

骨髓基质细胞成脂肪分化的研究进展

范焕琼 综述 崔燎 审校

实验与临床研究证明,骨髓基质细胞成脂肪分化与骨质疏松存在着不可忽视的关系。在去卵巢或类固醇诱发的骨质疏松的动物模型均发现,骨量的丢失伴有骨髓腔内的脂肪细胞的数目大大增加。各种原因导致的骨质疏松患者中,骨髓腔内的脂肪细胞与松质骨的骨量成反比。对成纤维细胞克隆形成单位(CFU-Fs)的分析表明,9月龄大鼠骨髓中的基质干细胞数量明显少于6月龄大鼠^[1],提示了骨髓基质细胞数量的减少和髓内脂肪细胞的增多存在某种关系。

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是骨髓中的一种多潜能干细胞,在一定的条件下能分化为脂肪细胞。骨髓基质细胞分化为脂肪细胞的确切机制尚未明了。有人认为 BMSCs 转化为脂肪细胞增多可能是机体一种衰老的表现。最近的研究发现,髓内的脂肪细胞能影响 BMSCs 内的 ALP 活性,从而阻碍其成骨分化趋势^[2]。髓内的脂肪细胞能诱导 BMSCs 的凋亡,从而使 BMSCs 数量和功能的下降^[3]。可见,阐明骨髓基质细胞分化为脂肪细胞的机制,对骨质疏松发生发展的研究具有重要价值。大量的实验证明,结合在某些受体上的配体可以调节 BMSCs 向脂肪细胞分化的方向。这些受体包括细胞核激素受体、跨膜激酶受体和 G 蛋白偶联受体,它们又有各自特异的配体。这些配体中有的能促进 BMSCs 的脂肪分化,有的能抑制脂肪分化。因此,如果该配体能抑制 BMSCs 的脂肪分化,我们采用这些配体或配体的相似物作为药物可以抗骨质疏松;同理,如果该配体能促进 BMSCs 的脂肪分化,寻找该类配体的抑制剂也可以抗骨质疏松。为了进一步了解骨质疏松和骨量减少与骨髓脂肪增多的关系,笔者从受体水平上对 BMSCs 分化为脂肪细胞的机制作一综述。

1 细胞核激素受体

这类受体包括雌激素受体、糖皮质激素受体、维生素 D₃ 受体、过氧化物酶体增生物激活受体。

雌激素在维持骨吸收与骨形成的平衡中具有极其重要的作用,该作用是通过调节雌激素受体(estrogen receptor, ER)来发挥的。雌激素受体分为 α 和 β 两种类型(ER α , ER β),归属于配体依赖型转录因子(ligand-dependent transcription factors)。成骨细胞或骨髓基质细胞是雌激素作用的靶位点。雌激素能抑制脂蛋白脂肪酶及其转录水平,调整机体的脂肪分布。Heine 等^[4]发现 ER α 敲除的大鼠体内的脂肪组织明显增多。体内缺乏负责雌激素合成的芳香酶的大鼠,脂肪组织也增多。体外实验表明,雌激素能使 ST-2(小鼠骨髓基质细胞株,能表达 ER α 和 ER β)的碱性磷酸酶活性增加,并且抑制脂肪形成。当给与雌激素拮抗剂 ICI182780 时,促进成骨抑制成脂的效应被逆转,而且在脂肪细胞上的细胞色素 P450 酶系统可以将雌激素转化为雄激素,生成的雄激素反过来减少脂肪细胞的生成^[5]。但也有研究发现,雌激素能刺激 BMSCs 成脂。Yuan 等^[6]发现,雌激素能明显促进在向成骨细胞分化培养基中的骨髓基质细胞 PPAR γ 2 mRNA 及蛋白的表达,PPAR γ 2 全称 peroxisome proliferator-activated receptor gamma2,中文称脂质过氧化物体增殖物激活受体 γ 2。该基因的表达增多说明 BMSCs 向脂肪细胞分化;ALP 与 I 型胶原是成骨细胞分化成熟的重要标志,雌激素降低 BMSCs 向成骨细胞分化过程中细胞 ALP 活性及 I 型胶原的合成,表明雌激素促进 BMSCs 成脂分化的同时抑制其向成骨细胞分化。雌激素的作用是促进成脂,还是抑制成脂,目前尚有争议,可能是实验条件不同造成的,如雌激素的浓度,成骨诱导剂的浓度等,这有待进一步的实验证实和研究。

糖皮质激素是第一个被确认促进 BMSCs 成骨分化的因子,表现为增加 F/Stro-I + 细胞(人骨髓基质细胞株)Cbfa1/Runx2、ALP 和骨钙素的表达^[7],上调大鼠 BMSCs 的成骨标志物骨唾液蛋白和骨钙素

的 mRNA 水平,但它对 BMSCs 的成脂分化也有影响。它能增加成脂标志物脂肪酸结合蛋白(aP2)的表达。aP2 mRNA 是脂肪细胞分化的晚期特异性标志物,仅在脂肪细胞分化过程中表达。糖皮质激素可以通过 aP2 基因 5'-旁侧区中的成分介导激活 aP2 基因转录,这可能是地塞米松诱导 BMSCs 分化成脂肪细胞的分子机制之一。而 Shi 等^[8]认为,糖皮质激素促脂肪分化与 PPAR γ 2 基因转录有关。地塞米松首先诱导一种促进脂肪细胞分化的转录因子 C/EBP δ 的表达,而 PPAR γ 2 基因增强子区域含有 C/EBP δ 结合位点,C/EBP δ 在地塞米松诱导下形成后结合至该区域激活 PPAR γ 2 基因的转录。目前研究认为,糖皮质激素对成骨成脂诱导的作用与其作用浓度有关。低剂量时,糖皮质激素表现为促进成骨的作用,高剂量时抑制成骨、促进成脂。贺西京等^[9]发现,大剂量糖皮质激素可引起家兔股骨头骨细胞坏死,同时有大量骨细胞发生脂肪变性。实验动物肝脏脂肪变性,后者可释放出脂肪栓子,在股骨头部因骨内压升高受压变细的血管处极易发生脂肪栓塞,致使局部供血障碍,从而引起骨坏死和骨质疏松,这可能是临床大量使用糖皮质激素后的患者出现股骨头坏死和骨质疏松的原因之一。

VitD 受体(VDR)是一种基因转录调节蛋白,位于细胞核内,不同种属的 VDR 的分子量略有差异。1.25(OH) $_2$ D $_3$ 是 VitD 的活化形式,它和 VDR 特异结合后,形成复合物和靶基因相互作用并调节其转录活性。Kelly 等研究^[10]发现,1.25(OH) $_2$ D $_3$ 能阻断糖皮质激素诱导的 BMSCs 成脂分化,认为它是通过降低脂肪细胞晚期基因标志物 aP2 和脂肪的 mRNA 水平来抑制糖皮质激素诱导的脂肪生成。最近 Duquea 等^[11]发现,VDR 和 PPAR 均属于核激素受体,两者间可能存在互相作用。1.25(OH) $_2$ D $_3$ 能抑制 SAM-P/6(小鼠骨髓基质细胞)中 PPAR γ 2 的表达。另外, Lee 等^[12]报道 1.25(OH) $_2$ VitD $_3$ 能显著地上调 3T3-L1 前脂肪细胞中的胰岛素诱导基因-2(Insulin induced gene-2, Insig-2)的表达。Insig-2 编码的蛋白质能抑制成熟的脂肪细胞的脂肪形成和阻断前脂肪细胞的分化,提示了 1.25(OH) $_2$ D $_3$ 的抗脂肪形成作用可能与上调 Insig-2 的表达有关。可见,VDR 是一种抑制 BMSCs 成脂的受体,它调控成脂分化的机制涉及多个方面。如果临床实验能进一步验证 1.25(OH) $_2$ D $_3$ 和糖皮质激素间的作用、1.25(OH) $_2$ D $_3$ 和 PPARs 间的关系,1.25(OH) $_2$ D $_3$ 将会是一种很有前

景的预防和治疗糖皮质激素引起的骨质疏松症的药物。

PPARs 是一组具有复杂功能的核受体超家族成员,目前已知有 3 种亚型,PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ ,分别由不同基因编码,它们均与脂类的代谢有关,其中 PPAR γ 在脂肪细胞表达最高,尤为重要。PPAR γ 活化后能增强 FATP、FAT/CD36、aP2、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、ACS 及 perilipin 等促脂肪酸储存的基因表达,抑制 β_3 肾上腺素能受体、瘦素及 TNF- α 等促脂解和脂肪酸释放的基因表达。许多甘油三酯代谢相关酶的启动子区域都存在 PPAR 的特异性结合序列,该序列又称过氧化物酶增殖反应元件(PPRE)。某些脂肪酸及其代谢产物、Fibrate 类降脂药(苯氧芳酸)和噻唑烷二酮类(TZD)降糖药是 PPAR γ 的特异配体,这些配体通过激活 PPAR γ 2 可诱导 BMSCs 成脂。除了诱导 BMSCs 成脂外,这些配体还有抑制成骨的作用。动物模型研究发现,TZD 能增加骨髓腔里脂肪组织的含量和降低骨矿密度和松质骨的范围,该作用是通过激活 PPAR γ 2,抑制 Cbfa-1 产生的^[13,14]。Cbfa-1 是 MSCs 向成骨细胞分化的重要因子,它可以激活成骨细胞特有基因的表达,如骨钙素基因、骨涎蛋白基因以及 I 型胶原纤维基因等。Cbfa-1 和 PPAR γ 2 间存在“此消彼长”的关系,Cbfa-1 的表达受抑制时,PPAR γ 2 的表达增加,从而促进 BMSCs 成脂。另外,PPAR γ 的活化能抑制瘦素基因的表达。2 型糖尿病患者采用曲格列酮治疗后,外周血中瘦素下降 68%^[15]。瘦素的下降致中枢抑制骨形成减弱,外周作用增强。在外周表现为促进成骨细胞的活性,抑制破骨细胞活性。并且瘦素的下降,还有降低血压及减少血小板聚集的作用,从而降低心血管疾病及糖尿病并发症的发病风险。由于 2 型糖尿病患者多伴骨吸收增加和(或)骨质疏松的高危因素,TZD 的治疗显得尤为重要,而且为骨质疏松治疗提供了一个新选择。

2 跨膜激酶受体

这类受体包括 Leptin 受体、notch/jagged 和骨形态蛋白受体。

瘦素(Leptin)是一种参与体内多种代谢调节的蛋白质,近年来发现,它在介导脂量和骨量关系上具有重要的价值。人骨髓脂肪细胞有高水平的 Leptin 表达,它可能作为自分泌、旁分泌因子,调节骨髓基质细胞以及造血前体细胞分化。体外研究发现,人重组 Leptin 能提高人骨髓基质细胞株 hMS2-12 的脂

蛋白脂酶 LPL 的 mRNA 水平,后者是成脂分化早期表达的重要基因,但却降低晚期成脂分化基因 adipsin 的表达,脂滴形成率下降 50%^[16]。有学者认为 Leptin 抑制骨髓基质细胞的成脂分化作用可能与 PPAR γ 的磷酸化^[17],刺激促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的级联反应有关^[18]。最近 Hess 等^[19]采用髓鞘穿刺的方法从健康妇女和绝经期骨质疏松患者抽取骨髓,从骨髓里分离 BMSCs 并作体外培养,以观察 Leptin 受体蛋白的表达,结果显示,健康者和骨质疏松患者的 BMSCs 在成骨分化和成脂分化过程中对 Leptin 的反应不同;后者的 BMSCs 具有较低的 Leptin 结合能力,并对 Leptin 的敏感性下降。Leptin 对前者的 BMSCs 显示抑制脂肪细胞分化的作用,但对后者的脂肪细胞分化没有影响,这与骨质疏松患者 Leptin 受体蛋白的表达下降有关。可见,Leptin 受体蛋白表达下降与骨质疏松有着重要的联系,开发 Leptin 受体的配体药物,直接提高 Leptin 受体蛋白的表达,抑制 BMSCs 成脂分化,有望治疗骨质疏松。

Notch 蛋白是一个进化上保守的跨膜受体家族。研究发现 Notch 的信号转导是个复杂的过程,其复杂性体现在:①多种 Notch 受体、配体共同存在;②激活 Notch 可以引发多条信号途径;③许多胞外和胞内蛋白能通过不同的机制调节 Notch 信号;④ Notch 受体的表达水平影响了 Notch 信号的效应。近年来发现,Notch 信号途径在 BMSCs 分化上也起着重要的作用。Shnabel 等^[20]发现成骨细胞上含有 Notch1、Notch2、Delta 1 和 Jagged 1。过度表达的 Notch 能抑制 BMP 诱导 C2C12 细胞的成骨效应,表明 Notch 和 BMP 在诱导成骨方面起着相反的作用。最近 Sciaudone 等^[21]利用逆转录病毒把 Notch 1 的胞内区(NotchIC)导入到鼠的 ST-2 基质细胞和 MC3T3 细胞,过度表达的 Notch 1 能抑制 BMP-2 诱导 ST-2 基质细胞的成骨效应,表现为下调骨钙素、I 型胶原、碱性磷酸酶和 $\Delta 2\Delta$ FosB 蛋白的表达。在添加氢化可的松时,NotchIC 能诱导脂肪细胞的成熟,并加强氢化可的松的成脂作用,表现为上调 adipsin、PPAR γ 、CCAAT 增强结合蛋白 α 和 δ 的 mRNA 水平,表明了 Notch 能促进 BMSCs 的成脂肪细胞分化。

骨形态蛋白受体是一种异源二聚体丝氨酸激酶受体,其 I 型亚单位具有多种亚型。Chen 等^[22]发现 BMP Ib 型受体持续活化可促使小鼠颅骨来源 2T3 细胞分化为成骨细胞,IIa 型受体持续活化促使其分化为脂肪细胞,删切 Ia 型受体引导骨形成,删切 Ib 受体导致脂肪形成,同时阻断 BMP-2 所诱导的 Cbfa1

表达。这些提示了 BMP Ia 和 Ib 型受体在决定向脂肪细胞或成骨细胞分化中起重要作用,可以利用与 BMP I 型受体的不同异构体结合的小分子配体,直接调控 BMSCs 的分化方向。

3 G 蛋白偶联受体

从转基因模型发现,G 蛋白偶联受体也能调控 BMSCs 的分化方向,这类 G 蛋白偶联受体包括谷氨酸受体和甲状旁腺激素及甲状旁腺激素相关蛋白。

谷氨酸及其受体在中枢神经系统研究得比较深入,近年来发现它在骨的代谢和分化上也有重要的作用。成骨细胞和骨髓基质细胞上含有谷氨酸受体,谷氨酸可能通过谷氨酸受体影响一氧化氮合酶的活性,从而调节 BMSCs 的成脂肪分化。最近 Foreman 等^[23]发现,L-谷氨酸能抑制细胞膜上的钙离子通道,使细胞内的钙离子浓度下降。而 Ca^{2+} -钙调蛋白调节一氧化氮合酶的活性,当细胞内的 Ca^{2+} 浓度下降时,一氧化氮合酶的活性也随着下降,给予谷氨酸受体的抑制剂时,这种作用消失。一氧化氮合酶活性的变化,引起 NO 水平的改变。NO 也是一种调节 BMSCs 成骨分化的重要因子,NO 供体硝普钠可引起 BMSCs 的 OPG/RANKL 比值增加,从而促进成骨。尽管谷氨酸信号途径在体外研究得比较清楚,但体内研究却不尽人意。谷氨酸受体或运载体敲除的小鼠,骨骼没有明显的异常。GLAST-1(谷氨酸其中一种运载体)基因所在部位发生突变的患者出现骨骼的异常,但不能明确指出是 GLAST 基因突变引起的。由于谷氨酸受体的激动剂不能透过血脑屏障,对中枢神经系统影响小,开发谷氨酸受体的配体药物治疗骨质疏松,有副作用小的特点。

甲状旁腺激素(PTH)是维持机体钙磷代谢平衡的一种重要的调钙激素,而甲状旁腺激素相关蛋白(PTH-related peptide,PTHrP)是体内一种真实的分泌形式,它与 PTH 在编码基因、分子结构和受体功能上有许多相同或相似之处。PTH 和 PTHrP 能作用于同一受体,该受体称为“PTH/PTHrP 受体 1”,属 G 蛋白偶联受体超家族中 B 亚族成员,主要分布在骨骼和肾脏组织。PTH/PTHrP 受体 1 参与两条信号传导途径,分别是磷脂酶 C-钙-蛋白激酶 α (PLC/PKC) 信号转导途径和腺苷酸环化酶-cAMP-蛋白激酶 A (AC/PKA) 信号转导途径。PTHrP 主要表现为抑制 BMSCs 成脂肪分化,PTHrP 缺失的杂合子小鼠,表现为骨小梁容积下降和骨髓脂肪容量增多^[24]。Chan 等^[25]发现,PTHrP 能通过 PKA 途径使前脂肪细胞株

3T3-L1 的 MAPK 活性增加,从而增加 PPAR γ 的磷酸化,后者使 PPAR 转录活性降低,脂肪特异基因的表达减少。尽管 PTH 和 PTHrP 的抑制骨髓脂肪形成的作用是肯定的,但其确切机制仍需继续深入,它对骨质疏松的治疗具有潜在的临床应用前景。

综上所述,虽然人们对调控 BMSCs 成脂肪分化的因子有了一定的认识,但对其确切机制仍未明确。我们相信,随着对 BMSCs 的发育分化、激活和作用机制研究的进一步深入,抑制 BMSCs 脂肪细胞分化或诱导 BMSCs 转化为成骨细胞的新型药物,必将推进对骨质疏松治疗药物研究及骨质疏松类代谢性骨病的防治。

【参 考 文 献】

- [1] Kotev-Emeth S , Savion N , Pri-chen S , et al. Effect of maturation on the osteoblast response of cultured stromal bone marrow cells to basic fibroblast growth factor. *Bone* 2000 ,27 :777-783.
- [2] 王华松 ,陈庄洪 ,罗永湘. 髓内脂肪细胞对骨髓基质细胞成骨能力的影响. *中华实验外科杂志* 2005 ,22 :832-834.
- [3] 王华松 ,陈庄洪 ,罗永湘. 髓内脂肪细胞促骨髓基质细胞凋亡的实验研究. *中国骨质疏松杂志* 2005 ,11 :325-328.
- [4] Heine PA , Taylor JA , Iwamoto GA , et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ,97 :12729-12734.
- [5] Okazaki R , Inoue D , Shibata M , et al. Estrogen Promotes Early Osteoblast Differentiation and Inhibits Adipocyte Differentiation in Mouse Bone Marrow Stromal Cell Lines that Express Estrogen Receptor (ER α or β). *Endocrinology* 2002 ,143 :2349-2356.
- [6] Yuan CL , Jin XF , Hou JH , et al. Effect of 17 β -estradiol on the gene expression of PPAR- γ 2 in bone marrow stromal cells of rats. *Chin J Endocrinol Metab* 2004 ,20 :67-70.
- [7] Ahdjoudj S , Lasmoles F , Oyajobi BO , et al. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. *Cell Biochem* 2001 ,81 :23-38.
- [8] Shi XM , Blair HC , Yang X , et al. Tandem repeat of C/EBP binding sites mediates PPARgamma2 gene transcription in glucocorticoid-induced adipocyte differentiation. *J Cell Biochem* ,2000 ,76 :518-527.
- [9] 贺西京 ,毛履真 ,王坤正 ,等. 激素性股骨头坏死与骨细胞脂肪变性的实验研究. *中华骨科杂志* ,1996 ,16 :44-46.
- [10] Kelly KA , Gimble JM. 1 ,25-Dihydroxy vitamin D $_3$ inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology* ,1998 ,139 :2622-2628.
- [11] Duquea G , Macoritto M , Kremer R. 1 ,25(OH) $_2$ D $_3$ inhibits bone marrow adipogenesis in senescence accelerated mice (SAM-P/6) by decreasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma χ (PPARgamma2). *Exp Gerontol* 2004 ,39 :333-338.
- [12] Lee S , Lee DK , Choi E , et al. Identification of a Functional Vitamin D Response Element in the Murine Insig-2 Promoter and its Potential Role in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Mol Endocrinol* , 2005 ,19 :399-408.
- [13] Tomvig L , Mosekilde LI , Justesen J , et al. Troglitazone treatment increases bone marrow adipose tissue volume but does not affect trabecular bone volume in mice. *Calcif Tissue Int* 2001 ,69 :46-50.
- [14] Lecka-Czemik B , Moerman EJ , Grant DF , et al. Divergent effects of selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 ligands on adipocyte versus osteoblast differentiation. *Endocrinology* ,2002 ,143 :2376-2384.
- [15] Watanabe S , Takeuchi Y , Fukumoto S , et al. Decrease in serum leptin by troglitazone is associated with preventing bone loss in type 2 diabetic patients. *J Bone Miner Metab* 2003 ,21 :166-171.
- [16] Thomas T , Gori F , Khosla S , et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* ,1999 ,140 :1630-1638.
- [17] Hu E , Kim JB , Sarraf P , Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* ,1996 ,274 :2100-2103.
- [18] Lai CF , Chaudhary L , Fausto A , et al. Erk is essential for growth , differentiation , integrin expression , and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* ,2001 ,276 :14443-14450.
- [19] Hess R , Pino AM , Rios S , et al. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J Cell Biochem* 2005 ,94 :50-57.
- [20] Shnabel M , Fichtel I , Gotzen L , et al. Differential expression of Notch genes in human osteoblastic cells. *Int J Mol Med* 2002 ,9 :229-232.
- [21] Sciaudone M , Gazzero E , Priest L , et al. Notch 1 Impairs Osteoblastic Cell Differentiation. *Endocrinology* 2003 ,144 :5631-5639.
- [22] Chen D , Ji X , Harris MA , et al. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* ,1998 ,142 :295-305.
- [23] Foreman MA , Gu Y , Howl JD , et al. Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca $^{2+}$ influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 2005 ,204 :704-713.
- [24] Amizuka N , Karaplis AC , Henderson JE , et al. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol* ,1996 ,175 :166-176.
- [25] Chan GK , Miao D , Deckelbaum R , et al. Parathyroid Hormone-Related Peptide Interacts with Bone Morphogenetic Protein 2 to Increase Osteoblastogenesis and Decrease Adipo-genesis in Pluripotent C3H10T Mesenchymal Cells. *Endocrinology* 2003 ,144 :5511-5520.

(收稿日期 :2005-11-03)