树突状细胞和 T 细胞间的通讯控制着免疫反应的进行。T 细胞表达的 RANKL 与 DC 表达的 RANK 之间的相互作用介导了 DCs 的存活,这一过程与 Bcl-XL 的表达和 DC 上共刺激分子 CD $_{40}$ 的上调表达有关^[7]。最近的研究表明,RANKL 通过

成熟 DC 的 TRAF6、c-Src 等信号复合分子激活抗凋亡的 serine/threonine 激酶 Akt/Pkb。RANKL 不但激活 Akt/Pkb,而且 NK-KB 和 ERK 也被激活。Akt/Pkb、NK-KB 和 ERK 抑制凋亡诱导途径从而延长细胞存活。RANKL 介导的 DC 存活至少部分与这些抗凋亡分子的激活有关。给小鼠注射经 RANKL 处理的 DC 能增强抗原特异的 T 细胞的初次应答和回忆反应的强度。这可能与增加/改变了细胞因子的分泌表达有关。

2. 对骨及骨细胞的作用

(1) RANKL 是破骨细胞的分化因子

在 M-CSF 同时存在时,RANKL 呈剂量依赖式地增加骨髓细胞培养中 OC 的形成、其半数有效量约为 1 ng/ml。M-CSF 单独作用时只有大量的单核细胞形成而不见有 TRAP 阳性细胞的形成,在骨片上也不出现骨吸收陷窝;RANKL 单独作用时,也不能形成骨吸收陷窝;而两者同时作用时,不但形成丰富的、体积巨大的 OC,而且在骨片上出现大量的骨吸收陷窝;两者联合作用时能迅速使 OC 前体细胞表达为 OC 的标志性蛋白质,如降钙素受体、av β_3 integrin、溶酶体酶如 TRAP 和 cathepsin K 等,说明 RANKL 和 M-CSF 两者对 OC 的分化都是必需的^[5,17]。RANKL 和 M-CSF 能完全取代成骨细胞或骨髓基质细胞的作用,在体外能使脾细胞和外周血单核细胞分化成破骨细胞^[11,18];组织学证据表明 RANKL 基因敲除的小鼠体内完全缺乏 OC。其原因是成骨细胞不能支持破骨细胞的发生,而不是 OC 内在的缺陷。小鼠两天后即出现明显的骨硬化症,牙齿萌出缺陷,并出现生长迟缓现象,从整体上也说明体内破骨细胞的发生,激活受阻。但在 RANKL 和 M-CSF 的存在下,这种小鼠的造血前体细胞在体外能分化成表型和功能都正常的破骨细胞^[8]。

(2) RANKL 能直接激活成熟的破骨细胞

体外培养实验表明,RANKL 在 1 ng/ml 浓度下 OC 对皮质骨的吸收能力即开始增加,在 10 ng/ml 时其效果达顶峰^[5]。Burgess 等^[16]也发现,OPGL 处理的 OC,在骨片上的骨吸收面积增加 7 倍以上,但是单个的骨吸收陷窝的面积并不增大。当 RANKL 特导性地结合到成熟的破骨细胞,30 min 内就可诱导细胞骨架重排,形成肌动蛋白环,为骨吸收作好准备。

3) 对钙代谢的影响

小鼠皮下注射重组 RANKL,1 d 后血中钙离子浓度即显著升高,升高幅度与注射剂量成正比。每天注射两次,3 d 后小鼠出现严重的高钙血症,并且可见股骨远端出现骨量减少。OC 的数量与对照组相比虽无变化,但其体积增大,核的数量也增多^[5]。静脉内注射 RANKL,以血钙水平代表 OC 的活化程度,发现低钙饮食的小鼠注射 RANKL 1h 后,血钙浓度即显著增加,说明血钙浓度的升高是 RANKL 激活成熟的 OC 使骨吸收增多所致,这种效应的出现不需要 M-CSF 的存在^[16]。

四、RANKL 的信号转导途径

RANKL 的受体是 RANK^[7,18]。RANKL 与其结合后通过细胞内不同的信号转导途径而激活 NF- κ B 和 JNK^[14,15]。NF- κ B 和 JNK 的表达增强对 OC 的分化、激活^[19],DC 的存活^[7],T

细胞依赖的免疫反应都有重要的作用^[6]。RANK 介导的 NF- κ B 和 JNK 活化需要 RANK 胞内部分提供 TRAF(TNF receptor-associated factor)的结合位点。RANK 胞内域不同位点与相应的 TRAF 结合后有不同的信号传导途径。目前发现能与 RANK 结合的只有 TRAF₆、TRAF₂ 和 TRAF₃ 3 种, RANK C 末端的 547~581 位氨基酸残基之间是 TRAF₂ 和 TRAF₃ 的结合部位; TRAF₆ 的结合部位则在 RANK 胞内域的中部, 位于 336~454 位氨基酸残基之间^[19]。有的报道略有差异^[19]。

五、小结与展望

RANKL 及其受体 RANK 的发现, 明确了 OB、OC 之间的分子作用基础; RANKL 及其受体在免疫器官和免疫细胞发生中的作用以及对免疫细胞间相互作用的调节功能说明它在免疫系统中也扮演了重要的角色。对其生物学功能的进一步研究对于理解骨质疏松症、伴骨质异常的一些疾病如类风湿性关节炎、Paget's 病、某些病毒性疾病如病毒性肝炎、HIV 病以及某些肿瘤如前列腺癌和乳腺癌的病理的过程有重要的作用, 进而为新一代药物的研究打下理论基础。

参 考 文 献

- 1 Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7260-7264.
- 2 Suda T, Udagawa N, Nakamura I, et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factor. *Bone*, 1995, 17(Suppl 2): 87S-91S.
- 3 Jimi E, Nakamura I, Amano I, et al. Osteoclast function is activated by osteoclastic cell through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology*, 1996, 137: 2187-2190.
- 4 Suda T, Tadahashi N, Martin T. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*, 1992, 13: 66-80.
- 5 Lacey D, Timms E, Tan H, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
- 6 Wong B, Rho JJ, Arronet J et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates C-Jun N-terminal kinase in T cell. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25190-25194.
- 7 Anderson D, Maraskovsky E, Billingsley W et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997, 390: 175-179.
- 8 Kong Y, Yoshida H, Sarosi L et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, 397: 315-323.
- 9 Arron JR, Yongwon C. Bone versus immune system. *Nature*, 2000, 408: 535-536.
- 10 Simonet WS, Lacey D, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- 11 Yasuda H, Dhima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3597-3602.
- 12 Makashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappa B ligand: modulation of the expression by osteotropic factor and cytokines. *J Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275: 768-775.
- 13 Willard D, Chen W, Barrett G, et al. Expression, purification, and characterization of the human receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) extracellular domain. *Protein Expr Purif*, 2000, 20: 48-57.
- 14 Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, 392: 245-252.
- 15 Grouard G, Durand I, Filgueiral L, et al. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centers. *Nature*, 1996, 384: 364-367.
- 16 Burgess T, Yi X, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Biol Chem*, 1999, 274: 527-538.
- 17 Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, et al. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Bone Miner Metab* 2000; 18: 177-184.
- 18 Takeshita S, Kajik K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *Bone Miner Res*, 2000, 15: 1477-1488.
- 19 Hailing H, Lacey D, Dunstan C, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediated osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3540-3545.

(收稿日期: 2002-01-08)