

LRP5: 调控骨密度的新基因

钱红波 赵建宁

骨骼的完整性由骨形成和骨吸收两者之间的动态平衡来维持。任何一方的增多或减少都必然导致骨骼完整性的破坏、骨密度的变化,引起临床疾病,如骨质疏松症、骨质硬化症等。骨量获得和骨量丢失与高危环境因素有关如饮食结构,但很大程度上似取决于遗传因素。通过对孪生子和家族的分析研究显示:有 60% ~ 85% 的骨量、50% ~ 75% 的骨代谢和 25% ~ 35% 的骨折取决于遗传因素^[1]。调控骨代谢和骨密度的基因已经发现很多,按其影响骨量获得和骨量丢失的不同可分为 3 类:一类是影响骨量获得的基因,如钙感受性受体 CASR 基因、胰岛素样生长因子 IGF 1 基因、骨钙素 BGP 基因等;第二类是影响骨量丢失的基因,如 ER 基因、降钙素受体 CTR 基因、IL-6 基因等;第三类是既可能影响骨量获得,又可能影响骨量丢失的基因,如 VDR 基因、转录生长因子 TGF- β 1 基因、瘦素 Leptin 基因等。最近发现的低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-5, LRP 5) 的突变型与骨密度密切相关^[2-10]。笔者对 LRP 5 基因相关研究作一综述。

1 LRP 5 的结构特征

1.1 LRP 的简介

LRP 是低密度脂蛋白受体 (LDLR) 基因家族中的一员,与 LDLR 其他成员相比较结构相似但分子量大。目前发现 LRP 家族共有 10 个家庭成员。它们共有的结构包括:①富有半胱氨酸配体结合(补体)样的重复序列;②富有半胱氨酸的表皮生长因子 (EGF) 受体样的重复序列;③ YWTD (酪氨酸-色氨酸-苏氨酸-天冬氨酸) 序列;④跨膜区;⑤胞浆区。LRP 至少识别 30 种以上的配体。配体结合重复序列一般有 2 至 11 个不同的配体,而紧接着的 EGF 前体同源区,依次包含有 2 个 EGF 重复序列;6 个

YWTD 重复序列(类似于螺旋装置的结构);1 个 EGF 重复序列。同时在跨膜区结构前有 6 个 EGF 重复序列^[11]。LRP 广泛分布在成纤维细胞、巨噬细胞、中枢神经系统、消化道上皮细胞、肝脏和肾脏等。其功能包括乳糜微粒的清除、维持胆固醇的动态平衡、调控纤溶系统、调控病毒和细菌毒素进入细胞、参与神经信号的传导和长时增强效应以及神经突触的重塑等^[12]。

1.2 LRP 5 的结构特征

LRP 5 作为 LRP 家庭成员,其结构与 LRP 6 极其相似,蛋白质相同的部分占 70%,可作为 LRP 6 的类似物;而与 LRP 1 相同的部分仅占 36%。人与小鼠的 LRP 5 相同的部分占 94%,表明 LRP 5 在进化中的保守性^[13]。

LRP 5 基因编码的蛋白质由 1615 个氨基酸组成。信号肽的切割位点位于第 25 个氨基酸残基。胞外部分有 6 个氨基相连的糖基化位点,分别定位在 93、138、446、499、705 和 878。LRP 5 成熟的分子有 1591 个氨基酸。LRP 5 的 4 个 EGF 前体间隔序列分别定位在 31 ~ 297、339 ~ 602、643 ~ 903 和 944 ~ 1214(每个都包含有 YWTD 序列);4 个 EGF 重复序列分别定位在 297 ~ 338、603 ~ 642、904 ~ 943 和 1215 ~ 1255,并且包含有 6 个保守的半胱氨酸残基;3 个相邻的 LDLR 样序列在 1257 ~ 1295 (1dlr1)、1296 ~ 1333 (1dlr2) 和 1334 ~ 1372 (1dlr3);而跨膜区与 LDLR 样序列之间有 13 个氨基酸残基,并定位在 1386 ~ 1408;细胞内部分有 207 个氨基酸,其中丝氨酸占 15%^[13]。LRP 5 基因中 YWTD/EGF 重复序列在进化中是非常保守的,对蛋白质的功能非常重要。

LRP 5 基因定位于 11q12-13 上^[13,14],基因组全长 131.6 kb。LRP 5 基因由 23 个外显子组成,最大的外显子是第 23 外显子为 515 bp,最小的外显子是第 22 外显子为 98 bp;除了第 13 内含子 5' 端以外都遵循 GT/AG 法则,第 13 内含子 5' 端序列是 GC 而不是通常的 GT;外显子序列中,检测到 3 个单核苷酸多态,即位于第 2 外显子的 A 459 G、位于第 10 外显子的 C 2220 T 和位于第 21 外显子的 G 4416 C,这 3

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金课题(05KJB320125)

作者单位:210002 南京,南京军区南京总医院骨科中心

通讯作者:钱红波,Email:qianrenyang@vip.163.com

个单核苷酸改变均不改变所编码的氨基酸;22 个内含子中最大的是第 1 个内含子为 35 kb;最小的是第 15 个内含子为 0.7 kb;LRP 5 基因内部含有 4 个已知的短串联重复序列,即 D 11 S 1917、D 11 S 4087、D 11 S 1337 和 D 11 S 4178,它们分别位于该基因的 5' 端和第 1、4、13 内含子内^[15]。

2 LRP 5 在组织中的分布

LRP 5 在几乎所有的组织中都有低水平的表达,而且变化很小。但主要在骨内膜和干骺端的小梁骨表达,同时在骨外膜及生长板也有表达^[3]。Gong 等^[4]用原位杂交方法对小鼠胚胎发育过程中骨骼进行研究,发现 LRP 5 首先在后来发育为颅骨的细胞上表达,这些细胞同时有骨骼分化的生物标记表达,如碱性磷酸酶及 Runx 2。在小鼠胚胎发育到 16.5 d 时肱骨骨干的骨龄已经形成,LRP 5 在骨内膜的成骨细胞上有显著的表达,但在软骨生长板未发现。LRP 5 不仅在四肢骨上同时也在颅骨的成骨细胞上有显著的表达。在出生 4 w 大的老鼠的四肢骨上小梁骨和皮质骨的成骨细胞上 LRP 5 都有表达。

3 LRP 5 的功能

3.1 LRP 5 基因突变与骨密度

人类常染色体隐性疾病骨质疏松-假性胶质瘤综合症(OPPG)以骨量明显减少、容易骨折、假性胶质瘤、失明等为临床特征。Gong 等^[4]对 28 个 OPBG 家族成员的基因序列进行分析,认为是由于 LRP 5 基因出现了功能丧失性基因突变从而导致了 OPBG 的发生。而对 LRP 5 缺乏的转基因小鼠研究发现这种小鼠有 2 个表型特征:①骨形成率(BFR)明显下降,骨密度降低;②眼表现异常(眼血管呈现胚胎样)^[5]。

Boyden 等^[6]对患有人类常染色体显性疾病(以高骨量、下颌骨和颞隆凸明显增厚等为临床特征)的一个族系进行了遗传和生化分析,认为 LRP 5 基因的第 171 位甘氨酸突变为缬氨酸(突变位点在 LRP 5 的第一个螺旋装置 YWTD/EGF 的第四节段),从而导致疾病的发生。Little 等^[3]在对骨密度异常增高的族系进行基因连锁分析得出了与 Boyden 一样结论。Van Wesenbeeck 等^[7]对共同以高骨密度为临床特征的疾病[骨内膜增厚症(Endosteal hyperostosis)、Van Buchem disease、骨硬化症(osteopetrosis)、常染色体显性 I 型骨硬化症(Autosomal dominant osteopetrosis

type I)等]进行基因分析,认为 LRP 5 发生了功能增强的基因突变是导致高骨密度发生的根本原因。目前发现的 LRP 5 功能增强的基因突变共有 8 种:D 111 Y、G 171 R、A 214 T、A 214 V、A 242 T、T 253 I、G 171 V 和 N 198 S^[3,6,7,10],并且突变位点都定位在第一个螺旋装置 YWTD/EGF 的 2、3、4 外显子之间。在对 LRP 5 功能增强型 G 171 V 转基因小鼠和野生型 LRP 5 小鼠的研究中发现:LRPSG 171 V 突变型小鼠骨密度异常增高,总骨密度体积(volumetric bone mineral density vBMD)增加 30%~55%,股骨远侧干骺端 vBMD 增加 103%~250%,股骨远端和腰椎的小梁骨体积增加 110%~232%,小梁骨数量增加 41%~74%、厚度增加 34%~46%;同时腰椎抗压强度增加 80%~140%^[8]。

无论是 LRP 5 功能丧失性基因突变表型,还是 LRP 5 功能增强的基因突变表型,都说明了 LRP 5 基因在骨密度的遗传学上扮演着重要的角色。

3.2 LRP 5 对成骨细胞的作用

LRP 5 基因及与 LRP 5 相关的信号途径对成骨细胞分化、增殖和功能进行调控^[5]:①LRP 5 缺乏的转基因小鼠骨髓间质祖细胞数量下降意味着成骨细胞的分化受限,但成骨细胞分化最早期标记物 Cbfa1 和最晚期标记物骨钙素(Osteocalcin)表达正常,提示在依赖 Cbfa1 的成骨细胞分化过程中,LRP 5 信号途径无重要作用;但也不排除 LRP 5 通过另一种途径对成骨细胞分化进行调控。②LRP 5 缺乏的转基因小鼠成骨细胞数量减少,增殖率下降而且在成骨细胞培养早期出现骨基质沉积率下降和延迟,提示成骨细胞增殖的功能下降^[5]。③LRP 5 基因功能增强突变型小鼠的生化指标纤维粘连素的提高提示成骨细胞的增殖和存活时间都有提高,成母细胞和骨细胞的凋亡下调^[6]。小鼠骨形成标记物骨钙素和 TGF- β 含量明显增高,而骨吸收标志物 NTX 无明显变化,并且 OPG/RANK/RANKL 系统及破骨细胞的数量和功能都无改变^[6],表明 LRP 5 功能增强突变型的高密度表型与骨吸收下降和破骨细胞变化无关,是骨形成增高和成骨细胞变化引起的^[8]。

3.3 LRP 5 与 Wnt 信号途径

Wnt 信号途径和其他细胞间信号传导途径一样,也是由一种分泌的信号蛋白 Wnt,跨膜的受体蛋白(Frizzled),及复杂的细胞内多种蛋白机制将信号由细胞表面传至细胞核内。Wnt 信号途径的主要成份包括:Wnt 家族分泌蛋白、Frizzled(卷曲的)蛋白、Axin、 β 连环蛋白及 TCF/LEF 家族转录调节因子。

Wnt 信号途径是调控细胞生长增殖的关键途径,在胚胎发育和肿瘤发生中起重要作用,同样在骨骼的发育(胚胎和出生后)和骨代谢过程中也发挥了重要的作用^[16-20]。成骨细胞上有 Wnt、Frizzled、 β 连环蛋白及 TCF 基因的表达^[5],而 Wnt 在成骨细胞前体细胞上的激活,可促进成骨细胞的分化^[4]。BMP-2 诱导的碱性磷酸酶(成骨细胞分化的早期标志物)的激活依靠 LRP 5/Wnt 信号途径,而且 BMP-2 诱导 Wnt 1 和 Wnt 3a 产生,导致 Wnt 信号途径自分泌的激活^[17]。Wnt 信号途径也参与了 TGF- β 促进骨髓干细胞向软骨细胞分化过程^[18]。Wnt 控制小鼠的肢体发育^[19],Wnt 14 可能在鸡的肢芽发育中对滑膜关节形成的起始发挥作用^[20]。

LRP 5/6 是 Wnt 蛋白的辅受体,LRP 5/6 与 Wnt 蛋白及 Frizzled 蛋白的结合对 Wnt 信号途径是非常重要的,LRP 5/6 的缺失将导致 Wnt 信号途径传导出现障碍。LRP 5 对骨骼系统的作用可能是通过 Wnt 信号途径进行的。Dkk-1 是 Wnt 蛋白的对抗物,在骨髓瘤发生的骨溶解过程中扮演了重要的角色^[21]。糖皮质激素能诱导成骨细胞上 Dkk-1 的表达,从而抑制 Wnt 信号途径的传导,抑制成骨细胞的活性,可能是糖皮质激素引起骨质疏松症的发病机制^[22]。而 Dkk-1 和 Wnt 信号途径的对抗作用是通过其与 LRP 5/6 相结合实现的:Dkk-1、跨膜蛋白 Kremen-2 和 LRP 5/6 组成 1 个 3 元复合体,通过内吞作用使 LRP 5/6 从质膜中快速移除,使 LRP 5/6 与 Wnt 结合发生障碍^[23]。Wnt 与 LRP 5/6 结合位置在 LRP 5/6 的第一和第二个 EGF 前体间隔序列,而 Dkk-1 与 LRP 5/6 结合位置在 LRP 5/6 的第三和第四个 EGF 前体间隔序列^[24]。LRP 5 功能增强型 G 171 V 突变位置在第一个 EGF 前体间隔序列,因此 LRP 5 功能增强型骨表型可能是 LRP 5/Wnt 蛋白/Frizzled 蛋白功能增强超过了 DKK-1 的抑制活性的结果;而 LRP 5 功能缺失型骨表型可能是 LRP 5/Wnt 信号途径传导障碍的结果。

3.4 LRP 5 的其他作用

LRP 5 作为 LRDR 大家族成员同样参与了脂肪代谢,作为 Wnt 的共受体参与了胚胎的发育、细胞信号的传导,如眼的发育;LRP 5 参与了葡萄糖诱导的胰岛素分泌过程,与 I 型糖尿病密切相关^[25]。Hoangt 等^[26]发现若 LRP 5 功能受抑制,则骨肉瘤细胞的活性也将明显受到抑制。

4 结语

LRP 5 功能丧失性基因突变表现为骨质疏松、

骨密度下降,而 LRP 5 功能增强的基因突变则表现为骨密度明显增高,说明 LRP 5 可能是调控骨密度的基因之一。LRP 5 基因突变导致骨密度的变化是骨形成和成骨细胞变化的结果,与骨吸收和破骨细胞无明显关联。LRP 5/Wnt 信号途径在骨骼系统的发育及代谢过程中发挥着重要的作用,对 LRP 5/Wnt 信号途径及 Dkk-1 的深入研究将对骨代谢疾病的治疗提供新的途径。

【参 考 文 献】

- [1] Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ, et al. Bone mass, lean mass, and fat mass: same genes or same environments. *Am J Epidemiol*, 1998, 147(1):3-16.
- [2] Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, et al. LRP 5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein is a determinant for bone mineral density. *J Hum Genet*, 2004, 49(2):80-86.
- [3] Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone mass trait. *Am J Hum Genet*, 2002, 70:11-19.
- [4] Gong Y, Slee RB, Fukui N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP 5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 2001, 107:513-523.
- [5] Kato M, Patel MS, Levasseur R, et al. Chfai-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol*, 2002, 157:303-314.
- [6] Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, 2002, 346:1513-1521.
- [7] Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, et al. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP 5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet*, 2003, 72:763-771.
- [8] Babij P, Zhao W, Small C, et al. High Bone Mass in Mice Expressing a Mutant LRP 5 Gene. *J Bone Mineral Res*, 2003, 18:960-974.
- [9] Patel MS, Karsenty G. Regulation of bone formation and vision by LRP 5. *N Engl J Med*, 2002, 346:1572-1574.
- [10] Boyden LM, Insogna K, Lifton RP. The Authors Reply. *N Engl J Med*, 2004, 350:2098-2099.
- [11] Springer TA. An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol*, 1998, 283:837-862.
- [12] Zhuo M. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 2000, 20:542-549.
- [13] Hey PJ, Twells RCJ, Phillips MS, et al. Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene*, 1998, 216:103-111.

(下转第 495 页)

- [14] Johnson ML, Gong G, Kimberling W, et al. Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *Am J Hum Genet*, 1997, 60:1326-1332.
- [15] 李江夏, 龚瑶琴, 刘奇迹, 等. 低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因的基因组结构. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19:467-471.
- [16] Hartmann C, Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*, 2000, 127:3141-3159.
- [17] Rawade G, Vayssiere B, Dunn F, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 1842-1853.
- [18] Zhou S, Eid K, Glowacki J. Cooperation Between TGF- β and Wnt Pathways During Chondrocyte and Asipocyte Differentiation of Human Marrow Stromal Cells. *J Bone Mineral Res*, 2004, 19:463-470.
- [19] Kawakami Y, Capdevila J, Buscher D, et al. Wnt signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell*, 2001, 104:891-900.
- [20] Hartmann C, Tabin CJ. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*, 2001, 104:341-351.
- [21] Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The Role of the Wnt-Signaling Antagonist DKK1 in the Development of Osteolytic Lesions in Multiple Myeloma. *N Engl J Med*, 2003, 349:2483-2494.
- [22] Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, et al. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(1):259-264.
- [23] Mao BY, Davidson G, Marhold J, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Nature*, 2002, 417: 664-667.
- [24] Zorn AM. Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol*, 2001, 11: R592-R595.
- [25] Figueroa DJ, Hess JF, Ky B, et al. Expression of the type I diabetes-associated gene LRP 5 in macrophages, vitamin A system cells, and the Islets of Langerhans suggests multiple potential roles in diabetes. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48:1357-1368.
- [26] Hoang BH, Kubo T, Healey JH, et al. Dickkopf3 Inhibits Invasion and Motility of Saos-2 Osteosarcoma Cells by Modulating the Wnt- β -Catenin Pathway. *Cancer Research*, 2004, 64:2734-2739.

(收稿日期 2004-12-04)