成骨细胞特异性转录因子 Osterix 的研究进展

徐鹏程 综述 王宝利 邱明才 审校

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)04-0294-04

摘要: Osterix 是目前所发现的调节成骨细胞分化的重要转录因子之一,在各种研究中其表达水平被作为成骨细胞分化程度的标志,其发现为人们进一步阐明骨代谢过程,特别是骨质疏松及其他骨病的机制提供了帮助,笔者将对近 5 年来关于此基因的研究作一综述。

关键词: Osterix; 转录因子; 骨代谢

Development of the research of osteoblast special transcription factor Osterix XU Pengcheng, WANG Baoli, QIU Mingcai. Department of Nephrology, The General Hospital, Medical University, Tianjin 300052, China

Abstract: Osterix is one of the most important transcription factors modulating osteoblast differentiation found by now. Its expression is considered to be the marker of the osteoblast differentiation. The research about it will help people to illuminate the mechanism of the bone metabolism, especially the mechanism of the bone disease like the osteoporosis. This article will review the research of this gene in recent 5 years.

Key words: Osterix; Transcription factor; Bone metabolism

在分子水平上研究骨代谢是近年的热门领域,2002 年 Nakashima 等^[1]在小鼠体内新发现了转录因子 Osterix,它是目前所发现的调节成骨细胞分化的重要转录因子之一,其缺失时会直接导致骨形成能力的完全丧失。Osterix 的发现使人们对成骨细胞分化过程有了进一步认识,近年来人们对其进行了大量的研究。笔者对其进展作一介绍。

1 Osterix 的结构和定位

人类 Osterix 定位于 12q13.13 靠近 Sp1 基因的位置。在小鼠则位于 15 号染色体 Wnt10b 和 Itga5 基因之间。两者具有高度同源性。其 C 端含有 3 个 C2H2 型锌指结构,与 Sp 基因家族先前发现的成员 Sp1-Sp6 同源,故又称为 Sp7(special protein 7),Sp7 与 Sp 家族其他成员的区别在于缺乏谷胺酰胺富集区域而含有脯氨酸富集区域,其锌指结构可与富含 GC 的真核细胞启动子结合调节基因的转录。2004 年 Gao 等^[2]报告发现人类 Osterix 有 3 个外显子和 2 个内含子,根据不同的选择性拼接可形成 3 种异构

体。2006 年 Lu 等^[3]在对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 的研究中,克隆出两种异构体,即 Osx1 和 Osx2,Osx1 在小鼠体内更常见。同时他们还克隆了 Osterix 的启动子片段,利用突变分析将 Osx1 和 Osx2 的启动子活性位置分别定位于 +1 和 -586 的氨基酸序列上。

2 Osterix 的表达和功能

Osterix 在人类胎儿时期主要表达于成骨细胞,出生后则表达在颅面骨成骨细胞、软骨细胞、骨肉瘤细胞及骨巨细胞瘤间质细胞^[4],也在睾丸、心脏、脑、胎盘、肺、胰腺、卵巢、脾脏及大动脉成肌纤维细胞中有低水平的表达。成骨细胞起源于骨髓基质的间充质干细胞,在成骨过程中,间充质干细胞先是分化为前成骨细胞,再分化为成骨细胞。除成骨细胞外,间充质干细胞还可分化成软骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞或肌细胞。Osterix 缺失的小鼠间质干细胞完全丧失向成骨细胞分化的能力,没有任何膜内成骨或软骨内成骨的信号表达。研究发现 Osterix 缺失的前成骨细胞会表达软骨细胞的典型基因标记,通过转染过表达 Osterix 则可通过抑制软骨细胞分化转录因子 Sox9 和 Sox5 而促使其向成骨细胞而不是软骨细胞分化。Osterix 还可阻止脂肪细胞特异性转录

作者单位: 300052 天津医科大学总医院(徐鹏程、邱明才);天津医科大学内分泌研究所(王宝利)

通讯作者: 王宝利, Email: bliwang72@yahoo.com.cn

因子 PPAR- γ 基因的表达而抑制脂肪细胞形成。有人用 Osterix 转染小鼠胚胎干细胞,发现在最初的 7 天内 Sox-9 和 PPAR- γ 的表达是增加的,而后才逐渐下降,提示 Osterix 诱导干细胞先经历一个双向潜能或多向潜能的分化阶段再分化为成骨细胞^[5]。Amorim 等^[6]利用基质辅助激光解吸时间飞行质谱(matrix-assisted laser desorption-time-of-flight mass spectrometry; MALDI-TOFMS)技术证明了 RNA 解旋酶 A 是 Osterix 发挥作用过程中的重要成分,二者共同促进成骨作用,但其具体作用方式仍未明确。

3 调控 Osterix 的信号途径

目前已有多条信号途径被证明对 Osterix 具有调节作用,各条途径之间并不是相互独立的,而是通过一定的方式相互关联,其中主要的有如下几种。

3.1 TGF- β /Smad 途径

TGF- β /Smad 途径在人体多种生理过程中发挥着重要的作用,骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Proteins, BMPs)是一种分泌性蛋白质,除 BMP-1 外,均属于 TGF- β 超家族成员,目前已至少发现 15 个成员。除 BMP-3 外,皆有促进骨形成的作用。BMPs 通过结合于细胞膜上的丝氨酸-苏氨酸激酶受体而使 Smad 分子磷酸化并转入细胞核中调控成骨过程的另一个重要转录因子 runt 相关基因 2(runt-related transcription factor 2, Runx 2)和 Osterix 的表达。Osterix 的脯氨酸富集区已被鉴定为 Smad 分子的结合区域。

3.2 Wnt/ β -连环素(β -catenin)途径

Wnts 是一类分泌型糖蛋白,现已发现 19 个成员^[7],Wnt 信号途径调节控制着许多生命过程,与肿瘤发生密切相关,并有抑制脂肪形成而促进骨形成的作用。Wnt/ β -catenin 途径信号传导起始于 Wnt 与跨膜的 Frizzled 受体及其协同受体 LRP5/6 的结合,从而使 β -catenin 蛋白多聚体保持稳定,积累的 β -catenin 蛋白进入细胞核与核内转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)形成复合体,从而激活一系列靶基因的转录。2002 年 Kato M 等^[8]发现受体 LRP 缺失时即使 Runx 2 正常表达时也不能完成骨化。2005 年 Bennett 等^[9]发现其成员之一 Wnt10b 可通过诱导 Runx 2、Dlx 5、Osterix 并抑制 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CCAAT enhancer binding protein α , C/EBP α)和 PPAR- γ 这两个促进脂肪形成的转录因子而促进成骨。Wnt/ β -catenin 与 Smad 两条途径的作用是相互

协调的,在成骨细胞中 Smad 途径的活化早于 Wnt/ β -catenin 途径,研究发现 dishevelled 蛋白与 Smad 的相互作用在 Bmps/Smad 途径对 Wnt/ β -catenin 途径的调节中起着关键的作用^[10]。

3.3 丝裂原活化蛋白激酶信号传导系统(mitogen activated protein kinase cascade, MAPK)途径

MAPK 利用蛋白质的磷酸化和去磷酸化这一原理进行调控,包括 3 种途径,即 ERK1/2 途径、p38MAPK 途径和 SAPK/JNK 途径。Celil 等^[11]发现 BMP-2 及 IGF-1 皆可通过 MKPK 途径调控 Osterix 的表达,但这个过程还需要蛋白激酶 D(protein kinase D, PKD)的协同作用^[12]。BMP-2 介导的表达则只需要 p38MAPK 和 SAPK/JNK 两条途径,而 IGF-1 介导的 Osterix 表达需要 3 种途径共同存在。阻断 ERK1/2 和 p38 途径后可以引起 Osterix 的表达下降。MAPK 途径上调 Osterix 的表达水平时对 Runx2 的表达水平没有影响。

4 Runx2 与 Osterix

Runx 2 基因于 1993 年首次被克隆,人 Runx2 位于染色体 6p12-p21 上,Runx 2 缺失鼠成骨细胞的分化完全被抑制,骨膜成骨和软骨内成骨均没有发生。因实验中 Osterix 缺失鼠表达正常水平的 Runx 2,而在 Runx 2 缺失鼠中并无 Osterix 的表达。故而人们认为在成骨细胞分化途径中,Osx 处于 Runx 2 的下游。但对于成骨过程中两者的相互关系目前尚不完全清楚。2003 年 Lee 等^[13]发现阻断转录因子 Dlx 5 时会抑制 Osterix 的表达,而在 Runx 2 缺失的小鼠中,Osterix 仍可被 Bmp 2 诱导,故推测 Bmp 2 对 Osterix 的诱导不依赖 Runx 2 的存在,2006 年孙冬梅等^[14]克隆了人 Osterix 基因 5'端侧翼 3.2 kb 的区域,发现存在 Runx 2 的结合位点,Runx 2 结合后可上调 Osterix 的启动子活性。目前认为 Runx 2 在成骨细胞分化的起始阶段触发骨基质蛋白的形成,但同时又会使其维持在较早期的阶段而阻止成骨细胞的进一步分化,故 Runx 2 的作用是提供大量的未成熟成骨细胞^[15]。而成骨细胞的最终分化成熟则需要 Osterix 的作用。

5 其他基因对 Osterix 的影响

活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)在免疫反应中对诱导基因转录起重要作用。在 T 细胞及其他类型的免疫细胞中如 B 细胞、NK 细胞、肥大细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞上皆

有 NFAT 蛋白表达。在骨骼系统 ,NFAT 对成骨细胞和破骨细胞分化都有促进作用 ,但其综合作用是有利于骨形成的。研究发现 NFAT 可与 Osterix 形成复合物 ,然后结合到相应 DNA 位置上发挥作用^[16] ,NFAT 还有增强 Wnt 信号途径的作用。Msx 1 和 Msx 2 是含有同源结构域的转录因子 ,在血管钙化过程中起着重要的作用 ,Cheng 等^[17]发现它们作用于主动脉肌成纤维细胞而使 Osterix 表达提高 10 倍 ,而 Runx 2 表达没有变化。MyoD 为诱导间充质细胞向骨骼肌细胞分化的转录因子。Komaki 等^[18]发现 MyoD - / - 的小鼠表现出 BMP-7 诱导的骨质形成过程严重受阻 ,而异位表达的 MyoD 可以在 BMP 存在下增加 ALP 活性和 Osterix 的表达 ,对于 MyoD 基因敲除的小鼠使用 MyoD 蛋白处理可恢复 Osterix 的表达 ,说明 MyoD 有上调 Osterix 表达的作用。Cas-interacting zinc finger protein(CIZ)是一个抑制成骨的转录因子 ,CIZ 的缺失会使碱性磷酸酶和 Osterix 的表达上调 ,并增强 BMP 诱导的成骨作用^[19]。Sclerostin(SOST)是一种新发现的骨形态发生蛋白抑制物 ,为胱氨酸结构超家族成员 ,缺失时会造成骨质疏松症 ,体外试验中在 BMP 2 的作用下 ,于初生的颅骨成骨细胞中发现 SOST 与 Osterix 的表达是平行的 ,用抑制成骨的负调控因子转染细胞后二者皆不再表达 ,说明两者存在互相制约的关系^[20] ,Li 等^[21]进一步证明了 SOST 是作为 Wnt/ β -catenin 通道中受体 LRP5/6 的拮抗剂而发挥作用的。抑癌基因 p53 的突变在肿瘤的发生中有着重要的作用 ,p53^{-/-}突变可以促进成骨细胞的分化 ,并提高 Osterix 的表达 ,且此作用不被 p38 阻断剂所抑制^[22]。

6 Osterix 与临床

骨肉瘤(osteosarcoma)是一种好发于长管状骨干骺端的恶性肿瘤。通常认为其发生与原癌基因突变及抑癌基因失活有关 ,临床上确有部分患者 Rb 和 P53 基因是突变的 ,但也有相当一部分人这两个基因是正常的 ,说明其发生过程有其他的基因参与。Cao 等^[23]发现相对于正常的成骨细胞 ,小鼠和人类骨肉瘤细胞中的 Osterix 的 mRNA 水平明显低下。将 Osterix 基因通过胫骨注射转染入小鼠骨肉瘤细胞可以阻止肿瘤细胞的生长并缩小肿瘤体积 ,减少肺转移 ,还可以对抗肿瘤的溶骨作用。这一发现为研究骨肉瘤的治疗方法提供了新的思路。胸椎黄韧带骨化症(Ossification of ligamentum flavum)是引起胸椎管狭窄 ,导致脊髓受压的常见原因之一 ,常与胸椎

后纵韧带钙化、骨化、胸椎间盘突出并存 ,机械力是引起本病的重要原因 ,而 Osterix 在此类患者黄韧带细胞中的表达是增强的 ,因而直接导致骨化的产生^[24]。目前已有数种影响骨生长发育的药物被证明对 Osterix 的表达有下调作用。免疫抑制药物 FK2506 又名他克莫司(Tacrolimus) ,是一种临床上常用的免疫抑制剂 ,其副作用之一是可以引起急性骨质疏松症 ,FK2506 通过阻断 NFAT 途径的 3 种抗原受体通路(NFAT、NF- κ B 和 JNP) ,在抑制成熟淋巴细胞增殖的同时抑制了 Osterix 的表达。Varanasi 等^[25]发现 FK506 在治疗剂量(25 nmol/L)时即可对 Runx 2 和 Osterix 的表达产生影响 ,而这也是造成这些患者发生骨质疏松的真正原因。另一种免疫抑制剂环孢菌素 A 亦具有类似的作用。非甾体类抗炎药(NSAIDS)已应用于临床多年 ,其药理作用是抑制炎症反应中的重要介质环氧合酶 2(Cyclooxygenase-2 , Cox-2) ,Zang 等^[26]发现 Cox-2 基因敲除的小鼠其 Runx 2 和 Osterix 两个基因的表达显著下降 ,骨质形成延迟 ,给予 PGE2 后可缓解这种缺陷 ,故骨折时使用 NSAIDS 抗炎时会不利于愈合。Ali 等^[27]发现降糖药罗格列酮可通过下调 Runx2 和 Osterix 的表达而抑制小鼠成骨细胞的分化。地塞米松在体外试验中可作为间充质干细胞向成骨细胞分化的诱导物 ,Igarashi 等^[28]于 2004 年发现其作用于大鼠胚胎颅骨细胞后会引引起 Runx 2 和 Osterix 表达上升。

7 问题与展望

Osterix 是目前发现的调控骨骼发育的最直接的转录因子 ,它的发现使人们对成骨细胞分化的认识更进一步 ,成骨是一个受多基因调控的复杂过程 ,目前仍有许多关于此基因的问题尚未阐明 ,如 Osterix 下游是否还有其他转录因子 ,除成骨作用外其是否还参与了其他生理病理过程等。故对其进一步研究将有助于人们更详细了解骨质疏松等骨代谢疾病的分子调控机制并指导临床工作。

【 参 考 文 献 】

- [1] Nakashima K , Zhou X , Kunkel G , et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* ,2002 ,108(1) :17-29.
- [2] Gao Y , Jheon A , Nourkeyhani H , et al. Molecular cloning , structure , expression , and chromosomal localization of the human Osterix(SP7) gene. *Gene* ,2004 ,341 :101-110.
- [3] Lu X , Gilbert L , He X , et al. Transcriptional regulation of the osterix(Osx , Sp7) promoter by tumor necrosis factor identifies

- disparate effects of mitogen-activated protein kinase and NF kappa B pathways. *J Biol Chem* 2006 281(10):6297-6306.
- [4] Huang L , Teng XY , Cheng YY , et al. Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. *Bone* 2004 34(3) :393-401.
- [5] Tai G , Polak JM , Bishop AE , et al. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Eng* ,2004 ,10(9-10):1456-1466.
- [6] Amorim BR , Okamura H , Yoshida K , et al. The transcriptional factor Osterix directly interacts with RNA helicase A. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 355(2) :347-351.
- [7] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* , 2005 ,15 :28-32.
- [8] Kato M , Patel MS , Levasseur R , et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation , osteopenia , and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5 , a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002 ,157(2) :303-314.
- [9] Bennett CN , Longo KA , Wright WS , et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ,102(9) :3324-3329.
- [10] Liu Z , Tang Y , Qiu T , et al. A dishevelled-1/SMAD1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* ,2006 ,281(25) :17156-17163.
- [11] Celil AB , Hollinger JO , Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem* 2005 95(3) :518-528.
- [12] Celil AB , Campbell PG. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem* , 2005 280(36) :31353-31359.
- [13] Lee MH , Kwon TG , Park HS , et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 309(3) :689-694.
- [14] Sun DM , Liu ZB , Zhao Y , et al. Runx2 is Involved in Regulating Osterix Promoter Activity and Gene Expression. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 2006 ,33(10) :957-964.
- [15] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 2006 99(5) :1233-1239.
- [16] Koga T , Matsui Y , Asagiri M , et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005 ,11(8) :880-885.
- [17] Cheng SL , Shao JS , Charlton-Kachigian N , et al. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003 278(46) :45969-45977.
- [18] Komaki M , Asakura A , Rudnicki MA , et al. MyoD enhances BMP7-induced osteogenic differentiation of myogenic cell cultures. *J Cell Sci* 2004 ,117(Pt 8) :1457-1468.
- [19] Morinobu M , Nakamoto T , Hino K , et al. The nucleocytoplasmic shuttling protein CIZ reduces adult bone mass by inhibiting bone morphogenetic protein-induced bone formation. *J Exp Med* 2005 201(6) :961-970.
- [20] Ohyama Y , Nifuji A , Maeda Y , et al. Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology* ,2004 ,145(10) :4685-4692.
- [21] Li X , Zhang Y , Kang H , et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005 280 :19883-19887.
- [22] Wang X , Kua HY , Hu Y , et al. p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis , osteoblast-dependent osteoclastogenesis , and bone remodeling. *J Cell Biol* 2006 ,172(1) :115-125.
- [23] Cao Y , Zhou Z , de Crombrughe B , et al. Osterix , a transcription factor for osteoblast differentiation , mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res* ,2005 65(4) :1124-1128.
- [24] Fan D , Chen Z , Wang D , et al. Osterix is a key target for mechanical signals in human thoracic ligament flavum cells. *J Cell Physiol* 2007 211(3) :577-584.
- [25] Varanasi SS , Datta HK. Characterisation of cytosolic FK506 binding protein 12 and its role in modulating expression of Cbfa1 and osterix in ROS 17/2.8 cells. *Bone* 2005 36(2) :243-253.
- [26] Zhang X , Schwarz EM , Young DA , et al. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 2002 ,109(11) :1405-1415.
- [27] Ali AA , Weinstein RS , Stewart SA , et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* 2005 ,146(3) :1226-1235.
- [28] Igarashi M , Kamiya N , Hasegawa M , et al. Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1 , Osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts. *J Mol Histol* 2004 35(1) :3-10.

(收稿日期 2007-09-21)