·综述·

破骨细胞的分化及其调节研究进展

王斌 综述 吴小涛 审校

摘要：破骨细胞(Osteoclast OC)来源于单核/巨噬细胞谱系，其数量和活性的不足或增加分别会导致骨硬化症和骨质疏松及其他溶骨性疾病。为了更好的理解这些疾病的发病机理和制定相关治疗方案，我们就必须揭示破骨细胞的分化调节机制。笔者将就破骨细胞在分化过程中的信号通路及其调节因素以及一些潜在可行的治疗骨量丢失相关疾病的方法予以综述。

关键词：破骨细胞；分化；调节；骨质疏松

A review on research progress of differentiation and regulation of osteoclast *WANG Bin*, *WU Xiaotao*. *Department of Orthopaedics*, *the Affiliated ZhongDa Hospital of Southeast University*, *Nanjing* 210009, China

Abstract: The osteoclast is a member of the monocyte/macrophage family, decreased or increased number and activity of osteoclasts respectively causes osteopetrosis or osteoporosis and other osteolytic diseases. To better understand the mechanisms underlying osteoclast-based diseases and design relevant therapies, one should unveil the molecular basis of osteoclast differentiation. This review will outline up-to-date information regarding the signaling pathways and the regulating factors of osteoclast differentiation and some potential therapies that aim at curing the osteolytic diseases.

Key words: Osteoclast; differentiation; regulation; osteoporosis

1 破骨细胞的分化及其通路

在过去十年中，我们认识到破骨细胞的分化过程主要被基质/成骨细胞及来源于它们的C-MSF（巨噬细胞集落刺激因子）和RANKL（ligand of receptor activator of NF-κB，核因子κB受体活化因子配体）所调控[1]。进一步研究表明，在典型破骨细胞基因：降钙素受体（CT）、抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）、组织蛋白酶k（cathepsin K）、以及β3整合素的表达中，C-MSF和RANKL都是必需的。

1.1 CSF及其相关受体与OC的分化

CSF及其酪氨酸激酶受体c-fms是破骨前体细胞分化成熟所必须的。fms调节转录因子c-fos的表达，而fms的表达则有赖于PU.1，缺少它们将导致骨质硬化症。破骨前体细胞上还有其他一些酪氨酸激酶受体，如kit，met，flt 3[2]，它们也能在体外和体内影响破骨细胞形成。

1.2 RANKL-RANK-TRAF轴与OC的分化

RANKL和RANK分别是TNF和TNF受体超家族，在破骨细胞形成中二者都是必需的。RANK被RANKL激活后，能募集肿瘤坏死因子受体相关因子（tumornecrosis factor receptor-associated factors，TRAFs）至它的胞质尾部。通过TRAFs（包括TRAF 1、2、5、6）的连接作用，继而激活下游的酪氨酸或丝氨酸/苏氨酸激酶，包括NIK（NF-kappaB-inducing kinase，NF-κB诱导激酶），c-src，Akt/PKB，and MEKK-1（MAPK kinase kinase-1）。研究表明，RANK确实包含有几个介导OC形成和功能发挥的区域[3]，$PFQEP^{369-373}$（Motif 1），$PVQEET^{559-564}$（Motif 2）和$PVQEQG^{604-609}$（Motif 3）都能独立地介导OC形成和功能发挥，而且后二者的效力似乎更强。其中，Motif 1是TRAF-6结合的区域。在RANKL的刺激下，Motif 1能激活NF-κB和MAPKs（mitogen-activated protein kinases，促分裂原活化蛋白激酶，包括c-Jun，p38，ERKs家族）[3]。Motif 2、Motif 3和TRAFs中的哪一个或哪几个成员特异结合，以及结合以后将激活哪些信号途径目前还不太明确。TRAF 2和6频繁结合于RANK的TRAFs结合位点，而TRAF-6则被认为是RANK相关信号传导的重要连接者。去除TRAF-6基因和那些缺乏TRAF 6结合序列的RANK的突变体一样，都能导致骨质疏松[4]。

作者单位：210009 南京，东南大学附属中大医院骨科
通讯作者：吴小涛，Email：wuxiaotao@medmail.com.cn

最终[5]，通过 TRAF-6 的连接作用，NF-κB、MAPKs（c-Jun，p 38，ERKs）、NFAT 2（即 NFATc 1，Nuclear Factor of Activated T-cells，活化 T 细胞核因子）[6] 和酪氨酸或丝氨酸/苏氨酸激酶将被激活。（1）NF-κB 的激活：转录因子 NF-κB 的激活过程包括：（a）NF-κB 的抑制蛋白 IkB（Inhibitor of nuclear factor kappa B）被上游的 IkB 激酶（IKK）磷酸化导致 NF-κB 的释放；（b）被释放的 NF-κB 的核转位。NF-κB 二聚体结合于 DNA 特定部位以后可以激活一些基因的转录活性，其中包括编码 TNF，IL-1 和 IL-6 的基因，而这些细胞因子本身又能激活 NF-κB 通路，于是就形成了一个正反馈，放大了炎症性的骨损害作用。干扰 NF-κB 的激活和去除 NF-κB 的亚基（p50 和 p52）都能抗破骨细胞形成。（2）MAPK 的激活：MAPK 通路也是 RANK-TRAF 6 轴上的一个重要信号通路。TRAFs 能引起上游激酶 MEKK-1 的激活，最终导致 3 个不同的 MAPK 家族：JNK/c-Jun，ERK 1/2，和 p38 激酶的激活。MAPK 的显性负性形式和 MAPK 通路的选择性抑制剂能抑制破骨细胞形成或降低其生存能力[7,8]。（3）NFAT 2 的激活：Asagiri 等[9] 将破骨细胞的分化归纳为与 NFATc1 相关的 3 个阶段：① RANKL 和 RANK 结合后导致 TRAF 6 的募集，继而激活下游分子，如 NF-κB。NFATc 2 和 NF-κB 共同结合于 NFATc 1 启动子，从而启动 NFATc 1 表达。② NFATc 1 结合于其自身的启动子，导致了 NFATc 1 强烈的自放大（autoamplification），这个过程需要钙信号的激活以及 AP-1 的作用。RANKL 诱导 NFATc 1 在 NFATc 1 启动子而不是 NFATc 2 启动子的选择性募集。③转录激活复合物（包括 NFATc 1 及其辅助分子 AP-1，PU.1，MITF）对破骨细胞特定基因（如 CT、TRAP、cathepsin K 和 OSCAR）的激活。④另外，酪氨酸激酶 c-src 的激活对破骨细胞形成也有重要作用，它能选择性地磷酸化破骨前体细胞中的酪氨酸来激活 NF-κB 通路，并通过连接于 TRAF 6 来促进 Akt/PI 3 K 通路的激活。

2 破骨细胞分化信号通路的调节

2.1 成骨细胞对破骨细胞分化的调节

成骨细胞（Osteoblast OB）分泌的 OPG（Osteoprotegerin 骨保护素，一种可溶性 TNF 受体家族成员）是 RANKL 的伪受体，能与 RANKL 结合，进而抑制破骨细胞的形成、活性和存活，如图 1 所示。

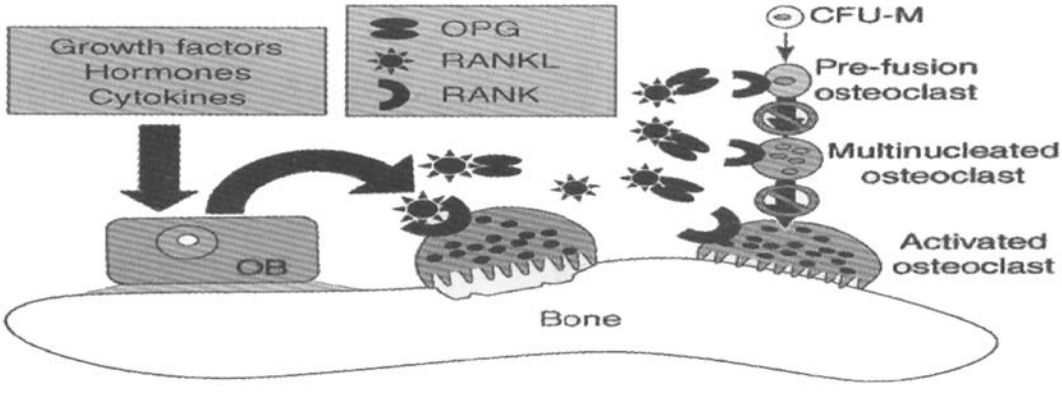

图 1[10]

另外，OPG 也能结合 TRAIL（TNF-related apoptosis-inducing ligand，TNF 相关诱导凋亡配体），它也是由成骨细胞分泌[11]，也能干扰 RANKL 的信号传导。TRAIL 是通过阻断 M-CSF 和 RANKL 对 p38 通路的激活，而不是通过细胞毒性作用或诱导 OPG 的表达来抑制破骨细胞形成的[12]。TRAIL 的受体有 TRAIL-R 1，TRAIL-R 2，TRAIL-R 3，TRAIL-R 4 和 OPG，其中 TRAIL-R 1 和 TRAIL-R 2 在凋亡激活中发挥作用。

2.2 IkB 和 IKK 的调节作用

IkBα、IkBβ、IkBε 在 NF-κB 的胞浆滞留方面有重要作用，同时还能够抑制依赖于 NF-κB 基因的基础表达。但 Tergaonkar 等[13] 也发现，在缺乏 IkBα、IkBβ 和 IkBε，NF-κB 的胞浆滞留由其他蛋白辅助时，NF-κB 通路表现为对激活物的不应答，这又说明 IkB 在 NF-κB 的激活中十分重要。IKK 在 NF-κB 的激活中发挥重要作用，但 Correa[14] 和 Lawrence 等[15] 却发现 IKK 1 对 NF-κB 的活性起着负性调节作用。

2.3 细胞因子的调节作用

TNF 促进 T 细胞产生 M-CSF 并刺激 OB 和其他细胞分泌 RANKL，进而促进 OC 分化[16]，TNFα 促进成骨/基质细胞分泌 RANKL 的作用是通过 TNFR 1

来介导的[17]，但其机制不祥。Lam 等[18]认为 TNF 完全通过 RANKL/RANK 通路发挥其作用，Zhang YH[19]认为在 OC 前体细胞中，TNF 的协同信号传导和 RANK 启动的信号传导有叠加，而 Kobayashi 则认为在缺乏 RANK 的情况下，TNF 完全能诱导 OC 的形成。TNFα 与 TNFR 1 结合后启动了破骨前体细胞 NF-κB、JNK、p38、ERK、Akt 等信号传导途径，促进破骨细胞前体细胞分化[20]。TNFR 2 传导的则是 OC 抑制信号[21]，但 TRAF 2 和 TNFR 2 结合后，导致了 NF-κB 的激活。TNFR 2 激活 NF-κB 的同时还能抑制破骨细胞生成的机制还不清楚。TNF 还能促进 NF-κB 基因的表达。TNF 作用于破骨前体细胞后，c-src 迅速被激活，同时，TNF 诱导 c-src 与 IkB 形成一个持续存在的复合体。在 c-src (－/－)的破骨前体细胞中，TNF 对 NF-κB 的激活明显延迟和被抑制。这些说明 c-src 在 TNFα 介导的 NF-κB 的激活过程中起着重要的作用。

IL-1 亦能促进 OB 分泌 RANKL，促进 OC 形成[22]，但 IL-1 并不能取代 RANKL 的作用，Fox 等[23]认为 IL-1 对 OC 的作用在很大程度上还依赖于 OB。Abu-Amer Y[24]认为，IL 4 能通过抑制 IkB 的磷酸化来抑制 NF-κB 的核转位，进而抑制 NF-κB 的 DNA 结合活性，从而完全抑制 OC 形成，此过程依赖于 IL 4 诱导的信号传导与转录激活物 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT 6)的表达。IL-4 通过 STAT 6 抑制破骨细胞 RANKmRNA 的表达，进而抑制骨吸收[25]。

INF-γ 通过促进 TRAF 6 的降解来抑制 OC[26]，而 RANKL 诱导的 OC 前体细胞分泌的 INF-β 被认为是抑制 OC 形成的一种自身反馈调节机制。

TGF-β 低溶度促进，高溶度抑制 OC 分化[27]，其促进作用可能替代 RANKL[28]。TGF-β 还和地塞米松[29]以及 TNF[30]有协同促 OC 形成作用。TGF-β 对破骨细胞形成的调节是通过其对 p38 MAPK 通路的调节和对 RANK 表达的调节实现的[31]。

2.4 雌激素的调节作用

雌激素能通过 TGF-β，成骨细胞分泌产物[32]，和 ERKs 磷酸化[33]等途径的介导来促进破骨细胞的凋亡，亦能够通过促进 OPG 的产生和抑制 C-MSF 及 TNF 的产生来抑制 OC 产生。另外，雌激素也能通过抑制 c-JNK 的表达和 c-JUN 的活性以及 AP-1 和启动子的结合来抑制 RANKL 诱导的 OC 的产生[34]。

3 可能的治疗途径

抑制 NF-κB 激活的各个阶段都有可能提供有意义的治疗价值[35]。McClung 等[36]报道，作用于人 RANKL 的单克隆抗体 Denosumab，在人体试验中已取得较好的疗效。作用于 $PFQEP^{369-373}$ (Motif 1)的伪受体多肽能够阻断 OC 形成[37]。Hideo Shimizu 等[38]则用伪受体寡核苷酸(decoy oligonucleotide)来抑制 NF-κB 通路的激活。Yin 等发现阿司匹林和水杨酸盐能抑制 ATP 和 IKKβ 的结合，继而抑制 IkB 的磷酸化和 NF-κB 通路的激活。另外，IkB 的抗磷酸化形式，即丝氨酸(32 S, 36 S)或酪氨酸(Y 42)的突变体有抗 TNF 诱导的破骨细胞形成作用[39]。Spencer[40]用 TNF 的抑制剂 Etanercept (Enbrel)来抑制它的骨损害作用。Li P 等[41]还发现，Etanercept 能完全逆转 TNFα 转基因小鼠外周血中 OC 前体细胞(CD 11 b 阳性细胞群)的增加。通过腺病毒转导 IL 4 基因，在佐剂诱导的关节炎模型中具有抗炎和抗骨破坏的作用[42]。重组人类 IL-1 受体阻断分子 anakinra(阿那白滞素)已经应用于临床。Wu 等[43]用 Fas 抗体来促进破骨细胞的凋亡，并且其凋亡通路是由经典的 Fas 信号所介导。另外，STAT 6 亦可能成为抗骨吸收的目标蛋白。

4 展望

破骨细胞分化的信号调节系统极其复杂，多种信号分子和细胞因子参与其中。因此，我们还需要对各种信号分子及其信号通路作进一步深入细致的研究。对破骨细胞分化的分子机制作进一步的研究，是设计各种作用于骨吸收的新药的基础。

【参考文献】

[1] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell, 1998, 93(2): 165-176.

[2] Lean JM, Fuller K, Chambers TJ, et al. FLT3 ligand can substitute for macrophage colony-stimulating factor in support of osteoclast differentiation and function, Blood, 2001, 98: 2707-2713.

[3] Liu W, Xu D, Yang H, et al. Functional identification of three RANK cytoplasmic motifs mediating osteoclast differentiation and function. J Biol Chem, 2004, 279: 54759-54769.

[4] Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, et al. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. EMBO J, 2001, 20(6): 1271-1280.

[5] Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, (2006), doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.008.

[6] 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.

[7] Li X, Udagawa N, Itoh K, et al. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast

function. Endocrinol, 2002, 143(8): 3105-3113.
[8] Lee ZH, Lee SE, Kim CW, et al. IL-1alpha stimulation of osteoclast survival through the PI 3-kinase/Akt and ERK pathways. J Biochem, 2002, 131(1): 161-166.
[9] Masataka Asagiri, Hiroshi Takayanagi. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone(2006), doi: 10.1016/j.bone.2006.09.023.
[10] Kostenuik PJ. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. Curr Opin Pharmacol, 2005, 5: 618-625.
[11] Bu R, Borysenko CW, Li Y, et al. Expression of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. Bone, 2003, 33: 760-770.
[12] Zauli GE. Rimondi TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL + MCSF. Blood, 2004, 104: 2044-2050.
[13] Tergaonkar V, Correa RG, Ikawa M, et al. Distinct roles of IkappaB proteins in regulating constitutive NfkappaB activity. Nat Cell Biol, 2005, 7: 921-923.
[14] Correa RG, Matsui T, Tergaonkar V, et al. Zebrafish IkappaB kinase 1 negatively regulates NF-kappaB activity. Curr Biol, 2005, 15: 1291-1295.
[15] Lawrence T, Bebien M, Liu GY, et al. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. Nature, 2005, 434: 1138-1143.
[16] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL, et al. Osteoclast differentiation and activation. Nature, 2003, 423: 337-342.
[17] Abu-Amer Y, Abbas S, Hirayama T, et al. TNF receptor type 1 regulates RANK ligand expression by stromal cells and modulates osteoclastogenesis. J Cell Biochem, 2004, 93: 980-989.
[18] Lam J, Takeshita S, Barker JE, et al. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macro-phages exposed to permissive levels of RANK ligand. J Clin Invest, 2000, 106(12): 1481-1488.
[19] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med, 2000, 191(2): 275-285.
[20] Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. Gene, 2005, 350: 1213.
[21] Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulous L, et al. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. J Biol Chem, 2001, 275(35): 27307-27310.
[22] Kudo OY, Fujikawa I, Itonaga I, et al. Proinflammatory cytokine (TNFa/IL-1a) induction of human osteoclast formation. J Pathol, 2002, 198: 220-227.
[23] Fox SW, Fuller K, Chambers TJ. Activation of osteoclasts by interleukin-1: divergent responsiveness in osteoclasts formed *in vivo* and *in vitro*. J Cell Physiol, 2000, 184: 334-340.
[24] Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1375-1385.
[25] Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, et al. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT62-dependent mechanism: Irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. Blood, 2003, 102: 1078-1086.
[26] Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma [see comment]. Nature, 2000, 408: 600-605.
[27] Karst M, Gorny G, Galvin RJS, et al. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF2beta regulation of osteoclast differentiation. J Cell Physiol, 2004, 200: 99-106.
[28] Itonaga I, Sabokbar A, Sun SG, et al. Transforming growth factor-beta induces osteoclast formation in the absence of RANKL. Bone, 2004, 34: 57264.
[29] Takuma A, Kaneda T, Sato T, et al. Dexamethasone enhances osteoclast formation synergistically with transforming growth factor-β by stimulating the priming of osteoclast progenitors for differentiation into osteoclasts. J Biol Chem, 2003, 278: 44667-44674.
[30] Lovibond AC, Haque SJ, Chambers TJ, et al. TGF-β induced SOCS3 expression augments TNFa-induced osteoclast formation. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309: 762-767.
[31] Karsdal MA, Hjorth P, Henriksen K, et al. Transforming growth factor-β controls human osteoclastogenesis through thep38 MAPK and regulation of RANK expression. J Biol Chem, 2003, 278: 44975-44987.
[32] Kapczuk K, Sowinska-Przep iera E, Friebe Z. Osteoprotegerin / RANKL /RANK system and postmenopausal osteoporosis. The possible therapeutic aspects. Ginekologia Polska, 2003, 74: 323-331.
[33] Chen JR, Plotkin LI, Aguirre JI, et al. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti- versus Pro-Apoptotic Effects of Estrogens. J Biol Chem, 2005, 280: 4632-4638.
[34] Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, 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.
[35] Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-κB pathway in the treatment of inflammation and cancer. J Clin In, 2001, 107(2): 135-142.
[36] McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. N Engl J Med, 2006, 354: 821-831.
[37] Ye H, Arron JR, Lamothe B, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. Nature, 2002, 418: 443-447.
[38] Hideo Shimizu, Hironori Nakagami, Natsuki Yasumasa, et al. NFkB Decoy Oligo-deoxynucleotides Inhibit Osteoclast Differentiation and Activation *In Vitro* and Improve Osteoporosis of Ovariectomized and Vitamin C Difficient Rat Models. Molecular Therapy, 2006, 13 (Suppl1): doi: 10.1016/j.ymthe.2006.08.792.
[39] Abu-Amer Y, Dowdy SF. TAT fusion proteins containing tyrosine 42-deleted IkappaBalpha arrest osteoclastogenesis. J Biol Chem, 2001, 276(32): 30499-30503.
[40] Spencer-Green, G. Etanercept (Enbrel): update on therapeutic use. Ann Rheum Dis, 2000, 59(Suppl): 46-49.
[41] Li P, Schwarz Em. et al. Rank signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11 osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. J Bone Miner Res, 2004, 19: 207-213.
[42] Woods JM, Katschke Jr KJ. IL-4 adenoviral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis. J Immunol, 2001, 166 (2): 1214-1222.
[43] Wu X, McKenna MA, Feng X, et al. Osteoclast apoptosis: the role of Fas *in vivo* and *in vitro*. Endocrinology, 2003, 144: 5545-5555.

(收稿日期：2007-01-15)