

核结合因子 a1 的调控机制

白宇 张柳

摘要：Cbfa1 是骨发育过程中调节骨髓基质干细胞向成骨细胞分化和成熟的重要转录因子。Cbfa1 的表达水平异常与骨骼系统疾病有关。体内体外实验证实多种通路(如 Wnt/LRP5/-catenin, BMP/Smads, 1,25-(OH)₂-vitaminD₃/VDR/VDRE 途径)和调节蛋白(Msx 2, Dlx 5, Twists)在 Cbfa1 基因表达、活性和随后的骨形成过程中起关键作用。这些发现对调控成骨细胞分化和治疗骨质疏松以及其他伴有骨量改变的疾病治疗提供了新的思路,这些疾病有可能用控制 Cbfa1 表达来进行治疗。

关键词：核结合因子 a1；骨；成骨细胞；分化；信号途径

The regulation of Cbfa1 BAI Yu, ZHANG Liu. Department of Orthopaedic Surgery, The Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China

Abstract: Cbfa1 is an accepted transcription factor essential for osteoblast development from mesenchymal stem cells and maturation into osteocytes and organize crucial events during bone formation. Alternations in Cbfa1 expression levels are associated with skeletal diseases. *In vitro* and *in vivo* studies have reported that multiple integrated complex path ways (such as Wnt/LRP5/b-catenin, BMP/Smads, 1, 25-(OH)₂-vitaminD₃/VDR/VDRE pathway, etc.) and several regulatory proteins (such as Msx2, Dlx5, Twists, etc.) play critical roles in modulating Cbfa1 gene expression, activity, and the subsequent bone formation. These findings provide novel insights through controlling osteoblast differentiation to treat osteoporosis or other bone diseases with altered bone mass by stimulating Cbfa1 expression.

Key words: Cbfa1; Bone; Osteoblast; Differentiation; Signaling

核转录因子 1(Core Binding Factor a1, Cbfa1)是骨发育过程中调节骨髓基质干细胞向成骨细胞分化和成熟的重要转录因子。Cbfa1 的表达水平异常与骨骼系统疾病有关。体内体外实验证实多种通路(如 Wnt/LRP 5/ β -catenin, BMP/Smads, 1,25-(OH)₂-vitaminD₃/VDR/VDRE 途径)和调节蛋白(Msx 2, Dlx 5, Twists)在 Cbfa1 基因表达、活性和随后的骨形成过程中起关键作用。这些发现对调控成骨细胞分化和治疗骨质疏松以及其他伴有骨量改变的疾病治疗提供了新的思路,这些疾病有可能用控制 Cbfa1 表达来进行治疗。进一步的研究证实 Cbfa1 的表达始于两个启动子,远侧的 P1 启动子和近侧的 P2 启动子。启动子的变异引起两种蛋白异构体拥有不同的氨基末端,命名为 I 型 Cbfa1 和 II 型 Cbfa1。我们探讨两种主要异构体在骨骼发育过程中的表达和它们的不同功能。人体骨骼始终都在重塑之中。这包括

了一系列紧密的调节来保持骨形成和重吸收的平衡,这是保持正常骨量的关键。成骨细胞对骨骼生长和发育过程中的骨形成起主要作用,因此它对调节成骨细胞分化的关键基因的发现有重要作用。人类常染色体显性遗传病锁骨颅骨发育不良综合症(Cleidocranial Dysplasia, CCD),就是由 Cbfa1 一个等位基因突变引起^[1]。在小鼠中敲除 Cbfa1 基因(Cbfa1 -/-)可导致成骨细胞分化完全受抑制,使骨骼的软骨内骨化成骨和膜内骨化成骨均不能发生^[2]。现在 Cbfa1 作为成骨细胞分化和成熟的基本调节因子,已被广泛认识。在此,我们将进一步探讨 Cbfa1 与其他因子的作用的分子机制,和 Cbfa1 不同的异构体。

1 Cbfa1 基因活性和其表达的调节途径

1.1 影响 Cbfa1 基因活性和其表达的信号转导途径

Cbfa1 被许多细胞因子、激素和特异性细胞信号受体调节。已发现影响 Cbfa1 基因活性和表达的几

种复合通路。

1.1.1 Wnt/LRP5/ β -catenin 途径 :有很多实验证实 Wnt/LRP5/ β -catenin 途径 (Low-densitylipoprotein Receptor Related Protein 5)对促进成骨细胞分化和维持骨量起重要作用^[3]。已知 LRP 5 为 Wnt 的共同受体,能形成使胞质内 β -catenin 稳定的复合体,并促进它转移到核内与 Lef1/Tcf 转录因子结合,改变基因表达来促进成骨细胞分化和正常骨形成。此外,分泌的卷曲基因相关蛋白(Frizzled Related Proteins 1, SFRP1)为 Wnt 的天然对抗物,据报道能损害成骨细胞功能,这是由于 SFRP 1 介导的 β -catenin 去稳定化。进一步研究发现 SFRP 1 基因缺失小鼠出现 Wnt 信号通路的强活化和高骨量表型,以 Cbfa1 启动子 2~5 倍的激活为特征,能诱导内源性 Cbfa1mRNA 表达增加 7~8 倍,并显著增加其下游骨钙素基因表达。这些作用能被 SFRP1 阻断,表明在骨形成过程中 Cbfa1 是 Wnt 信号通路的靶点,而且 Wnt/ β -catenin 途径调节的成骨细胞分化,部分是通过激活 Cbfa1 基因表达来实现的^[4]。

1.1.2 BMP/Smads 途径 :骨形态蛋白 (Bone Morphogenetic Protein, BMP)-2 是有效的成骨因子,能调节成骨细胞分化和骨形成。体外研究发现 BMP 2 结合到 I 型和 II 型 BMP 受体从而使 Smad 1、5 和 8 蛋白磷酸化,这种蛋白与 Smad 4 形成复合体并转移到核内。然后复合体结合到它的目的基因如 Cbfa1,在多潜能细胞 C2C12 中促进 Cbfa1 表达,增加成骨细胞特异性基因的表达和向成骨细胞系的分化^[5]。临床研究证实锁骨颅骨发育不良 (Cleidocranial Dysplasia, CCD)可能是由于 TGF β /BMP/Smad 途径的破坏引起^[6]。其他研究证实 Cbfa1 C 端序列包含 Smad 作用域 (SMID)和核基质靶向信号传导 (Nuclear Matrix Targeting Signals, NMTS),此序列的缺失会导致骨生成障碍。同时也发现 SMID/NMTS 域的变异能抑制 Runx 2-Smad 复合物的形成^[7]。然而, Cbfa1 缺失鼠的锁骨来源细胞经 BMP 处理后能引起成骨标志物的中度表达,说明 BMP 的作用不依赖 Cbfa1^[8]。重组人 BMP 2 能协同地增加 C3H10T1/2 细胞中 Cbfa1 活动,提示 BMP 活性对 Cbfa1 依赖的转录是必要的。Cbfa1 与 BMPs 相互协同来促进成骨细胞分化^[9]。

1.1.3 1, 25-(OH) $_2$ -vitaminD $_3$ /VDR/VDRE 途径 : 1,25-(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ (VD $_3$)对 Cbfa1 活性调节有重要作用。它能诱导 Cbfa1 在人骨细胞的表达^[10],并通过它的特异性受体 (VDR)增加鼠成骨细胞的骨钙

素基因活化。在骨钙素基因启动子有 3 个 Cbfa1 识别部位,各命名为 A、B、和 C 位点。A 和 B 位点同时也是 1,25-(OH) $_2$ -vitaminD $_3$ -element, (VDRE),它的变异阻碍了 1,25-(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ -依赖的骨钙素转录上调,提示 VDRE 与 Cbfa1 因子有紧密的关系^[11]。然而,在 VDR 表达的 MC3T3-E1 和 ROS 17/2.8 细胞系中,Cbfa1 启动活性被 VD $_3$ 显著下调,而且这种下调作用在 Cbfa1 启动子的 VDRE 位点变异后能完全消失。与此相类似的是,ROS 24.1 细胞的 VDR 强制表达能导致 Cbfa1 启动子活性的明显下降^[12]。最近,体外研究证实 VDR 基因的缺失能增加成骨细胞分化。包括增加碱性磷酸酶活性、矿化基质形成、骨涎蛋白 (Sialoprotein) 表达和成骨细胞集落形成单位 (CFU-OB)。这些发现提示 VDR 在体外成骨分化过程中起负调节作用,说明在体内可能有其他因子参与成骨细胞分化的调节^[13]。

1.2 影响 Cbfa1 活性和表达的蛋白

1.2.1 Msx 2 和 Dlx 5 蛋白 :Msx 2 和 Dlx 5 是同源异形基因,与 Cbfa1 活性紧密相关,并协同调节骨骼发育和成骨细胞分化^[14]。已知 Msx 2 (Mesh-less 2)对调节骨发育起关键作用,特别是在骨折修复时。鸡颅骨成骨细胞的的原代培养研究显示 Msx 2 促进这些细胞的增殖,但通过抑制 Cbfa1 转录活性可阻止其分化。这种抑制能被 Msx 2 的反义寡核苷酸完全逆转^[15]。转基因研究证实 Msx 2 基因缺失的大鼠有颅骨骨化障碍,包括颅骨不闭合和骨祖细胞的减少^[16]。

最近的研究表明,Cbfa1 和 Dlx 5 的相互作用能用免疫共沉淀分析检测到,说明了 Cbfa1 和 Dlx 5 结合位点的协同作用。Dlx 5 (Distal-less 5)在 BMP 2/BMP 4 诱导的多潜能细胞系有特异性表达,但其他 TGF- β 超家族成员没有能促进此表达。Dlx 5 增加 Cbfa1 活性并减低 Msx 2 活性。实际上,Dlx 5 通过调节 Msx 2 和 Cbfa1 的相互作用进而促进成骨分化^[17]。Dlx 5 过表达的成骨细胞 MC 3 T 3-E 1,成骨细胞标记物会显著增加,碱性磷酸酶活性增加 4 倍,骨钙素生成增加 6 倍^[18]。

另外,Dlx 5 的过表达能增加 II 型 Cbfa1 P 1 启动子活性,但对 I 型 Cbfa1 P 2 启动子活性没有影响。凝胶电泳迁移率实验和基因定点突变证实 Dlx 5 介导的调节是通过 Dlx 5 结合到 3 个位于 II 型 Cbfa1 P 1 启动子-756 和-342 bp 区域的特异性 Dlx 5 反应元件来完成的。由于 Dlx 5 和 Msx 2 都含有同源结构域,他们可以竞争性结合反应部位。

1.2.2 Twist 蛋白: Twist-1 (以往称为 Twist) 和 Twist-2 (以往称为 Dermo-1) 编码脊椎动物的基本螺旋-回路-螺旋 (Helix-Loop-Helix, bHLH) 转录因子, 后者从果蝇到脊椎动物有高保留, 并与颅缝的闭合紧密相关, 也是中胚层发育的关键调节因子。Twist-1 产生不足会导致人和大鼠的尖头-并指趾畸形综合征 (Saethre-Chotzen Syndrome, SCS), 人以颅骨成骨细胞分化过早成熟为特征。SCS 患者的 Twist 突变型成骨细胞表现为成骨细胞相关基因表达增加, 如 ALP 和 pre-collagen I。然而, 在 SCS 成骨细胞培养中发现 Cbfa1 mRNA 和蛋白水平下降。凝胶电泳迁移率实验 (EMSA) 进一步证实骨钙素启动子的 Cbfa1 结合活性明显降低, 提示 Cbfa1 可能是 Twist 蛋白下游的靶基因^[19,20]。

其他研究表明, Cbfa1 的表达和成骨细胞相关标志基因仅在 Twists 表达下降时出现。Twist-1 或 2 缺失的小鼠会导致颅缝早闭, 与 SCS 患者情况一致, 而且 Twist-1 Ser 192 Pro 突变的杂合子和纯合子小鼠表现出骨量增加, 表明 Twists 可能对 Cbfa1 表达起负向调节作用。现在认为 Twists 通过 Twist 盒来负向调节成骨活动, 后者与 Cbfa1 的 Runt 区域相作用。这被随后的体内基因诱变实验所证实^[40]。在给予骨缝处细胞 Twists 反义寡核苷酸处理 4 小时后, 发现 Cbfa1 表达上调。在 SCS 患者成骨细胞体外实验中, 诱导 Twist bHLH 区域的 Y 103 X 突变能使成骨标记性基因的表达减低, 包括 Fgfr 2, Cbfa1, 骨涎蛋白和骨钙素, 而在转染 Twist 或 Cbfa1 的 cDNA 后, 细胞能恢复其表达^[21]。现在认为 Twists 可能与 Cbfa1 有相似的作用, 可能与骨质疏松和关节炎畸形的发病紧密相关。

2 Cbfa1 的不同异构体

Cbfa1 基因是一种成骨细胞特异性转录因子, 对成骨细胞分化和骨发育起关键作用, 根据其产物 N 端序列的不同可分为 3 种异构体, 它们分别是 I 型 Cbfa1 (或称为 Cbfa1/p56, Cbfa1/org 或 PEBP 2aA) II 型 Cbfa1 (也被称为 Cbfa1/p57, Cbfa1/iso 或 til-1) 和 III 型 Cbfa1 (或称为 Osf 2/Cbfa1, Cbfa1/osf 2)^[22,23]。在这 3 种异构体中 III 型 Cbfa1 不在人细胞中表达, 仅表达于鼠类细胞中, 而 I 型 Cbfa1 和 II 型 Cbfa1 在鼠和人细胞中皆有表达。III 型 Cbfa1 中的特殊序列曾被认为是与骨特异性表达有关, 但随后认为 III 型 Cbfa1 是 II 型 Cbfa1 不可译的区的一部分, 对 Cbfa1 的活动仅起有限的作用^[24]。

I 型和 II 型异构体的分布有所不同, 不仅在空间时间上的表达不同, 也有种属特异性。细胞水平的研究显示 I 型和 II 型皆表达于成骨细胞和肥大软骨细胞末端, 然而 I 型 Cbfa1 也存在于未分化的间充质干细胞, 前成骨细胞和软骨细胞前体细胞。对组织水平的观察发现两种亚型存在于骨和肺组织, 而且 I 型 Cbfa1 表达的更为广泛, 能在心、脑、脾、肾和骨骼肌中检测到。然而, 两种异构体的细胞和组织特异性分布的分子机制和它们对骨形成的潜在作用则需要进一步研究。

3 结论与展望

体内体外研究证实 Cbfa1 是调节骨分化和成熟的重要转录因子。它通过多种重要的信号通路和许多调节蛋白来调节出生前后的骨发育。Cbfa1 转录因子及其对成骨细胞定向分化的调控已广为人们认识和接受, 但 Cbfa1 基因表达调控及其诱导成骨细胞分化的分子机制有待进一步探索。随着该研究的深入, 更多参与 Cbfa1 调控的途径将被发现, 与 Cbfa1 相互作用的辅助因子将得到鉴定。查明影响 Cbfa1 基因表达的因素及传导通路将有利于人们用药物主动地调节其表达, 以刺激骨的形成来治疗某些骨代谢疾病如骨质疏松症。因此, 这一研究的开展无疑具有重要的理论和临床意义。

【参考文献】

- [1] Mundlos S, Otto F, Mundlos C, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 1997, 89 :773-779.
- [2] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89 :755-764.
- [3] Hill TP, Spater D, Taketo MM, et al. Canonical Wnt/betacatenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*, 2005, 8 :727-738.
- [4] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating RUNX2 gene expression. *J Biol Chem*, 2005, 280 :33132-33140.
- [5] Derynck R, Zhan YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature*, 2003, 425 :577-584.
- [6] Zhang YW, Yasui N, Ito K, et al. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA 1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl AcadSci USA*, 2000, 97 :10549-10554.
- [7] Afzal F, Pratap J, Ito K, et al. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction

- and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol*, 2005, 204 :63-72.
- [8] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89 :755-764.
- [9] Phimpilalai M, Zhao Z, Boules H, et al. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*, 2006, 21 :637-646.
- [10] Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, et al. Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D₃-elicited differentiation of human osteoblastic cells : roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol*, 2006, 25 :47-58.
- [11] Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, et al. Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 :8847-8861.
- [12] Drissi H, Pouliot A, Kooloos C, et al. 1, 25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/*Cbfa1* gene promoter. *Exp Cell Res*, 2002, 274 :323-333.
- [13] Sooy K, Sabbagh Y, Demay MB. Osteoblasts lacking the vitamin D receptor display enhanced osteogenic potential *in vitro*. *J Cell Biochem*, 2005, 94 :81-87.
- [14] Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, et al. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation : temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 :9248-9261.
- [15] Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, et al. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol*, 1999, 209 :298-307.
- [16] Satokata I, Ma L, Ohshima H, et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, 2000, 24 :391-395.
- [17] Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, et al. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol*, 1999, 209 :298-307.
- [18] Miyama K, Yamada G, Yamamoto TS, et al. A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol*, 1999, 208 :123-133.
- [19] Yousfi M, Lasmoles F, El Ghouzzi V, et al. Twist haploinsufficiency in Saethre-Chotzen syndrome induces calvarial osteoblast apoptosis due to increased TNF α expression and caspase-2 activation. *Hum Mol Genet*, 2002, 11 :359-369.
- [20] Yousfi M, Lasmoles F, Marie PJ. TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297 :641-644.
- [21] Guenou H, Kaabeche K, Mee SL, et al. A role for fibroblast growth factor receptor-2 in the altered osteoblast phenotype induced by Twist haploinsufficiency in the Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet*, 2005, 14 :1429-1439.
- [22] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/*Cbfa1* : a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89 :747-754.
- [23] Xiao ZS, Thomas R, Hinson TK, et al. Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human *Cbfa1/Osf2* transcription factor. *Gene*, 1998, 214 :187-197.
- [24] Xiao ZS, Liu SG, Hinson TK, et al. Characterization of the upstream mouse *Cbfa1/Runx2* promoter. *J Cell Biochem*, 2001, 82 :647-659.

(收稿日期 2005-03-09)