

破骨细胞分化成熟因子及其信号转导通路

黄晓斌 孙元明 李雨民 杨福军

摘要: 破骨细胞从起源发育至成熟,再经活化发挥吸收作用是一个复杂的多级调控过程,始终都受到一系列细胞因子的影响。有些细胞因子对破骨细胞的成熟分化起促进作用,如:RANKL、TNF- α 、IL-1、IL-6、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 、PTH、M-CSF等,其中RANKL和M-CSF是破骨细胞形成和分化过程中的两个必需的因子;有些因子起抑制作用,如:OPG、IL-4、IL-10、雌激素、降钙素、TGF- β 等。OPG/RANK/RANKL系统在破骨细胞分化成熟过程中起着枢纽作用,大部分细胞因子都直接或间接地通过OPG/RANK/RANKL系统来发挥作用,其中还涉及到成骨细胞、破骨细胞、基质细胞等复杂的相互作用。介导破骨细胞分化成熟的各种细胞因子反应的信号传导路径主要包括MAPK、NF-kappaB、CN/NFAT等通路,全面地了解破骨细胞因子及其信号传导通路,将有助于临床更好地分析各种骨代谢性疾病的病因及发病机制,进而为治疗提供理论依据。

关键词: 破骨细胞; 细胞因子; 信号转导

The cytokines of osteoclast and their path of signal transduction HUANG Xiaobin , SUN Yuanming , LI Yumin , et al . Department of Biomedicine , Institute of Radiation Medicine , CAMS & PUMC , Tianjin 300192 , China

Abstract: It is a complicated process that osteoclast differentiates from progenitor to mature osteoclast which have the function of bone resorption. There are series of cytokines and systemic hormones involved in this phase. Some cytokines promote osteoclast development ,such as RANKL ,TNF- α ,IL-1 ,IL-6 ,1,25(OH) $_2$ D $_3$,PTH ,M-CSF , and the list will go on , in which RANKL and M-CSF are essential. Other cytokines inhibit osteoclast growth ,such as OPG ,IL-4 ,IL-10 ,estrogen ,calcitonin ,TGF- β , and so on. The OPG/RANK/RANKL system is vital in the period. Most of cytokines play role through OPG/RANK/RANKL system directly or indirectly. The interaction between osteoclast and osteoblast or stromal cell is also important. There are several signal pathways such as MAPK ,NF-kappaB and CN/NFAT , involved in osteoclast differentiation. Understanding the cytokines of osteoclast and path of signal transduction respectively make it possible for us to comprehend the development and the treatment of the bone metabolic diseases.

Key words: Osteoclast ; Cytokine ; Signal transduction

骨是一不断更新的组织,骨吸收和骨形成的动态平衡维持着正常的骨代谢。骨吸收的主要细胞是破骨细胞(osteoclast,OC)。破骨细胞是体内高度专业化的细胞,来源于造血干细胞单核-巨噬细胞前体分支。破骨细胞前体细胞是单核细胞,含皱折缘。当这些单核细胞贴附于骨表面时,在一定的微环境中形成成熟的TRAP阳性的多核破骨细胞。成熟的破骨细胞形态多为不规则的圆形或卵圆形,大小不

等,形状不一,直径约20~100 μ m,含有2~50个核,核膜光滑,染色质颗粒微细,分布均匀。破骨细胞在分化成熟过程中受到一系列细胞因子的影响。

1 破骨细胞分化成熟因子

1.1 肿瘤坏死因子超家族(tumor necrosis factors , TNFs)

破骨细胞分化成熟的过程中,有三个非常重要的因子,即骨保护素(OPG)、细胞核因子kappaB受体活化因子(RANK)、细胞核因子kappaB受体活化因子配基(RANKL),它们都是肿瘤坏死因子配体和受体家族成员,这三个因子所形成的OPG/RANKL/RANK系统介导了OC形成、分化过程中所必须的细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400240)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所

通讯作者:黄晓斌,Email:HXB19800401@163.com

胞间信号传递。当刺激因素作用于成骨细胞 (osteoblast, OB) 基质细胞 (stromal cell, SC), 诱导其膜上表达 RANKL 分子, 通过与 OC 前体细胞膜上 RANK 直接结合, 将信号传入前体细胞, 引起级联瀑布反应, 使 OC 分化成熟, 而 OPG 则由 OB/SC 旁分泌发挥作用, 竞争性与 RANKL 结合, 封闭 RANKL 与 RANK 的结合, 将抑制 OC 的分化、成熟。RANKL 是可直接诱导 OC 分化的细胞因子, 其他细胞因子或激素都是直接或间接地通过 RANKL 与 RANK 或 OPG 的相互作用来影响 OC 分化与成熟的。

1.1.1 细胞核因子 κ B 受体活化因子 (receptor activator of NF-kappaB, RANK): RANK 为 I 型跨膜蛋白 (N-端在胞外), 主要表达在单核巨噬细胞系表面, 前体 OC 表面高度表达。RANK 的主要功能是与 OB/SC 表达的 RANKL 结合, 促进 OC 分化成熟。RANK 与 TNFR 有部分同源的保守序列, 实验证明, 一段模仿 TNFR 作用位点的肽段 (WP 9 QY), 也能与 RANKL 结合, 抑制 RANK 的下游激活作用^[1]。RANK 发挥作用时, 主要是与 RANKL 的 C-端结合产生并传递信号, RANK 胞内结构域与肿瘤坏死因子受体相关因子 (TNF receptor-associated factor, TRAF) 家族中的 TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF5 和 TRAF6 结合, 通过 JNK 等通路介导信号的转导。Liu W 等^[2]发现 RANK 转导信号主要通过胞内 3 个结构域, 不同结构域与相应的 TRAF 结合后有不同的信号传导途径: PFQEP (369 ~ 373) 主要发起 NF-kappa B、JNK、ERK 和 p38 等几条通路; PVQEEI (559 ~ 564) 刺激 NF-kappa B 和 p38 两条通路; PVQEQG (604 ~ 609) 则只影响 NF-kappa B 通路。Xu D 等^[3]最近发现 RANK 胞内结构域的一个四氨基酸序列 (535 IWY 538) 可能参与另外一条非常重要的信号途径来促进 OC 前体的形成。

1.1.2 骨保护素 (osteoprotegerin, OPG): OPG 属于 II 型跨膜蛋白 (C-端在胞外), OPG 与其他 TNF 受体分子的最大区别是: OPG 不具有跨膜的疏水区域。OPG 共可分为 7 个结构域, 这 7 个结构域共形成 3 个功能区: ① TNF 受体结构区, 包括结构域 1 ~ 4, 即 4 个富含半胱氨酸的结构区域, 这一结构区主要执行抑制破骨细胞形成的功能; ② 致死结构区, 包括结构域 5 和 6; ③ 肝素结合结构区。OPG 主要表达于 OB 表面, 是 RANKL 的诱骗受体, 与 RANK 竞争 RANKL, 从而抑制 OC 激活、分化。OPG 主要作用于 OC 分化的末期阶段, 不但能阻断 OB 激活 OC 分化功能, 还能抑制成熟 OC 的存活及其骨吸收活性。

1.1.3 细胞核因子 kappaB 受体活化因子配基 (receptor activator of NF-kappaB ligand, RANKL): RANKL 属于 I 型跨膜蛋白, 是 RANK 的配体, 同时也是 OPG 的配体, 故有时也称为 OPGL。RANKL 由 OB 产生, T 淋巴细胞激活, 当受到骨吸收刺激时表达在 OB/SC 表面, 通过与 RANK 结合, 传递信号给 OC 前体, 诱导 c-Fos 等转录因子的表达, 从而促进 OC 前体沿 OC 通路分化。RANKL 必须与 M-CSF 联合作用才能迅速使 OC 前体细胞表达为 OC 的标志性蛋白质, 如降钙素受体、 α v β 3 整合素、溶酶体酶等, 说明 RANKL 和 M-CSF 两者对 OC 的分化都是必需的, 二者缺一不可。RANKL 和 M-CSF 联合应用能取代 OB/SC 的作用, 在体外能使脾细胞或外周血单核细胞分化成 OC。

1.1.4 OPG/RANK/RANKL 系统: OB 与 OC 前体在各种细胞因子或激素的刺激下, 通过 OPG/RANK/RANKL 复杂的相互作用, 精密地调节着 OC、OB 平衡。OB 前体通过接受骨吸收诱导分子的信号, 如 IL-1 α 、IL-6、IL-11、IL-16、IL-17、TNF- α 、PTH、PTHrP、1, 25(OH) $_2$ D $_3$ 、糖皮质激素等信号刺激作用下, RANKL 基因的表达水平上调, 从而最终促进 OC 活化; 而 IL-8、IL-12、TNF- γ 、BMP-2、TGF- β 、雌激素等可以上调 OB 的 OPG 表达, OPG 与 RANKL 结合, 拮抗 RANK 的作用, 从而抑制 OC 的分化成熟。TNF 也可以刺激基质成骨样细胞合成 IL-6、IL-11、PTHrP 以及 RANKL 表达促进 OC 发育。总之 OPG/RANK/RANKL 系统是骨细胞单位活性调节的重要系统, 参与细胞因子的骨代谢整个调节过程。

1.1.5 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF): TNF- α 为 TNF 家族重要成员之一, 是一种有力的骨吸收诱导剂, 对 OC 的形成和活性具有重要的调节作用。TNF 由正常的 OC 合成, 可刺激 OB 产生 GM-CSF、IL-6 等因子, 诱使 OC 前体分化为 OC, 此过程必须有 IL-1 的参与, IL-1 的拮抗剂 (IL-1Ra) 可以阻断 TNF- α 的诱导作用^[4]。TNF- α 主要通过 TNFR-1 结合发挥其生理学作用。TNF- α 与 TNFR-1 结合后, 启动 OC 或者 OC 前体细胞 NF- κ B、JNK、p38、ERK、Akt 等信号传导途径促进 OC 的活化和存活, 促进 OC 前体细胞分化形成成熟的 OC^[5]。有实验表明 TRAF 2 在 TNF- α 诱导 OC 形成的过程中是必不可少的^[6]。CD 38 在 TNF- α 诱导起始阶段也起着重要作用^[7]。

1.2 白细胞介素类 (interleukins, ILs)

1.2.1 IL-1: IL-1 是一种多功能的炎性细胞因子, 单核巨噬细胞、SC、OC 均能产生 IL-1。IL-1 可诱导类

破骨细胞的形成, IL-1 对 OC 作用主要包括以下几方面: ①以旁分泌的方式诱导 SC 产生 GM-CSF; ②促进 OC 前体的生长和增殖; ③增强 OC 的活性; ④IL-1 可提高 OC 中 MMP-9 mRNA 的表达, 刺激骨吸收并诱导 OB 产生 IL-6, 通过 IL-6 增进早期 OC 生成; ⑤IL-1 可通过 TRAF 6 抑制 OC 凋亡。TAK 与 TAB 2、TAB 3 的相互作用在 IL-1 引起的 NF-kappaB 通路中起着重要作用^[8]。IL-1 与 PGE₂ 可协同通过 cAMP-PKA-CREB 的信号传导通路来诱导 OC 形成。IL-1 还可通过 p38 MAPK 途径直接上调 RANKL 的表达量, TNF 诱导 OC 分化形成也必须通过 IL-1 介导。

1.2.2 IL-3: IL-3 对 OC、OB 的分化都具有重要影响。骨髓瘤患者血浆中 IL-3 比正常水平高, 经过研究发现 IL-3 可加强 OC 的分化形成^[9]。但是, 研究也发现 IL-3 可抑制 OC 前体的分化过程, 它抑制 RANKL 的 NF-kappa 信号通路^[10], 而且也可通过下调 TNF 受体来抑制 TNF-alpha 对 OC 的诱导过程^[11], 对成熟 OC 没有抑制作用, IL-3 还可间接抑制 OB 的形成^[12]。这些似乎矛盾的研究结果提示 IL-3 在 OC 分化成熟的过程中起着复杂的调节作用, 以维持骨代谢的平衡。

1.2.3 IL-4: IL-4 具有直接抑制 OC 前体分化为成熟 OC 的作用。IL-4 直接作用于 OC、巨噬细胞的前体, 使其定向分化为单核细胞的前体细胞(抗酒石酸酸性磷酸酶阳性), 转而在组织中分化为巨噬细胞, 使 OC 数目减少。同时 IL-4 具有抑制成熟的 OC 骨活性作用。IL-4 也可作用于 OB, 使 OB 表达 OPG, 从而抑制 OC 分化。IL-4 通过抑制 JNK/STAT 信号通路来下调 OC RANK mRNA 的表达, 促进 OC 凋亡, 进而抑制骨吸收^[13], 也可能通过抑制由 RANKL 诱导的转录因子 NFATc1 和 c-Fos 的表达来下调 OC 分化^[14]。

1.2.4 IL-6: IL-6 属于 gp130 细胞因子家族, 多种细胞均可分泌。骨组织中的 IL-6 主要来源于 OB/SC 分泌, PKG 可促使 OB 表达 IL-6^[15]。IL-6 与 IL-3 协同支持造血干细胞、OC 前体的生长; IL-6 也能增强其他细胞因子或激素对 OC 的作用, 如增强 PTHrP 维持体内钙平衡和调节 OC 骨吸收的作用。IL-1 和 TNF- α 是具有刺激骨吸收作用的细胞因子, 主要是它们能诱导 OB 产生 IL-6, IL-6 可与 PGE₂ 协同作用通过 OPG/RANKL/RANK 系统来调节 OC 的分化^[16]。

1.2.5 其他白介素类因子: IL-10 能抑制 TNF、IL-1、IL-4、IL-6 等细胞因子对 OC 的诱导作用。最近发现 IL-10 对 OC 前体的抑制作用主要是通过下调

NFATc1 表达量以及阻止 NFATc1 进入细胞核来实现的^[17]; IL-10 还可介导 4-1BBL 在 OC 中的诱导作用^[18]。IL-11 与 IL-6 都受 gp130 信号传递组元调节, OC 表面具有大量的 IL-11 受体 mRNA 表达, Sims NA 等^[19]发现 IL-11 与其受体介导的信号途径对于 OC 的分化成熟是必须的。在小鼠骨髓培养系中加入 IL-11 中和抗体可抑制 1, 25-(OH)₂D₃、PTH、IL-1 和 TNF 对 OC 生长的促进作用。IL-18 又称干扰素诱导因子, 以旁分泌的形式抑制 OC 的生成, 此过程由 GM-CSF 介导的。IL-18 也可通过影响 T 细胞的功能来抑制 OC 分化^[20], 但 Dai SM 等^[21]在风湿性关节炎组织中却证实了 IL-18 能间接地通过 T 细胞来刺激 OC 分化, 说明 IL-18 非常复杂地调节着骨代谢的平衡。

1.3 内分泌激素

1.3.1 1, 25-二羟维生素 D₃ (1, 25-(OH)₂D₃): 1, 25-(OH)₂D₃ 是 OC 形成所必需的激素, OB/SC 都具有此激素的受体, 1, 25-(OH)₂D₃ 通过与受体作用, 促进 M-CSF、IL-1、IL-6、RANKL 等细胞因子的合成分泌, 间接调节 OC 的形成与分化; OC 自身缺乏这种受体, 故它不能直接作用于成熟 OC。1, 25-(OH)₂D₃ 也可以增强 PTH 所诱导的骨吸收作用, 它们共同调节着骨中钙代谢的平衡^[22]。1, 25-(OH)₂D₃ 诱导的信号传导是不依赖于 cAMP 而产生的, 而是通过 1, 25-(OH)₂D₃ 受体来传导信号。

1.3.2 雌激素 (Estrogen): OB 和 OC 均含有雌激素受体。雌激素对 OC 的作用主要通过抑制 OB 分泌 IL-6 的生成以及通过调节 OPG、RANKL 和 M-CSF 等细胞因子的平衡来发挥抑制作用^[23]。雌激素也可以促进转化生长因子- β (TGF- β) 介导的 OC 凋亡。Sorensen MG 等^[24]发现雌激素抑制骨吸收作用主要是直接抑制 OC 分化过程, 而不是直接抑制成熟 OC 骨吸收作用。雌激素通过酪氨酸激酶信号通路的影响 OC 活性, 下调 Gas6 mRNA 水平, Gas 6 可通过 Tyro 3 和 P42/P44 有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的磷酸化来激活成熟 OC, 雌激素还可以使 pp60 Src 活性下降, pp60 Src 属胞质酪氨酸激酶家族, 具酪氨酸激酶活性, 对 OC 发挥功能很重要。

1.3.3 前列腺素 (Prostaglandin, PGE): 骨组织中的 PGE₂ 主要由 OB 分泌, 是强有力的骨形成和骨吸收刺激因子, 对 OC 的分化具有双重作用, 低浓度的 PGE₂ 可诱导 OC 的分化, 高浓度的 PGE₂ 对分离的 OC 有抑制作用。PGE₂ 介导多种细胞因子引起的骨

吸收,研究表明, PGE_2 呈剂量依赖性促进小鼠 OB 胞内 cAMP 合成,并通过 cAMP-PKA-CREB 信号传导途径,促进 OB 骨基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 与 IL-1 β 基因的表达,促进 OB 合成和分泌 MMP-1 与 IL-1 β ,从而有效抑制骨吸收^[25]。在 RANK/RANKL/OPG 系统的 OC 分化过程中, PGE_2 与 IL-6 的相互影响起着重要作用^[26]。 PGE_2 还可通过诱导 PKC-ERK 蛋白激酶信号传导途径中 ERK 激酶的激活,介导 TGF- β 促进 OB 增殖的效应。

1.3.4 其他激素:甲状旁腺激素(Parathyroid Hormon, PTH)是由甲状旁腺分泌的一种调节钙、磷代谢的内分泌激素,PTH 作用于 OB,使其产生 M-CSF、IL-6 等因子来调节 OC 分化与激活。甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)是恶性高钙血症的主要产物,与 PTH 在前 13 个氨基酸中有 70 同源,与 PTH 有相同的机制,均不作用于 OC 早期前体细胞,且二者都是通过 cAMP-PKA-CREB 信号传导途径来发挥作用的。降钙素(Calcitonin, CT)是甲状腺 C 细胞分泌的一种多肽,与 OC 及其前体上的降钙素受体(Calcitonin receptors, CTR)结合,通过 G 蛋白介导,抑制 OC 的分化。CT 与 CTR 作用后有 3 种信号传导途径:①CT 与 CTR 结合后激活霍乱敏感蛋白(Gs),在 Mg^{2+} 存在条件下催化 ATP 生成 cAMP, cAMP 作为第 2 信使,通过激活蛋白激酶 A,启动级联反应产生最终效应;②CT 与 CTR 结合后作用于信号转导蛋白(G_q),激活磷脂酶 C,产生二酰甘油(DAG), DAG 可激活蛋白激酶 C 以及 1、4、5-肌醇三磷酸,引起细胞内钙库中 Ca^{2+} 释放,进而产生效应;③目前研究推测 CT 还可以与 G_i 或 G_q 结合,激活 MAPKs 途径而发挥调节细胞增殖、分化的作用。

1.4 集落刺激因子类(colony-stimulating factors, CSFs)

M-CSF 由 OB 产生, M-CSF 与 RANKL 共同调节 OC 增殖、分化及成熟。一般认为 M-CSF 在 OC 形成与分化中起如下作用:①促进 OC 分化与增殖;②抑制 OC 凋亡;③增强成熟 OC 活性。Yamada 等^[27]证明 M-CSF 通过调节骨保护素(OPG) mRNA 表达和 OPG 蛋白分泌的方式影响 OC 的活性。M-CSF 也能够诱导 fos 基因的转录, c-fos 缺失小鼠不能形成成熟的 OC^[28]。OC 表面具有 M-CSF 受体(c-fms),运用 c-fms 的抗体可以阻断 OC 形成, c-fms 属于酪氨酸激酶家族,因此 M-CSF 作用的信号传导路径由酪氨酸

激酶介导。

1.5 转化生长因子家族(Transforming grow factors, TGFs)

OB/OC 通过自分泌和旁分泌途径均能产生 TGF- β 。TGF- β 以潜在的活性形式贮存于细胞外基质中,通过 TGF- β 受体结合发挥生物学作用。TGF- β 是骨吸收和骨形成之间有力的调节和偶联因子,在骨和软骨代谢中起着十分重要的作用。研究表明,在高浓度的 TGF- β 下, OC 胞分化受到抑制^[29];低浓度的 TGF- β 通过提高巨噬细胞集落刺激因子和 RANKL/OPG 的比例,促进 OC 分化。

2 信号传导通路

介导 OC 分化成熟的各种细胞因子都会通过复杂的信号传导通路直接或间接地来调控关键核基因的表达,从而促进或抑制 OC 分化成熟。其中涉及到的终端转录因子有: NF-kappaB、Fos、Jun、NFAT 等,各通路并非单独起作用,而是错综复杂地交织在一起,彼此互相影响,形成一个完整的调节网络。各细胞因子引起的信号转导通路可能会通过共有的中间效应体来级联放大信号,如 TAK1 通过与 TAB2/TAB3 相互作用在 IL-1、TNF、RANKL 等引起的信号通路中都起着关键的作用^[30]。

2.1 NF- κ B 通路

NF- κ B 从属于 NF- κ B/Rel 家族,是一种重要的转录因子,在静息细胞中以 p50/p65 或 P50/p52 两个亚单位的异源二聚体形式与 I- κ B 结合共存于细胞浆中。OB 前体在骨吸收过程中接收刺激信号后(如 PTH、PGE、IL-6、IL-11、VitD₃ 等)表达 RANKL,并与 OC 前体表面的 RANK 结合形成三聚体,随后接头分子募集肿瘤坏死因子受体相关因子家族蛋白(TRAF), TRAF6 是 RANKL 信号转导通路中必需的上游效应器^[31], TRAF6 通过 NIK(NF- κ B 可诱导性激酶)和 IKK(NF- κ B 激酶诱导剂)活化 NF- κ B,使其与 I- κ B 分离并迅速转位进入细胞核,与相应靶基因的启动子结合,通过启动或调控基因的转录来调节 OC 分化成熟或凋亡。(整个过程可表示为: RANKL + RANK \rightarrow TRAF6 \rightarrow NIK/IKK \rightarrow NF- κ B \rightarrow OC 分化)。

2.2 MAPK(mitogen activated protein kinase) 通路

MAPK 途径是通过保守的三级酶促级联反应来传递信号,即 MAPK 激酶的激酶(MAP kinase kinase kinase, MAPKKK, 又称 MEKK) — MAPK 激酶(MAP kinase kinase, MAPKK, 又称 MKK) — MAPK^[32]。C-Fos、Fra-1、和 NFAT 是破骨细胞形成的重要下游调

控分子,由该通路激活调控,最终刺激 OC 分化。激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路又具体包括 Ras/ERK MAPK、JNK/SAPK MAPK 以及 p38 MAPK 三条路径。

2.2.1 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 路径 细胞外信号调节激酶(ERK)的具体途径是: RANKL 与 RANK 结合引起受体 Tyr 激酶活化,通过 SH2 结构域募集受体结合蛋白 α (Grb2),该蛋白与鸟嘌呤核苷酸交换因子(Sos)形成复合物,Sos 与受体结合的过程中,移位至胞浆并与 Ras 相互作用,促进 Ras 与 GTP 结合,由此引起 Ras-GTP 的瞬间形成和膜上 raf 激酶(Raf 家族属于 MAPKKK)的活化,接着是 MAPK 激酶(MAPKK)和 ERK1/ERK2 的顺序活化,ERK 易位进入核内,在核内活化转录因子 Elk 与 c-fos 基因启动子中的顺序调控元件——血清反应元件(SRE)结合,调节 c-fos 基因的转录,从而将成熟的巨噬细胞转变成前体 OC。(过程可总结为: RANKL + RANK \rightarrow Tyr 激酶活化 \rightarrow Grb2 + Sos \rightarrow Ras-GTP \rightarrow Raf-1 \rightarrow MEK \rightarrow MAPK \rightarrow ERK1/ERK2 \rightarrow c-fos 表达 \rightarrow OC 分化)。

2.2.2 JNK (Jun N-terminal kinase) 路径 Rho 家族通过受体酪氨酸激酶介导生发中心激酶(germinal center kinase, GCK/NIK)的活化,而后依次激活 MAPKKK 类的 MEKK1/2/3/4 和 MAPKK 类的 MEK4/7,最终活化 JNK,使其从胞浆移位至胞核,活化的 JNK 能诱导 AP-1(主要由 Jun 与 Fos 两大类蛋白组成)活化,AP-1 作用于 DNA 的 AP-1 区,启动 MMPs、碱性磷酸酶等基因的编码,从而刺激 OC 前体的分化、生存、融合及活化成熟的 OC^[33]。(整个过程可表示为: RANKL + RANK \rightarrow Tyr 激酶活化 \rightarrow GCK \rightarrow MEKK1/2/3/4 \rightarrow MEK4/7 \rightarrow 激活 JNK \rightarrow AP-1 \rightarrow MMPs、碱性磷酸酶等基因的表达 \rightarrow OC 分化)。

2.2.3 p38 MAPK 路径 p38 是从小鼠肝脏细胞中分离纯化出来的分子量为 38kD 的酪氨酸磷酸化蛋白激酶。在 OC 前体,p38 MAPK 信号途径是 RANK 的下游信号途径,RANKL 与 RANK 结合后,促进 MEK6 的磷酸化,进而激活 p38 MAPK,活化的 p38 从胞浆移位到细胞核,磷酸化活化转录因子 MITF 等,最终促进 OC 分化^[34]。p38 也可以通过上调转录因子 c-Fos 与 NFATc1 来影响 OC 成熟^[35]。p38 MAPK 途径是 OC 分化过程中非常重要的一条通路,抑制 p38 MAPK 信号途径可以抑制 OC 分化和局部骨吸收。有实验证明,在由 IL-1 β 和 TNF- α 诱导的 SC 中 RANKL 表达过程中,p38 MAPK 是主要通路^[36]。

(整个过程可表示为: RANKL + RANK \rightarrow MEK6 磷酸化 \rightarrow 激活 p38 MAPK \rightarrow 激活 MITF \rightarrow OC 分化)。

2.3 PI3K/Akt(磷脂酰肌醇-3 激酶) 通路

磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)是许多生命活动的关键信号分子,与细胞的分裂、分化、凋亡等活动有关。PI3K 催化磷脂酰肌醇的肌醇环上 3 位羟基发生磷酸化反应,可得到脂质产物 PK(3,4,5)P₃,各种含有 PH 结构域的信号蛋白(如丝/苏氨酸激酶 Akt)通过与 PK(3,4,5)P₃ 结合而聚集到 PI3K 活化部位,激活 Akt 蛋白激酶,进一步使其他蛋白发生磷酸化反应,调节细胞生长、细胞周期进程。在破骨细胞中,TRAF6 使 c-Src 激活,c-Src 反过来刺激 PI-3K,激活的 PI-3K 使 Akt(PKB)活化,Akt 又通过下游效应器 AFX/FOXO4 来抑制 OC 凋亡,调节 OC 骨架的重置和细胞移动,而促进其存活^[37]。(整个过程可表示为: RANKL + RANK \rightarrow TRAF6 \rightarrow Src \rightarrow PI3K \rightarrow Akt \rightarrow OC 分化)。

2.4 CN/NFAT(钙调磷酸酶/活化 T 细胞核因子) 通路

CN/NFAT 是 OC 内与 RANK 相关的又一信号转导通路,Src 蛋白激活 IP3,后者引起钙库释放提高细胞浆内 Ca²⁺ 水平,活化 T 细胞核因子(NFAT)是一种 Ca²⁺ 调节性转录因子,包括 NFAT1 ~ 4,被钙调磷酸酶(CN)活化后,快速转位进入细胞核并与相应的启动子结合启动基因的转录。将 CN 或 NFAT2 特异性阻断后,单核巨噬细胞系统将不能分化为 OC;有实验证明在没有 RANKL 存在的情况下单独激活 NFAT2,就可诱导 OC 前体分化为成熟 OC,说明 NFAT 可能是转录因子 c-Jun 的替代角色。在颌骨增大症患者中,SH3BP2(SH3-domain binding protein 2)错义突变而导致的骨吸收增加及相关炎症就是通过激活 NFAT 来实现的^[38]。(整个过程可表示为: RANKL + RANK \rightarrow TRAF6 \rightarrow Src \rightarrow PLC \rightarrow IP3 \rightarrow Ca²⁺ \rightarrow CN \rightarrow NFAT2 \rightarrow OC 分化)。

3 小结

OC 各种分化成熟因子,在作用过程中都不是独立的,而是彼此紧密连接成一个和谐的调节系统来影响 OC 的分化,它们之间存在着种种耦联机制。首先 SC/OB/OC 等细胞间形成了一种相互依赖的耦联系统,构成一个有机整体来调整整个骨代谢系统。其次是各种 OC 因子与 RANKL/RANK/OPG 系统相互耦联,绝大部分 OC 因子都是经由 OB 介导而作用于 OC,通过调节 RANKL/RANK/OPG 的基因表达,实现

对 OC 的调节作用。再次是 RANKL 和 M-CSF 在 OC 分化中起的协同作用,无论是从原始的造血祖细胞通过增殖、定向到 OC 前体,还是从 OC 前体分化至具有 TRAP 阳性特征性的单核细胞、一直到融合形成具有骨吸收功能的多核的成熟 OC,在这一系列进化过程中,都需要 RANKL 和 M-CSF 同时参与调控。

【参 考 文 献】

- [1] Kazuhiro Aoki, Hiroaki Saito, et al. A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Inv*, 2006, 116: 1525-1534.
- [2] Liu W, Xu D, Yang H, et al. Functional identification of three receptor activator of NF-kappa B cytoplasmic motifs mediating osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem*, 2004, 279(52): 54759-54769.
- [3] Xu D, Wang S, Liu W, et al. A novel receptor activator of NF-kappaB (RANK) cytoplasmic motif plays an essential role in osteoclastogenesis by committing macrophages to the osteoclast lineage. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 4678-4690.
- [4] Shi Wei, Hideki Kitaura, Ping Zhou, et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Inv*, 2005, 115(2): 282-290.
- [5] Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene* 2005, 350: 1-13.
- [6] Kanazawa K, Kudo A. TRAF2 is essential for TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(5): 840-847.
- [7] Iqbal J, Kumar K, Sun L, et al. Selective upregulation of the ADP-ribosyl cyclases CD38 and CD157 by TNF but not by RANK-L reveals differences in downstream signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291(3): F557-F566.
- [8] Kishida S, Sanjo H, Akira S, et al. TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway. *Genes Cells*, 2005, 10(5): 447-454.
- [9] Lee JW, Chung HY, Ehrlich LA, et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood*, 2004, 103(6): 2308-2315.
- [10] Khapli SM, Mangashetti LS, Yogesha SD, et al. IL-3 acts directly on osteoclast precursors and irreversibly inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced osteoclast differentiation by diverting the cells to macrophage lineage. *J Immunol*, 2003, 171(1): 142-151.
- [11] Yogesha SD, Khapli SM, Wani MR. Interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced osteoclast differentiation by down-regulation of expression of TNF receptors 1 and 2. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 11759-11769.
- [12] Ehrlich LA, Chung HY, Ghobrial I, et al. IL-3 is a potential inhibitor of osteoblast differentiation in multiple myeloma. *Blood*, 2005, 106(4): 1407-1414.
- [13] Hirayama T, Dai S, Abbas S, et al. Inhibition of inflammatory bone erosion by constitutively active STAT-6 through blockade of JNK and NF-kappaB activation. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(9): 2719-2729.
- [14] Kamel Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, et al. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced expression of NFATc1 and c-Fos: a possible mechanism for downregulation of osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(3): 839-845.
- [15] Broderick KE, Zhang T, Ranyaswami H, et al. Cyclic GMP/cGMP-dependent Protein Kinase Induce Interleukin-6 Transcription in Osteoblasts. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(5): 1148-1162.
- [16] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E₂ on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1068: 225-233.
- [17] Evans KE, Fox SW. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol*, 2007, 8(1): 4.
- [18] Shin HH, Lee JE, Lee FA, et al. Enhanced osteoclastogenesis in 4-1BB-deficient mice caused by reduced interleukin-10. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(12): 1907-1912.
- [19] Sims NA, Jenkins BJ, Nakamura A, et al. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(7): 1093-1102.
- [20] Chiaki MS, Tohru T, Teruo L, et al. Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(1): 361-366.
- [21] Dai SM, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Ann Rheum Dis*, 2004, 63(11): 1379-1386.
- [22] Xue Y, Karaplis AC, Hendy GN, et al. Genetic models show that parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ play distinct and synergistic roles in postnatal mineralion homeostasis and skeletal development. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(11): 1515-1528.
- [23] Richard Eastell. Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche. *Journal of Endocrinology* 2005, 185: 223-234.
- [24] Sorensen MG, Henriksen K, Dziegiel MH, et al. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. *DNA Cell Biol*, 2006, 25(8): 475-483.
- [25] Kim CH, Park YG, Noh SH, et al. PGE₂ induces the gene expression of bone matrix metalloproteinase-1 in mouse osteoblasts by cAMP-PKA signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 375-385.
- [26] Liu XH, Kirschenbaum A. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E₂ on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1068: 225-233.
- [27] Yamada N, Tsujimura T, Ueda H, et al. Down-regulation of osteoprotegerin production in bone marrow macrophage colony stimulating factor. *Cytokine*, 2005, 31: 288-297.
- [28] Yao GQ, Itokawa T, Paliwal I, et al. CS F-1 induces fos gene transcription and activates the transcription factor Elk-1 in mature osteoclasts. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76: 371-378.
- [29] Karst M, Gony G, Galvin RJS, et al. Roles of stromal cell BANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J Cell Physiol*, 2004, 200: 99-106.

- [30] Besse A , Lamothe B , Campos AD , et al. TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J Biol Chem* , 2007 , 282(6) 3918-3928. Epub 2006 Dec 8.
- [31] Jin Gohda , Toru Akiyama , Koga T , et al. RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *The EMBO Journal* , 2005 , 24 : 790-799.
- [32] Hagmann C , Blank J. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* 2001 , 13 863-875.
- [33] Constant SL , Dong C , Yang DD , et al. JNK1 is required for T cell-mediated immunity against *Leishmania major* infection. *J Immunol* , 2000 , 165(5) 2671-2676.
- [34] Matsumoto M , Sudo T , Saito T , et al. Involvement of p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL). *J Biol Chem* 2000 275(40) 31155-31161.
- [35] Huang H , Chang EJ , Ryu J , et al. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the

p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* , 2006 , 351 (1) 99-105.

- [36] Rossa C , Ehmann K , Liu M , et al. MKK3/6-p38 MAPK signaling is required for IL-1 β and TNF- α -induced RANKL expression in bone marrow stromal cells. *J Interferon Cytokine Res* , 2006 , 26(10) : 719-729.
- [37] Wei Liu , Shunqing Wang , Wei S , et al. Receptor activator of NF- κ B (RANK) cytoplasmic motif , 369PFQEP373 , plays a predominant role in osteoclast survival in part by activating Akt/PKB and its downstream effector AFX/FOXO4. *J Biol Chem* , 2005 , 280 (52) 43064-43072.
- [38] Lietman SA , Kalinchinko N , Deng X , et al. Identification of a novel mutation of SH3BP2 in cherubism and demonstration that SH3BP2 mutations lead to increased NFAT activation. *Hum Mutat* , 2006 , 27 (7) 717-718.