

# 转录因子与甲状旁腺素调控的骨代谢

程力 袁凤红

甲状旁腺素(PTH)是由甲状旁腺合成和分泌 84 个氨基酸单链多肽激素,对骨代谢具有双向调节作用,即成骨作用和溶骨作用。转录因子在 PTH 的骨代谢信号传导途径中发挥着重要作用,调控着许多成骨细胞基因的表达。Qin L 等<sup>[1]</sup>通过 DNA 微阵列分析表明至少 10 个转录因子在 mRNA 水平被 PTH 调控,且大多数为立早基因。此外 PTH 也在翻译后水平修饰调节着转录因子活性,如 CREB 和 RUNX 2 磷酸化后的活性改变。笔者将就 PTH 调控的重要的转录因子及其作用进行探讨。

## 1 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)

### 1.1 CREB 的生物学特性

CREB 属于 CREB/ATF 家族成员,是存在于细胞核中与 cAMP 反应元件(CRE)结合的转录因子,能通过亮氨酸指环结构域形成二聚体,然后与 CRE 结合而调节相关基因转录。CREB 活性受细胞内环一磷酸腺苷(cAMP)和 Ca 离子浓度调控,当成骨细胞或骨髓基质细胞内 cAMP 浓度增加时,CREB 133 丝氨酸位点的 P-box 受蛋白激酶 A(PKA)作用发生磷酸化,从而募集共同激活子 CPB/P 300,激活相应基因转录<sup>[2]</sup>。Tyson 等<sup>[3]</sup>进一步研究发现上述 CREB 磷酸化激活是 CREB 激活转录所必须的先决条件,并且还证实在 CREB 磷酸化激活过程中起作用的为 PKA,因为抑制 PKC 不能阻止 PTH 引起的 CREB 133 位丝氨酸磷酸化。此外,de Groot 等<sup>[4]</sup>研究还发现 CREB 尚存在其他磷酸化位点,即 129 位丝氨酸被糖原合酶激酶-3(GSK-3)磷酸化,但其的磷酸化作用必须依赖于 CREB 133 丝氨酸首先磷酸化。但是 John 等<sup>[5]</sup>认为上述 CREB 的二次磷酸化作用是 PTH 作用下 CREB 激活转录所必不可少的。

Fanxin 等<sup>[6]</sup>通过对小鼠生长板软骨细胞转基因表达 CREB 抑制子 A-CREB 的研究发现,此转基因鼠表现为短肢畸形,并因胸廓周径减少致呼吸衰竭,

而于出生后数分钟死亡,提示 CREB 转录因子对软骨内骨生长起着重要的调控作用。

### 1.2 CREB 在 PTH 调控的基因转录中的作用

研究发现 PTH 对 C-fos 基因转录的调控主要是通过 CREB 磷酸化激活,然后与位于 C-fos 启动子内的 CRE 结合而调节 C-fos 基因转录<sup>[7]</sup>,而 C-fos 又对胶原酶 3 表达起上调作用。上述 CREB 激活的 C-fos 转录是 PKA 依赖的,PKA 对 CREB 磷酸化激活在 PTH 调控的 C-fos 基因转录过程中必不可少<sup>[3]</sup>。最近在对骨保护素/NF $\kappa$ B 受体活化因子配体(OPG/RANKL)的研究发现,PTH 刺激破骨细胞形成主要通过 PKA-CREB 途径诱导骨髓基质细胞及成骨细胞 RANKLmRNA 的表达,通过 PKA-CREB-C-fos 途径抑制 OPGmRNA 的表达,最终结果使得 OPG/RANKL 比值下降导致平衡失调,而促进了破骨细胞的分化、募集及功能。此外,进一步研究还发现 RANKLmRNA 的表达与 C-fos 和 RUNX 2 的活性无关,只受 CREB 调控,从而体现了 CREB 对 RANKL 的中心调控作用<sup>[8]</sup>。从上述研究可见,PTH 通过在翻译后水平修饰调节 CREB 进而调控相关基因表达,而在一定程度上参与 PTH 的溶骨作用。

## 2 活化蛋白-1(AP-1)转录因子家族

### 2.1 AP-1 家族的生物学特性

AP-1 家族包括 7 个蛋白:fos 蛋白(C-fos、fos-B、Fra-1、Fra-2)和 Jun 蛋白(C-Jun、JunB、JunD)。fos 和 Jun 蛋白家族成员在与 DNA 结合前可通过亮氨酸拉链形成各种同源、异源二聚体,作为一个有活性的复合物结合于 DNA 调控基因转录。不同的二聚体具有不同结合序列及特性,可识别差别细微的 DNA 靶目标,从而使得 AP-1 复合体具有调节多个不同基因表达的功能;但 Fos/Jun 构成的异二聚体形式最稳定,转录活性最强,是 AP-1 调节转录的主要作用形式。

在成骨细胞增殖和分化期间,成骨细胞表达的许多基因启动子内包括 AP-1 目标序列,比如骨钙

素、白介素-6、单核细胞集落刺激因子、胶原酶Ⅲ、Ⅰ型胶原,提示通过 AP-1 结合位点诱导和抑制基因表达的机制可能在起作用。最近的研究表明,Jun 和 fos 蛋白家族成员是正调控骨形成的介导者<sup>[9-11]</sup>,所有 AP-1 家族转录因子在成骨细胞增殖期是高水平,分化期水平下降,主要为 fra-2 和 JunD 蛋白<sup>[12]</sup>。

## 2.2 AP-1 家族与 PTH 调控的骨代谢

AP-1 家族被立早基因编码,C-fos 立早基因受 PTH 作用迅速被转录激活。当 PTH 注射到大鼠体内,1 h 后即可在 PTH1 受体阳性细胞内测得 C-fos mRNA 表达<sup>[13]</sup>。而 C-fos 对骨骼生长起重要作用,在生长早期 C-fos 主要在生长的软骨和骨骼生长区被表达<sup>[14]</sup>。过分表达 C-fos 发展为成软骨细胞骨肉瘤,删除 C-fos 基因的小鼠则表现为硬化和缺乏破骨细胞。可见 C-fos 基因是破骨细胞分化所必需的,其对成骨细胞的作用尚不完全清楚,需进一步研究。总之,上述资料足以表明 C-fos 在骨再建过程中所起的重要作用。

McCauley 等<sup>[15]</sup>研究发现 PTH 诱导了体外 MC3T3-E1 前成骨细胞 fra-2mRNA 表达。进一步在体内研究发现,注射 PTH(1-34)(20  $\mu$ g) 1 h 后,大鼠头颅骨 fra-2mRNA 表达上调,且 1 h 表达最高;并认为 PTH 促进成骨细胞分化是通过刺激 fra-2mRNA 表达,但这种作用可能被 AP-1 家族其他转录因子反作用抵消,故体外研究表现为 PTH 抑制成骨细胞分化。

此外,还有一些 AP-1 家族成员 C-Jun<sup>[16]</sup>、fos-B、Jun-B、fra-1<sup>[17]</sup>也受 PTH 调控,在 PTH 调控的骨代谢信号传导途径中发挥着一定作用。

最近在对大鼠 UMR106-01 细胞研究表明,PTH 调控胶原酶 3 启动子是通过 AP-1 位点与 runt 结合结构域位点相互作用,过多表达 C-fos、C-Jun、和核结合因子  $\alpha 1$ (cbfal)/RUNX2 提高 UMR106-01 细胞对 PTH 的反应,使胶原酶 3 表达上调,当过多表达 fra-2 和 JunD 减少了原代成骨细胞基础的和 PTH 诱导的胶原酶 3 活力<sup>[18]</sup>。

通过上述资料可见,PTH 可能通过调节 AP-1 复合物,后者再与目标基因的 DNA 结合位点结合调控相关基因转录,从而参与了 PTH 成骨与溶骨作用。

## 3 RUNX2/Cbfa1

### 3.1 RUNX2 生物学特性

RUNX2 蛋白属于 runt/cbfa 转录因子家族,128 个氨基酸的蛋白结构域-runt 结构域为其结构特征,

该结构域能与相应基因的 PuACCPuCA(RD)位点结合而调节基因转录。RUNX2 又被称为 Cbfa1、PEBP2 $\alpha$ A、AML-3、成骨细胞特异因子-2(Osf-2),但 RUNX 形式多被采用和被人类基因组委员会认可。目前已鉴定了 3 种 RUNX2 的异构本形式,它们有着相似的功能性蛋白结构域,runt 结构域能与 DNA 的 RD 位点结合,c 末端脯氨酸、苏氨酸丰富(PST)结构域包含 PKA、PKC、ERK 的磷酸化作用位点,而该磷酸化与 RUNX2 的活化有关。

RUNX2 是脊椎动物成骨细胞分化的关键转录激活子。在胚胎发育过程中,RUNX2 表达是成骨细胞分化的开始,是骨形成最早和最特异的标志。RUNX2 与成骨细胞特异顺式作用元件 OSE2 结合激活骨钙素表达,还调节所有关键成骨细胞基因表达如骨桥蛋白(OP),骨涎蛋白(BSP),胶原  $\alpha 1$  和  $\alpha 2$  以及胶原酶 3。

组织学研究显示,RUNX2 基因敲除的纯合子小鼠完全缺乏骨组织,不仅无骨基质和成骨细胞,也无骨髓腔<sup>[19]</sup>。转染 RUNX2 到非骨细胞,如原代皮肤成纤维细胞,诱导成骨细胞特异的基因转录。由此可见 RUNX2 在成骨细胞分化中所起的重要作用。

RUNX2 的降解主要是通过 Smurf1 以泛素/蛋白酶体依赖的方式来实现的,Smurf1 的突变使得 RUNX2 降解减少,则会明显增加成骨细胞的分化,显示 Smurf1 对成骨细胞分化的重要调控作用<sup>[20]</sup>。

### 3.2 PTH 对 RUNX2 的调控

研究表明,在 PTH 的骨形成作用中离不开 RUNX2 依赖的信号传导途径,PTH 浓度依赖地刺激大鼠骨髓瘤细胞 UMR106-01 RUNX2 mRNA 的表达,大鼠体内间歇给予 PTH 注射后 RUNX2 在胫骨远端干骺端增多,进一步组织培养证实 PTH 剂量依赖促进骨形成及 RUNX2 的表达,而阻断 RUNX2 mRNA 表达则 PTH 的促骨形成作用也随之消失<sup>[21]</sup>。

PTH 对 RUNX2 的调控还可以通过磷酸化作用使其激活,在对大鼠 UMR106-01 细胞研究发现,PTH 干预下可通过磷酸化其 PST 结构域的 PKA 位点激活 RUNX2,而 RUNX2 活化对激活胶原酶 3 启动子必不可少。RUNX2 和 AP-1 的相互作用对 PTH 调控的胶原酶 3 的转录起着决定性作用。

另一方面,Yin 等<sup>[22]</sup>在研究成骨样细胞 MC<sub>3</sub>T<sub>3</sub>-E<sub>1</sub> 表明,cAMP/PKA 途径介导了 PTH 在细胞内的主要的信号传导途径,刺激了成骨细胞的泛素/蛋白酶体活力,从而诱导了蛋白酶体依赖的 RUNX2 的降解,而抑制了成骨细胞功能。

综上所述, PTH 对 RUNX2 调控表现为 3 个方面: ①直接上调 RUNX2 的基因表达促进骨形成; ②翻译后修饰活化 RUNX2 参与胶原酶 3 转录而介导溶骨; ③促进 RUNX2 的降解抑制成骨。这 3 方面作用对 PTH 的骨形成与骨吸收作用机制作了部分解释。同时也显示 RUNX2 在 PTH 调控的骨代谢中的重要性。

#### 4 其他

CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)包括许多不同的转录调控子。它们属于基本的亮氨酸拉链转录因子家族成员, 通过亮氨酸拉链可使其形成同源异源二聚体并与 DNA 结合, 调节基因转录。

最近的研究表明 C/EBP 调控成骨细胞一些重要的骨相关基因的表达。Umayahara 等<sup>[23]</sup>研究体外培养成骨样细胞发现, cAMP 依赖的蛋白激酶 A (PKA) 途径能使 CCAAT/增强子结合蛋白  $\delta$  (C/EBP $\delta$ ) 激活, 并与胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 启动子内的 HS3D 元件结合而诱导其基因转录, 且此转录活性不被蛋白合成抑制剂所抑制, 说明 C/EBP  $\delta$  的活化发生在翻译后水平; C/EBP $\beta$  也被激活, 但程度低于 C/EBP  $\delta$  并且不具有对 IGF-1 的转录活性。同样 Qin 等<sup>[1]</sup>利用 DNA 微阵列技术分析也证实了大鼠 UMR106-01 细胞 C/EBP  $\beta$  和  $\delta$  mRNA 被 PTH 上调。提示 PTH 可能通过上述 PKA-C/EBP  $\delta$  途径促使 IGF-1 表达上调, 而在一定程度上解释其成骨作用机制。

此外, 通过 DNA 微阵列技术鉴定的被 PTH 调控的转录因子还有 AP-2、AP-4、SP-1、FoxD3 等, 但它们在 PTH 信号传导途径中的作用有待进一步研究。

#### 5 结语

作为目前最有前途的骨形成促进剂 PTH 已开始应用于临床, 但对 PTH 骨代谢机制的研究还在深入, 新的转录因子及其作用还将不断发现, 对 PTH 作用机制的理解将有助于人们对代谢性骨疾病的认识, 也为 PTH 合理的临床用药提供理论指导。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Qin L, Qiu P, Wang L, et al. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem*, 2003, 278: 19723-19731.
- [2] Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Biochem*, 1999, 68: 821-861.
- [3] Tyson DR, Swarthout JT, Partridge NC. Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 30,50-monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology*, 1999, 140: 1255-1261.
- [4] de Groot PR, den Hertog J, Vandenheede JR, et al. Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *EMBO J*, 1993, 12: 3903-3911.
- [5] Fiol C, Williams JS, Chou CH, et al. A secondary phosphorylation of CREB 341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J Biol Chem*, 1993, 269: 32187-32193.
- [6] Fanxin L, Ernestina S, Hiroshi A, et al. The CREB family of activators is required for endochondral bone Development. *Development*, 2001, 128: 541-550.
- [7] Pearman AT, Chou WY, Bergman KD, et al. Parathyroid hormone induces c-fos promoter activity in osteoblastic cells through phosphorylated cAMP response element (CRE)-binding protein binding to the major CRE. *J Biol Chem*, 1996, 271: 25715-25721.
- [8] Qiang Fu, Robert L, Jilka, et al. Parathyroid Hormone Stimulates Receptor Activator of NF  $\kappa$ B Ligand and Inhibits Osteoprotegerin Expression via Protein Kinase A Activation of cAMP-response Element-binding Protein. *J Biol Chem*, 2002, 277: 48868-48875.
- [9] McCabe LR, Kockz M, Lian J, et al. Selective expression of fos and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res*, 1995, 218: 255-262.
- [10] Jochum W, David JP, Elliott C, et al. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med*, 2000, 6: 980-984.
- [11] Sabatakis G, Sims NA, Chen K, et al. Overexpression of FosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med*, 2000, 6: 985-990.
- [12] McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, et al. Developmental expression and activities of specific Fos and Jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: Role of fra-2 and jun D. *Endocrinology*, 1996, 137: 4398-4408.
- [13] Liang JD, Hock JM, Sandusky GE, et al. Immunohistochemical localization of selected early response genes expressed in trabecular bone of young rats given hPTH 1-34. *Calcif Tissue Int*, 1999, 65: 369-373.
- [14] Grigoriadis AE, Wang ZQ, Wangner EF. Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet*, 1995, 11: 436-441.
- [15] McCauley LK, Koh-Paige AJ, Chen H, et al. Parathyroid hormone stimulates fra-2 expression in osteoblastic cells *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, 2001, 142: 1975-1981.
- [16] Clohisy JC, Scott DK, Brakenhoff KD, et al. Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol Endocrinol*, 1992, 6: 1834-1842.
- [17] Koe RC, Clohisy JC, Tyson DR, et al. Parathyroid hormone versus phorbol ester stimulation of activator protein-1 gene family members in

锍盐及锌螯合物、组织蛋白酶 K、内皮整合素受体阻断剂、神经肽、骨保护素、破骨细胞质子泵抑制剂、前列腺素抑制剂、甲状旁腺激素类、生长激素类、胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 等蛋白质类药物。

对骨质疏松病因的研究正在不断深入, 如果对引起骨质疏松基因研究取得突破, 对骨质疏松的预测、预防和治疗可望增添有力措施。

### 【参 考 文 献】

- [1] 罗军, 林加滨, 牛福康. 骨质疏松症患者之友. 人民军医出版社, 1999. 112.
- [2] 褚秋艳, 张石革. 钙制剂和钙调节剂. 中国药房, 1998, 9(2): 86.

- [3] 陈灏珠, 主编. 实用内科学. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 768.
- [4] 杨茵, 王健. 治疗骨质疏松药物的应用现状分析. 西北药学杂志, 2003, 18: 133.
- [5] 程志强. 原发性骨质疏松的药物治疗. 国外医学内分泌学分册, 1998, 18(2): 68.
- [6] 卢少兰, 廖日房, 李国成, 等. 骨质疏松药物的治疗进展. 广东药学, 2003, 13(2): 56.
- [7] 赵伟业, 董碧蓉, 欧雪梅, 等. 骨质疏松药物治疗的新进展及循证证据. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9: 80.
- [8] 黄守坚. 预防和治疗骨质疏松的药物. 新医学, 2003, 34: 453.
- [9] 陆声, 常山. 骨质疏松药物治疗的新进展. 中国矫形外科杂志, 2001, 8: 912.
- [10] 梁竹, 黄元, 邹弘颖. 抗骨质疏松药物应用现状及进展. 药学实践杂志, 2000, 18(2): 73.