

破骨细胞 RANK 激活后的信号通路

丰盛梅 金慰芳 高建军

破骨细胞属血源性单核-巨噬细胞系统,多核为其重要功能形式,它通过分泌酸和蛋白酶溶解骨组织从而启动骨重建、完成骨吸收。RANKL-RANK-OPG(osteoprotegerin)调节轴是其分化和活化的主要调节形式,其中跨膜受体 RANK 的激活是该调节轴作用的核心。RANK 信号传导通路,以及通路中各因子作用的研究不仅对该调节轴作用机制的阐明具有重要意义,更为在分子水平认识和干预骨代谢疾病提供了理论基础。

一、破骨细胞中 RANK 信号传导通路

在多种因子共同参与下,RANK 经 RANKL 激活后,至少通过 IKK、INK、P38、ERK、c-Src 酪氨酸激酶等 5 条蛋白激酶途径实现信号传导,以调控造血前体细胞中 OC 特化基因表达、OC 骨吸收功能活化,调节成熟 OC 的存活和循环骨吸收能力。

1. IKK 途径

RANK 与 RANKL 结合后激活,其胞浆部分与 TRAFs (TNFR-associated activator factors) (主要为 TRAF6)结合后,与 TAB2(TGF beta-activated kinase 1 binding protein)组成复合物激活下游的 TAK1(TGF beta-activated kinase 1),后者诱导 IKK α 、 β 磷酸化而激活^[1]。活化的 IKK α 、 β 催化 I κ B(inhibitory κ B)磷酸化,使其被 26 S 蛋白酶小体快速降解,释放 NF- κ B。随后 NF- κ B 的 p50、p52、p65 复合物发生易位,由胞浆进入细胞核,与 DNA 特异区域结合,启动细胞因子如 IL-6、黏附因子如骨桥蛋白等基因转录和表达,导致前体细胞向破骨细胞方向分化和成熟 OC 功能活化。

IKK 由两个催化亚基 α 、 β 和一个调节亚基 γ 组成,其中 β 亚基可能通过降解 I κ B 介导 NF- κ B 的活化。IKK β 基因缺失可引起 I κ B 降解受阻,并导致 RANK 激活诱导的 NF- κ B 与 DNA 结合率和转录活性减低。IKK α 参与 NF- κ B2 前体(p100)的转化和 p65 的磷酸化激活^[2,3]。

2. JNK 途径

同 IKK 途径,形成 RANK-TRAF6-TAB2 复合物,激活 TAK1,后者活化 MKK7(MAPK-related kinase)。活化的 MKK7 激活 JNK1,并通过 c-Jun 的磷酸化诱导转录因子 AP-1(activator protein-1, AP-1)活化,从而诱导 c-Fos 表达。MKK7 为 TAK1 下游因子,尽管二者的作用机制尚不清楚,但 MKK7 活化是 JNK 激活所必须的。

AP-1 又称 c-Jun、Fos 活化蛋白 1,是由一个 Fos 家族蛋白(c-Fos, FosB, Fra-1, 和 Fra-2)和一个 Jun 家族蛋白(c-Jun, JunB, and JunD)组成的二聚体。JNK 通过 c-Jun 的磷酸化增加 AP-1 的转录活性。JNK1^{-/-}鼠前体细胞对 RANKL 诱导作用的反应性降低,而 JNK2^{-/-}前体细胞表现正常,说明在破骨细胞的分化过程中起作用的是 JNK1 而不是 JNK2^[2]。

3. p38 途径

MKK6 也是 TAK1 下游的分子,TAK1 活化后可通过激活 MKK6 使 p38(stress-activated protein kinase)磷酸化后导致下游转录调节因子 MITF(Microphthalmia transcription factor)磷酸化活化,从而调节破骨细胞骨吸收关键酶,如抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase TRAP)、组织蛋白酶 K(cathepsin K CATK)基因的表达。靶基因 TRAP 的表达与 MITF307 位丝氨酸残基磷酸化相关。加入 p38 抑制因子 PD169316 和 SB203580 阻碍 MITF 的磷酸化和靶基因表达激活^[4,5]。

4. ERK 途径

TAK1 也可通过 MEK1、2(ERK Kinase)的活化激活 ERK1、2(MAPK extracellular signal-regulated kinase),后者直接诱导或通过磷酸化 p90RSK(90-kDa ribosomal S 6 kinase)诱导 OC 存活、迁移及细胞骨架重排^[1,6]。在细胞培养中,Ras 高表达导致破骨细胞的快速凋亡与其抑制 ERK 的活性有关,加入 MEK 后使 ERK 活化,阻止自发凋亡、显著延长了破骨细胞的存活时间,提示 ERK 影响 OC 存活^[6]。MEK 抑制剂 PD98056 和 U0126 可促进破骨细胞分化,提示该

通路参与 OC 分化的负性调节^[5]。

免疫印迹分析结果显示在 RAW264.7 细胞(破骨样细胞)中加入 p38 的抑制因子后 ERK 的磷酸化增加,而加入 ERK 的抑制因子后 p38 的磷酸化增加,提示在 ERK 和 p38 的磷酸化之间存在杠杆样的平衡机制,共同调节 OC 分化:MEK、ERK 通路负性调节而 p38 通路正性调节^[5]。

5. c-Src 酪氨酸激酶途径

激活的 RANK 与 TRAF6 结合后,与 Src 蛋白作用并相继活化 PI(3)K(phosphatidylinositol-3-kinase)、PKB、AKT (serine, threonine protein kinase) 和 mTOR (mammalian target of rapamycin),导致 p90RSK 和 4E-BP1(translational repressor protein eIF4E-binding protein 1(也称 PHAS-I))磷酸化,诱导细胞骨架重排,调节细胞运动和存活。

RANK 的激活可诱导 TRAF6 转移到膜上的 Src 位点—膜脂 rafts 部位。破坏 rafts 后 TRAF6 转位与 Akt 活化受阻,最终导致 OC 寿命缩短^[7]。Src 蛋白的 Src-SH2 结构域在许多信号通路中起关键作用,尤其在 OC 介导的骨吸收过程中。各肽类因子与 Src-SH2 的结合亲和力直接影响 c-Src 的活化程度^[8]。p130(Cas)(Crk-associated substrate(Cas))和 c-Cbl 是 c-Src 激酶下游的靶分子,在 OC 发挥功能的过程中起重要作用,介导细胞骨架重排^[9]。c-Src 发挥作用与其同 PYK2(Proline-rich tyrosine kinase 2)结合有关。PYK2 自发磷酸化位点(Y402F)的突变可破坏其与 c-Src 的结合,并使其自身 579/580 和 881 位点酪氨酸磷酸化显著减少,导致破骨细胞迁移能力和骨吸收功能减低^[10]。

PI(3)K 抑制剂 LY294002 可抑制 Akt 的活化。脂类激酶 SHIP(Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase)可引起磷脂酸肌醇-3, 4, 5-三磷酸盐去磷酸化,使 PI(3)K 因底物改变而信号传导受阻,SHIP 基因缺陷的鼠发生严重的骨质疏松症^[11]。SHP-1(Src homology 2 domain-containing phosphatase-1)募集到含 TRAF6 的复合体对 RANK 下游信号传导起作用,调节 RANK 激活后引起的 PI(3)K 亚单位 p85 和 Akt 磷酸化^[12]。雷帕霉素(rapamycin)-mTOR 的抑制因子-通过诱导细胞凋亡抑制细胞存活,在体外雷帕霉素抑制骨吸收的作用与 OC 数量的减少成比例^[13]。

6. 其他途径

NFAT2(NFATc1):NFAT2(nuclear factor of activated T cells)是一种受钙和钙调磷酸酶调节的转录因

子。鼠 NFAT2 有 α 与 β 两种异构体,含保守结构域。该结构域介导其与 DNA 的结合及亚细胞定位。NFAT2 基因缺陷的胚胎干细胞在 RANKL 的刺激下不能分化为 OC^[14]。RANK 激活引起细胞内钙变化,最终导致 NFAT2 活化。该过程依赖 TRAF6、c-Fos、钙调磷酸酶(Ca^{2+} -calcineurin)。钙调磷酸酶抑制剂环孢菌素 A 和 FK560 抑制 NFAT2 的活化从而抑制 OC 的分化。

Myc:正常情况下核蛋白因子(Myc)在破骨细胞前体和骨髓单核细胞中表达水平高,表明 Myc 抑制成熟 OC 选择性基因的表达。Myc 调节 TRAP 基因的转录活性。TRAP 启动子中有 Myc 反应元件,位于 $(-4.36 + 1)$ bp 之间^[15]。

二、RANK 激活后信号网络的调节

RANK 激活后的信号通路调节是 OPC、RANKL、RANK 调节轴的重要组成部分,其中适配分子 TRAF6 是该信号网络的中心环节,并可能成为细胞因子和激素调节作用的靶点。TRAF1, -2, -3, -5, -6 都可与 RANK 结合,但只有 TRAF-6 基因突变才表现为破骨细胞活性丧失^[16]。一些细胞因子可能通过 TRAF 6 影响 OC 分化与活化,如在 TNF- α (tumor necrosis factor)诱导 OC 分化过程中,TNFR1 的激活与 RANK 介导的 TRAF6 有协同作用^[17]。在 OC 分化过程中,TIZ(TRAF6-inhibitory zinc finger protein)可能通过干扰 TRAF6 的信号活动抑制 RANK 信号传递^[18]。TRAF6 可直接结合 IRAK(IL-1R-associated kinases)、RANK 和 CD40,因此其既是 OC 分化和活化调节的核心分子,也是免疫系统影响骨代谢的纽带。如 T 细胞表达分泌 IFN- γ ,可通过活化泛素蛋白酶系统(ubiquitin-proteasome system)诱导 TRAF6 的快速降解,从而明显抑制 RANK 激活诱导的 NF- κ B 和 JNK 活化^[19]。TRAF6 又可诱导 B 淋巴细胞产生 TGF- β 促进破骨细胞凋亡。LPS 和 IL-1 也通过 IRAK 与 TRAF6 作用,发挥骨吸收的促进作用。

除了 TRAF6 外,信号通路的其他环节也是调节 RANK 信号通路的作用靶点。RANK 激活后 OC 分泌 IFN- β (Interferon),可下调 c-fos 的表达。IL-4 (interleukin-4)抑制破骨细胞分化的作用与其减少 NF- κ B 核内转移、抑制 NF- κ B 与 DNA 的结合活性和 JNK 激活有关,该过程需要 STAT6(signal transducer and activator of transcription)参与^[20]。IL-1 也能明显诱导 ERK 和 NF- κ B 的活化^[5]。PTEN(也称 MMAC-1 或 TEP-1),降低 Akt 的活性,PTEN 过度表达抑制 RANKL 诱导的 OC 分化及 OPN(osteopontin)诱导的

OC 迁移^[21]。TLR 表达在免疫调节细胞如巨噬细胞及树突突细胞、前体破骨细胞的细胞膜上,各种 TLR 配体激活 TLR 可诱导 NF- κ B 活化及上调 OC 前体中 TNF- α 的表达,对 RANK 信号通路起协同作用^[22]。雌激素抑制 RANK 诱导的破骨细胞分化,其机制与抑制 JNK1 的活性及其下游的信号转导和部分抑制 c-Jun 的表达、抑制 c-Jun 的活化、抑制 AP-1(C-Jun/c-Fos)介导的基因转录有关^[23]。

三、结语

破骨细胞内信号传导网络极其复杂,RANK 激活后可通过以上等传导途径或诱导 TRAP、CTR 和 VNR 等基因的表达,引发 OC 细胞骨架重排,促进破骨细胞表型特征的出现;或通过影响 ATP6i 和 CATK 等基因表达,调节 OC 和蛋白酶水平,影响其骨吸收状态等。但部分因子之间的作用机制尚未明确。以 TRAF6 为中心的 RANK 激活后信号网络的研究必将促进对 OC 分化和活化机制的认识,加深对 RANKL \ RANK \ OPG 调节轴与免疫等系统关系的理解,为在分子水平认识和干预骨代谢疾病提供理论基础。

参 考 文 献

- William J, Boyle W, Scott S, et al. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, 423:337-342.
- Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305:211-214.
- Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, et al. The I κ B Function of NF- κ B p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med*, 2003, 198:771-781.
- Mansky KC, Sankar U, Han J, et al. Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem*, 2002, 277: 11077-11083.
- Hotokozaka H, Sakai E, Kanaoka K, et al. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem*, 2002, 277:47366-47372.
- Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, et al. Reciprocal role of ERK and NF-kappaB pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol*, 2000, 148:333-342.
- Ha H, Kwak HB, Lee SK, et al. Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. *J Biol Chem*, 2003, 278: 18573-18580.
- Mandine E, Jean-Baptiste V, Vayssiere B, et al. High-affinity Src-SH2 ligands which do not activate Tyr(527)-phosphorylated Src in an experimental in vivo system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298: 185-192.
- Nakamura I, Rodan GA, Duong LT. Distinct Roles of p130Cas and c-Cbl in adhesion-induced or M-CSF-mediated signaling pathways in pre-fusion osteoclasts. *Endocrinology*, 2003, 144:4739-4741.
- Lakkakorpi PT Bett AJ, Lipfert L, et al. PYK2 autophosphorylation, but not kinase activity, is necessary for adhesion-induced association with c-Src, osteoclast spreading, and bone resorption. *J Biol Chem*, 2003, 278: 11502-11512.
- Takeshita S, Namba N, Zhao JJ, et al. SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nature Med*, 2002, 9:943-949.
- Zhang Z, Jimi E, Bothwell AL. Receptor activator of NF-kappaB ligand stimulates recruitment of SHP-1 to the complex containing TNFR-associated factor 6 that regulates osteoclastogenesis. *J Immunol*, 2003, 171: 3620-3626.
- Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, et al. M-CSF, TNF and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Nature*, 2003, 10:1165-1177.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 2002, 3:889-901.
- Daumer KM, Taparowsky EJ, Hall DJ, et al. Transcription from the tartrate-resistance acid phosphatase promoter is negatively regulated by the Myc oncoprotein. *J Bone Miner Res*, 2002, 17:1701-1709.
- Ye H, Anon JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, 2002, 418:443-447.
- Mak TW, Yeh WC. Immunology: A block at the toll gate. *Nature*, 2002, 418:835-883.
- Shin JN, Kim I, Lee JS, et al. A novel zinc finger protein that inhibits osteoclastogenesis and the function of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *J Biol Chem*, 2002, 277:8346-8353.
- Hayashi T, Kaneda T, Toyama Y, et al. Regulation of receptor activator of NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon- β (INF- β) and suppressors of cytokine signaling (SOCS). The possible counteracting role of SOCSs in IFN- β -inhibited osteoclast formation. *J Biol Chem*, 2002, 277:27880-27886.
- Abu-Ainer, Yousef. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF- κ B. *J Clin Invest*, 2001, 107:1375-1385.
- Sugatani T, Alvarez U, Hruska KA. PTEN regulates RANKL- and osteopontin-stimulated signal transduction during osteoclast differentiation and cell motility. *J Biol Chem*, 2003, 278:5001-5008.
- Takami M, Kim N, Rho J, et al. Stimulating by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. *J Immunol*, 2002, 169:1516-1523.
- Nirupama K, Amy C, Krista M, et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 7829-7834.

(收稿日期:2004-06-16)