

破骨细胞的局部调节机制

迟志永 韩纲 综述 王岩 审校

我国已逐渐进入“老龄化社会”,原发性骨质疏松将成为常见多发病。由于骨质疏松常引发骨折等严重的并发症,将使家庭和社会因此承担极大的经济负担。破骨细胞的分化形成与活性对于骨质的正常代谢、再塑形与骨吸收性疾病均起着重要的作用。破骨细胞是由单核/巨嗜细胞系干细胞分化形成的多核巨噬细胞^[1-3]。一些全身性激素类刺激因子对于破骨细胞形成和活性有促进作用,其中包括:1,25二羟基维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]、甲状旁腺激素(PTH)、前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-11等^[4],骨微环境中成骨细胞/骨间质细胞则起着重要的细胞间调节作用,破骨细胞的体外培养证实:对于破骨细胞的分化形成和活性调节,这两者均是必不可少的。细胞间相互作用通常有以下两种方式:一种是产生可溶性因子,另一种是细胞之间的细胞-细胞接触识别^[5-7]。直至近十年,通过破骨细胞体外培养与基因敲除技术的应用,人们逐渐发现了巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、骨保护蛋白/破骨细胞形成抑制因子(Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis Inhibitory Factor,简称OPG/OCIF)及OPG/OCIF的配基/破骨细胞分化因子(Osteoprotegerin Ligand/Osteoclast Differentiation Factor/TNF-related activation-induced cytokine/receptor activator of NF- κ B ligand,简称OPGL/ODF)等细胞间作用物。本文作者仅就成骨细胞/骨间质细胞的这三种细胞因子的国外研究进展加以概述。

一、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)

巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)是目前发现的、重要的可溶性破骨细胞调控因子之一。它对于破骨细胞前体的增殖与分化及成熟破骨细胞的存活均是必需的^[8-10]。

1982年,Wiktor-Jedrzejszak等^[10]针对op/op小鼠遗传性骨质致密症的发病机理首先提出:因为造血间质细胞不能释放M-CSF,从而导致骨质内局部微环境的改变,并使得破骨细胞形成减少、骨吸收减低与骨质增加。这一论点随后被以下实验所证实。1990年,Yoshida等^[11]报告了op/op小鼠的基因突变是在M-CSF的编码区插入了一个碱基对,而这一支架突变型突变导致无法产生有功能的M-CSF。Felix等^[12]将人重组M-CSF注射给op/op小鼠可缓解骨吸收减少等症状,并可诱导形成骨髓腔。Takahashi等^[13]取op/op小鼠的成骨细胞与正常的脾细胞体外培养,不能形成破骨细胞;相同条件下,加入M-CSF与1,25(OH)₂D₃后形成破骨细胞^[13]。上述关于骨质致密症与op/op小鼠的研究表明,M-CSF是在间

质细胞/成骨细胞内形成的,并对破骨细胞分化形成起到重要作用^[13,14]。

在此基础上,Takahashi等^[13]进一步发现:M-CSF对于体外培养的前4天(破骨细胞前体增殖期)不具有特异性,可为粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、IL-3所替代,然而M-CSF的作用远胜过后两者;对于后2天(破骨细胞分化期)具有特异性,GM-CSF、IL-3不能替代。这说明M-CSF在破骨细胞数量的维持与分化形成阶段,均起到不可替代的作用。Fuller等报道了M-CSF可延长成熟破骨细胞的寿命,将破骨细胞加入M-CSF孵育24h后可较长时间地维持破骨细胞的表现型,这表明M-CSF可调节破骨细胞的活性。但M-CSF作用于破骨细胞前体的信号传递方式尚未有明确报道。

二、骨保护蛋白/破骨细胞形成抑制因子(OPG/OCIF)

1997年,Simonet等^[15]对骨保护蛋白/破骨细胞形成抑制因子(OPG/OCIF)作了系统地描述。OPG/OCIF是一种新近发现的分泌性糖蛋白,属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族的可溶性因子;其cDNA编码401个氨基酸(aa)的多肽链,具有疏水前导肽、4个潜在的N-联糖基化位点等分泌性糖蛋白的特性。其N-末端侧与肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族非常相似,而C-末端侧(aa 195-401)则与其它已知蛋白不具有同源性,并且无疏水跨膜区域。细胞内合成OPG/OCIF单体(约55kDa),细胞外OPG/OCIF主要为二硫键结合的二聚体,但也有较少的单体。胚胎时期OPG/OCIF主要在胎盘表达,成年后骨质局部的表达位于成骨细胞/骨间质细胞浆内^[15]。

Simonet等将大鼠OPG/OCIF的cDNA转移至小鼠体内,造成OPG/OCIF基因的过度表达,从而导致骨密度增加。其病理表现为:出生后备骨、椎体骨及骨盆放射性密度逐渐增高,伴有骨髓腔消失,脾肿大(较对照组重量增加约38%),肝脏骨髓外造血增强;其严重程度与循环中OPG/OCIF及肝脏中其mRNA水平密切相关。然而与op/op小鼠骨质致密症不同的是:(1)是非致命性;(2)与同窝出生的正常小鼠比较,骨骼形态、体重与行为均无异常;(3)无牙齿长出现象。

此外,Simonet等为验证OPG/OCIF功能进行了以下实验:重组OPG/OCIF可特异性阻断上述方法的破骨细胞体外培养,其主要作用于破骨细胞的分化期(细胞培养的后2天),而对破骨细胞前体增殖期无影响。Simonet等将OPG-FC皮下注射于正常小鼠,可使骨质增加,并可拮抗卵巢切除术引起的骨质疏松。结论是:OPG/OCIF对于破骨细胞的形成与成熟破骨细胞的功能均有抑制作用。

Akatsu等^[16]对正常小鼠与接种恶性肿瘤(伴有高钙血症)的裸鼠中腹腔内注射 OPG/OCIF, 2 h后观察血清钙明显减低(接种肿瘤裸鼠的高钙血症注射 OPG/OCIF 下降尤为明显),同时血磷浓度也减低,表明 OPG/OCIF 通过抑制骨吸收减低血钙。Bucay 等人报告了 OPG/OCIF 基因缺失的小鼠出现骨质疏松与动脉硬化,而在临床上这两种疾病常相伴发,这是否提示 OPG/OCIF 参与了其他系统的代谢尚需进一步的研究。

综上所述,OPG/OCIF 通过抑制破骨细胞分化与活性来调节骨质代谢。OPG/OCIF 基因位于第 8 染色体上,并与 HME、BMP-1 基因相邻。由此可见第 8 染色体拥有调节骨质代谢的基因簇。OPG/OCIF 是可溶性的 TNF 受体,需与 TNF 相关的配基相结合从而达到调节作用^[2, 15, 17, 18]。

三、OPG/OCIF 的配基/破骨细胞分化因子 (OPGL/ TRANCE/ RANKL/ODF)

OPG/OCIF 的配基/破骨细胞分化因子为肿瘤坏死因子 (TNF)超家族成员,大多数 TNF 为 II 型跨膜蛋白,一例除外。Brain、Dirk 与 Lacey 等人均先后从不同角度作过阐述^[17]。

1997 年,Brain 等^[18]在寻找凋亡调节因子过程中发现了一种新的 TNF 家族成员,命名为 TRANCE,由 316 个氨基酸残基组成,对于 T 细胞-依赖的免疫反应有调节作用。1997 年,Dirk 等^[19]在论述 TNF 超家族对于树突细胞的调节作用时,所阐述的 RANKL 分子结构与 TRANCE 相同,并发现其具有促进 T 细胞生长与树突细胞的功能。但两者仅阐述了 TRANCE/RANKL 在淋巴组织中的表达与免疫功能,未阐述其对破骨细胞形成与功能的调节作用。

1998 年,Lacey 等^[20]使用 OPG-Fc 结合蛋白作为免疫探针于细胞表面寻找其配基(OPGL)。他们在小鼠骨髓单核细胞系 32D 细胞表面找到与其特异性结合的蛋白,并发现该蛋白与 TRANCE、RANKL 序列相同,胚胎、成年小鼠与成人的 OPGL 主要分布于淋巴器官(脾、胸腺及淋巴结),其骨骼的表达局限于软骨基质的间质细胞与软骨细胞(干骺端与骨膜均未检测到),但骨髓细胞/间质细胞培养过程中 OPGL 的 mRNA 水平高于前者。人类 OPGL 的 DNA 序列与小鼠的有 87% 相同,而 OPG/OCIF 则有 85% 与小鼠相同,这说明 OPGL 与 OPG/OCIF 在进化过程中均得到高度保留。他们通过骨髓培养发现 M-CSF 与 OPGL 对促进破骨细胞形成有协同作用。实验发现,单纯加入 M-CSF 培养基中仅出现大量的单核细胞,而无破骨细胞产生(TRACP 染色阴性),这证实了 Takahashi 等人关于 M-CSF 有促进破骨细胞前体增殖的推断^[20]。1999 年,Burgess 报道了 OPGL 体外促进成熟破骨细胞的活性,给药后促进小鼠体内的骨质吸收^[21]。

1998 年,Lacey 等^[22]将重组 OPGL 注入小鼠体内,小鼠出现了高钙血症与胫骨近端骨容量减少;其破骨细胞数目与对照组比较无差异,但是破骨细胞的大小与核数均明显高于后者,如同时给予 OPG/OCIF 可明显减弱 OPGL 的上述作用。由此得出结论:OPGL 对于破骨细胞的分化与功能均有正向调节作用。同年,Yasuda 等将该蛋白命名为破骨细胞分化因

子(Osteoclast differentiation factor, ODF),并首次在成骨细胞/间质细胞缺失的条件下,加入 OPGL/ODF 与 M-CSF 后由脾细胞中培养出破骨细胞,这说明 OPGL/ODF 在破骨细胞形成过程中是作为脾细胞与成骨细胞/间质细胞间信号而起作用^[3]。

综合上述三方面研究,在破骨细胞形成过程中间质细胞/成骨细胞起着重要的细胞间调控作用。该作用包括:破骨细胞前体增殖、破骨细胞分化及其活性的调节。Wiktor-Jedrzejczak 等、Takahashi 等与 Fuller 等分别报道了间质细胞/成骨细胞分泌的 M-CSF 在这三个方面均有正向调节作用,但是 M-CSF 促进破骨细胞分化的作用在 Lacey 等人的实验中未得到证实,而其它作用得到公认。虽然 OPGL/ODF 在骨骼中的表达低于淋巴器官,但实验表明其对于破骨细胞分化与活性均有正向调节作用。Yasuda 等利用 OPGL/ODF 与 M-CSF 自脾细胞中培养得到破骨细胞表明:(1)OPGL/ODF 是成骨细胞/间质细胞促进破骨细胞分化的重要信号;(2)其促进作用必须经细胞间接触完成(OPGL/ODF 为跨膜蛋白),而与 OPGL/ODF 相结合的破骨细胞前体细胞膜受体未见报道。OPG/OCIF 与细胞膜上的 OPGL/ODF 功能区结合,阻碍其与破骨细胞前体细胞膜上受体的结合,从而抑制破骨细胞分化,并可降低成熟破骨细胞活性,从而对破骨细胞形成进行负向调节。

经过体外细胞培养研究,许多学者发现多种参与骨代谢的细胞因子和激素可调节成骨细胞系 OPG/OCIF、OPGL/ODF 的转录或表达。1998 年,Olle 等^[23]发现 IL-1 α 可促进 MG-63 骨肉瘤细胞和成骨细胞系 OPG/OCIF 的转录,而 IL-6 不具备这一功能。此后 Helena Brändström、Hofbauer、Hiroyuki Takai、Nobuaki Nakagawa 及 Sun-Kyeong Lee 等人发现 TNF β 、IL-1 α 、TGF β 及雌激素均可促进成骨细胞系 OPG/OCIF 的转录;而 TNF α 、糖皮质激素和甲状腺激素则可抑制成骨细胞系 OPG/OCIF 的转录和表达,并可促进 OPGL/ODF 的表达或转录^[24-27]。Helena Brändström^[28]发现前列腺素 E₂ 可促进 OPGL/ODF 的表达或转录,而 Nobuaki Nakagawa^[29]发现 bFGF 则可以抑制 OPGL/ODF 的表达。上述的细胞因子和激素对于 OPG/OCIF、OPGL/ODF 转录或表达的调节作用,与其对于骨代谢的调节作用相符合,同时进一步证实了系统性激素类调节因子是通过成骨细胞系的细胞间作用调节破骨细胞的分化和活性。

通过近年来对于 OPG/OCIF、OPGL/ODF 的深入研究,人们关于成骨细胞系对破骨细胞的细胞间作用有了系统的了解。多位学者将 OPG/OCIF 用于骨吸收疾病的动物模型,如骨巨细胞瘤、乳腺癌骨转移和骨髓瘤等,结果表明 OPG/OCIF 可有效地抑制溶骨性破坏。这进一步说明 OPG/OCIF 对于骨吸收类疾病有着很好的治疗前景。

参 考 文 献

- 1 John E. Horton, Lawrence G. et al. Bone Resorbing Activity Supernatant Fluid from Culture Human Peripheral Blood Leukocytes. Science, 1972,

- 177: 793-795.
- 2 Atsuko Mizuno, Norio Amizuka, Kazuharu Irie, et al. Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/ Osteoprotegerin. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 1998, 247: 610-615.
 - 3 Hisataka Yasuda, Nobuyuki Shima, Nobuki Nakagawa, et al. Osteoclast Differentiation Factor is a Ligand For Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis - Inhibitory Factor And is identical to TRANCE/RANKL. *Cell Biology*, 1998, 95:3597- 3602.
 - 4 Nathan Bucay, Ildiko Sarosi, Colin R. et al. Osteoprotegerin-Deficient Mice Develop Early Onset Osteoporosis and Arterial Calcification. *Gene & Delelopment*, 1998, 12: 1260-1268.
 - 5 Hisahiro Yoshida, Shin-Ichi Hayashi, Takahiro Kunisada, et al. The Murine Mutation Osteopetrosis is in the Coding Region of the Macrophage Colony Stimulating Factor Gene. *Nature*, 1990, 345: 442-444.
 - 6 Kiyoko S. Akagawa, Naomi Takasuka, Yuko Nozaki, et al. Generation of CD1 + RelB + Dendritic Cells and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase-Positive Osteoclast-Like Multinucleated Giant Cells From Human Monocytes. *Blood*, 1996, 88: 4029-4039.
 - 7 Patricia Ducy, Gerard Karsenty. Genetic Control of Cell Differentiation in the Skeleton. *Cell Biology*, 1998, 10: 614-619.
 - 8 Jun Ho Shin, Akiko Kukita, Kazunori Ohki, et al. *In Vitro* Differentiation of the Murine Macrophage Cell Line BDM-1 into Osteoclast-Like Cells. *Endocrinology*, 1995, 136: 4285-4292.
 - 9 Kunihiro Kodaira, Koko Kodaira, Atsuko Mizuno, et al. Cloning and Characterization of the Gene Encoding Mouse Osteoclast Differentiation Factor. *Gene*, 1999, 230: 121-127.
 - 10 Wiktor-Jedrzejczak W, Ahmed A, Szczylik C, et al. Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J Exp Med*, 1982, 156: 1516-1527.
 - 11 Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, et al. The murine mutation osteopetrosis in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 1990, 345: 442-444.
 - 12 Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores *in vivo* bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology*, 1990, 127: 2592-2594.
 - 13 Naoyuki Takahashi, Takuhiko Akatsu, Nobuyuki Udagawa, et al. Osteoblast Cells Are Involved Osteoclast Formation. *Endocrinology*, 1988, 123:2600-2602.
 - 14 Lorenz C. Hofbauer, Francesca Gori, B. Lawrence Riggs, et al. Stimulation of Osteoprotegerin Ligand and Inhibition of Osteoprotegerin Production by Glucocorticoids in Human Osteoblastic Lineage Cells: Potential Paracrine Mechanisms of Glucocorticoid -Induced Osteoporosis. *Endocrinology*, 1999, 140: 4382-4389.
 - 15 Simonet WS, Lacey DL, Cunstan CR, et al. Osetoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in The Regulation of Bone Density. *Cell*, 1997, 89:309-319.
 - 16 Akatsu A, Murakami T, Ono K, et al. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor Exhibits Hypocalcemic Effects Normal Mice and Hypercalcemic Nude Mice Carrying Tumors Associated With Humoral Hypercalcemia of Malignancy. *Bone*, 1998, 23: 495-498.
 - 17 Brain R. Wong, Jaerang Rho, Joseph Arron, et al. TRANCE Is a Novel Ligand of the Tumor Necrosis Factor Family That Activates c-Jun N-terminal Kinase in T Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 25190-25194.
 - 18 Brain R. Wong, Regis Josien, Yongwon Choi. Trance is a TNF Family Member That Regulates Dendritic Cell and Osteoclast Function. *Journal Of Leukocyte Biology*, 1999, 65: 715-724.
 - 19 Dirk M. Anderson, Eugene Maraskovsky, William L. Billingsley, et al. A Homologue of The TNF Receptor and its Ligand Enhance T-cell Growth and Dendritic-Cell Function. *Nature*, 1997, 390: 176-179.
 - 20 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
 - 21 Teresa L. Burgess, Qian YX, Stephen Kaufman, et al. The Ligand for Osteoprotegerin (OPGL) Directly Activates Mature Osteoclasts. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 145:527-537.
 - 22 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
 - 23 Olle NA. Vidal, Klara Sjogren, Bengt I. Eriksson, et al. Osteoprotegerin mRNA Is Increase by Interleukin-1 α in the Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 and in the Human Osteoblast-Like Cells. *Biochem-Biophys-Res-Commun*, 1998, 248: 696-700.
 - 24 Helena Brändström, Kenneth B. Jonsson, Olle Vidal, et al. Tumor Necrosis Factor- α and - β Upregulate the Levels of Osteoprotegerin mRNA in Human Osteosarcoma MG-63 Cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 1998, 248: 454-457.
 - 25 Lorenz C. Hofbauer, Sundeep Khosla, Colin R. Dunstan, et al. Estrogen Stimulates Gene Expression and Protein Production of Osteoprotegerin in Human Osteoblastic Cells. *Endocrinology*, 1999, 140: 4367-4370.
 - 26 Sun-Kyeong Lee and Joseph Alorenzo. Parathyroid Hormone Stimulates TRANCE and Inhibits Osteoprotegerin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Murine Bone Marrow Culture: Correlation with Osteoclast - Like Cell Formation. *Endocrinology*, 1999, 140: 3552-3561.
 - 27 Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan RC, et al. Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α , But Not Interleukin-6 Stimulate Osteoprotegerin Ligand and Gene Expression in Human Osteoblastic Cells. *Bone*, 1999, 25: 255-259.
 - 28 Helena Brändström, Kenneth B. Jonson, Claes Ohlsson, et al. Regulation of Osteoprotegerin mRNA Levels by Prostaglandin E2 in Human Bone Marrow Stroma Cells. *Biochem-Biophys-Res-Commun*, 1998, 247: 338-341.
 - 29 Nobuaki Nakagawa, Hisataka Yasuda, Kazuki Yano, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Osteoclast Formation Induced by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 through Suppressing the Production of Osteoclast Differentiation Factor. *Biochem-Biophys-Res-Commun*, 1999, 265: 45-50.

(收稿日期:2003-09-01)