

# 核结合因子的表达及其对骨细胞的作用研究

王立童 周淳 陈元川

中图分类号: R322.7<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)12-0914-04

**摘要:** 核结合因子  $\alpha 1$  (Cbf $\alpha 1$ ) 是编码成骨细胞的特异性转录因子, 不仅促进成骨细胞的分化及骨形成, 而且参与了软骨细胞的发育与分化过程。此外, Cbf $\alpha 1$  还调节骨保护素的表达, 从而抑制破骨细胞的形成和骨吸收, 由于 Cbf $\alpha 1$  既可促进骨形成, 又可抑制骨吸收, 因此将骨形成和骨吸收两个不同的过程联系起来。此外多种激素和细胞因子可影响 Cbf $\alpha 1$  的活性和表达。研究 Cbf $\alpha 1$  基因表达的调节并发现增加其表达的因子, 为治疗骨代谢性疾病提供了新的方向。

**关键词:** Cbf $\alpha 1$  基因; 成骨细胞; 破骨细胞; 软骨细胞; 骨代谢

**The research on nuclear binding factor's expression and the effect to bone-cell** WANG Litong, ZHOU chun, CHEN yuanchuan. Jinsha River Road, Putuo District of Shanghai No. 906, Shanghai 200062, China

**Abstract:** Nuclear binding factor  $\alpha 1$  (Cbf  $\alpha 1$ ) is encoded into osteoblast in specific transcription factor, not only to promote osteoblast differentiation and bone formation, and cartilage cells involved in the development and differentiation process. In addition, Cbf  $\alpha 1$  can also regulate the expression of osteoprotegerin, which inhibit the formation of osteoclast and bone resorption, as Cbf  $\alpha 1$  can promote bone formation and inhibits bone resorption, bone formation and resorption will be two different process Contact Up. In addition a variety of hormones and cytokines can affect the activity of Cbf  $\alpha 1$  and expression. Cbf  $\alpha 1$  on the regulation of gene expression and found that increasing the expression of factors, for the treatment of metabolic bone disease provides a new direction.

**Key words:** Cbf $\alpha 1$  gene; Osteoblast; Osteoclast; Cartilage cells; Bone metabolism

核结合因子  $\alpha 1$  (core-binding factor $\alpha 1$ , Cbf $\alpha 1$ ) 又称急性髓性白血病因子 (acute myeloid leukaemia, AML) 或多瘤病毒增强子结合蛋白 (polyomavirus enhancer binding protein 2 $\alpha$ , PEBP2 $\alpha$ ) 是一个异二聚体转录因子基因家族, 与果蝇 runt 基因高度同源, 属于 runt 结构域基因家族的转录因子。随着不同学科对 Cbf $\alpha 1$  研究的逐渐深入, 笔者主要针对与骨代谢有关的 Cbf $\alpha 1$  进行阐述。

## 1 Cbf $\alpha 1$ 的表达的调节

Cbf $\alpha 1$  对成骨细胞分化、软骨细胞肥大及骨骼发生发育起着举足轻重的作用, 但这种作用的分子机

制至今仍未完全清楚。Cbf $\alpha 1$  依赖型转录并非简单地由 Cbf $\alpha 1$  蛋白表达水平的高低来调节, 更大的可能是该转录因子被翻译后修饰调节或被蛋白之间的相互作用所调控。

### 1.1 甲状旁腺激素 (PTH) 与 Cbf $\alpha 1$

甲状旁腺激素 (PTH) 是体内钙平衡的重要调整因子, 在体内外对成骨细胞活性及骨代谢有同化及异化作用。PTH 与 PTH-1 受体结合, 激活包括蛋白激酶 A (PKA) 及 PKC 的两条信号传递通路。它们能对如 cAMP 反应元件蛋白 (CREBs)、激活蛋白-1 (AP-1) 家族成员及 Cbf $\alpha 1$  等转录因子进行调控。MMP3 基因启动子上包含 2 个保守的加强序列, 即一个 Cbf $\alpha 1$  结合位点和一个 AP-1 位点。其中任何一个位点发生突变, 均可阻碍 Cbf $\alpha 1$  或 AP-1 的结合, 从而抑制 PTH 对转录启动的激活作用。Cbf $\alpha 1$  及 AP-1 蛋白同时过高表达能增强 PTH 的应答反应, 提示 Cbf $\alpha 1$  与 AP-1 之间是相互作用的。这种作用需要 Cbf $\alpha 1$  的 runt 结构域及两个 AP-1 因子的亮氨酸拉链结构域。PTH 通过 PKA 依赖性通路刺激 MMP3 启动子而使

基金项目: 上海市医学重点学科建设-重点社区项目 (200515)

作者单位: 200062 上海, 上海市普陀区长风社区卫生服务中心 (王立童); 上海市黄浦区中心医院 (周淳); 上海中医药大学附属曙光医院 (陈元川)

通讯作者: 王立童, Email litongwanglv@163.com

Cbfa1 磷酸化,并通过 CREB 的磷酸化上调 Ap-1。有研究发现 PTH 对 Cbfa1 的影响随 PTH 的浓度、作用时间变化而变化:PTH 浓度从 0 nmol/L ~ 5 nmol/L, Cbfa1 mRNA 及蛋白水平逐渐增高;而从 5nmol/L ~ 500 nmol/L, Cbfa1 mRNA 及蛋白水平随 PTH 浓度的增加逐渐下降。PTH 浓度为 5nmol/L 时,24 h 对 Cbfa1 mRNA 的增高作用最明显;浓度为 1000 nmol/L 时,12 h 对 Cbfa1 mRNA 的抑制作用最明显。浓度同为 50 nmol/L 时,各种 PTH 类似物中,PTH1-31、PTH1-38 对 Cbfa1 的活性增高作用最强,而 PTH3-34、PTH7-34 对 Cbfa1 活性的增高作用较弱<sup>[1]</sup>。

### 1.2 骨形态发生蛋白(BMPs)与 Cbfa1

BMP2 是一种有力的成骨诱导信号,它可在体内诱导骨形成,并且在体外可诱导非骨性的细胞内成骨细胞的分化,同时它可以调控 Cbfa1 的表达。Tsuji 等<sup>[2]</sup>通过实验证明 BMP4/7 的异二聚体可以调节 Cbfa1 的表达。他们研究了骨组织 MC3T3E1、ROS17/2.8 细胞和非骨组织 C3H10T1/2、C2CR、NIH3T3 细胞中 Cbfa1 的表达调控。经过 2 天的细胞培养,ROS17/2.8 中 Cbfa1 基础水平随时间而增高,而其他型细胞内 Cbfa1 水平无变化。用 100  $\mu\text{g/L}$  BMP4/7 异二聚体作用后,MC3T3E1 和 C2CR 细胞中的 Cbfa1 mRNA 表达水平提高。ROS17/2.8 细胞中 Cbfa1 mRNA 表达水平第 2 天非常高,但以后没有再继续升高。

Takazawa 等<sup>[3]</sup>利用 Northern blot 分析证实,在类软骨细胞 TC6 中 Cbfa1 mRNA 水平因 BMP2 的作用而提高。同时,通过利用 Cbfa1 的多克隆抗体对细胞溶解物进行 Western blot 分析,表明 BMP2 作用后,TC6 细胞中 Cbfa1 蛋白质的水平提高了。Lee 等<sup>[4]</sup>发现在 BMP2 作用后产生肌细胞 C2C12 成骨转录分化的过程中,出现了 Cbfa1 和成骨细胞基因的表达。Hay 等<sup>[5]</sup>的研究表明,重组人 BMP2 也可提高 Cbfa1 mRNA 的表达水平。

### 1.3 雌激素与 Cbfa1

不同细胞系中雌激素对 Cbfa1 的作用不同,在小鼠骨髓间质细胞,17- $\beta$  雌二醇  $10^{-8}$  mol/L 可明显增加 Cbfa1 mRNA 的表达;而在永生生化人成骨细胞中,17- $\beta$  雌二醇  $10^{-8}$  mol/L 对 Cbfa1 mRNA 和蛋白表达水平均无影响。选择性雌激素受体调节物(SERM)可增加 Cbfa1 启动子的活性,但 Cbfa1 的 5' 端序列并没有雌激素反应结合区,而有 2 个活化蛋白(AP)-1 的结合位点,从而推测 SERMs 与雌激素受体(ER)结合,跨膜激活 AP-1 基因,导致 Cbfa1 与

ose2 结合能力增强。所以在 Cbfa1 启动子区域 AP-1 和 ose2 可能是相互作用共同促进 Cbfa1 的表达<sup>[6]</sup>。

### 1.4 机械刺激与 Cbfa1

机械刺激可诱导 Cbfa1 的表达,分离机械刺激后 0.5 h, Cbfa1 mRNA 的表达明显增加,机械刺激后 3 h 开始 Cbfa1 蛋白明显增加。相反细胞在模拟卧床及失重状态下的滚筒中及实际的失重状态下生长,可使 Cbfa1 的表达受抑制<sup>[7]</sup>。

### 1.5 Cbfa1 自身调控

Cbfa1 基因还可以通过对本身启动子的负反馈实现部分自我调控,由此来控制骨形成过程中 Cbfa1 基因的表达和功能。有研究表明,Cbfa1 是作用于骨性细胞中 Cbfa1 基因 5' 端主要的 DNA 结合蛋白。在大鼠 Cbfa1 启动子上至少有 3 个 Cbfa1 的识别位点,并且在 5' UTR 上有 3 个前后排列的重复 Cbfa1 位点,强迫 Cbfa1 蛋白表达可降低 Cbfa1 启动子的活动能力,并且一个 Cbfa1 位点就足以引起自我转录抑制。

## 2 Cbfa1 对骨细胞的作用

骨骼的发育经历了多步过程,它包括早期骨的图式形成、间充质细胞分化为成骨细胞系和成软骨细胞系、造血干细胞分化为破骨细胞系,以及前体细胞终末分化为 3 种特殊类型的细胞,即成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞。Cbfa1 在骨骼形成和发育的各个阶段都起着重要作用<sup>[8]</sup>。

### 2.1 对成骨细胞的作用

在间充质细胞向成骨细胞系的分化过程中可能存在一种骨特异性的转录因子来决定这一分化过程,Komori 等<sup>[9]</sup>已证实,这种转录因子是 Cbfa1。Komori 等<sup>[10]</sup>及 Otto 等<sup>[11]</sup>应用靶基因阻断或定点突变技术,成功地制造出了 Cbfa1 基因缺失或突变的小鼠,并对其胚胎骨骼的发育过程进行了研究。结果揭示在间充质细胞向成骨细胞分化中需要 Cbfa1 的参与,Cbfa1 对成骨细胞的分化和骨形成十分必要。王巍巍等<sup>[12]</sup>通过细胞培养发现补肾中药上调了大鼠成骨细胞 Cbfa1 的表达而具有促进骨形成作用。Ducy 等<sup>[13]</sup>利用在出生以后分化的成骨细胞中过度表达 Cbfa1 DNA 结合区的转基因小鼠,证明 Cbfa1 除调节成骨细胞分化外,还调节已分化成骨细胞的功能和其他骨细胞外基质蛋白(extra-cellular matrix protein,ECMP)的基因表达,从而控制出生后骨骼形成和发育的生理过程。

骨 ECMP 对骨骼的形成十分重要,而骨钙素是

其中含量最丰富的一种,也是迄今被证明的惟一的只由成骨细胞产生的 ECMP,并被认为是成骨细胞分化和成熟的标志<sup>[14]</sup>。Ducy 等<sup>[15]</sup>在小鼠和大鼠骨钙素基因启动子区发现了一种新的成骨细胞特异性的作用元件 *ose2*,而且在其他 ECMP 如骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨唾液蛋白、I 型胶原基因的 5'端也发现了结合 Cbfa1 的 *ose2* 序列。丁晓颖等<sup>[16]</sup>研究发现成骨生长肽羧基端片段对大鼠成骨细胞 Cbfa1 与 IGF-1mRNA 的表达具有上调作用。

此外, Cbfa1 的 2 种 N 末端亚型 Runx2-I 和 Runx2-II 的表达具有组织特异性和细胞种类特异性,对成骨的作用及在成骨过程中的表达也有差别<sup>[17-19]</sup>。

## 2.2 对破骨细胞的作用

Gao 等<sup>[20]</sup>对 3 种不同 Cbfa1 基因型 (Cbfa1<sup>+/+</sup>、Cbfa1<sup>+/-</sup> 和 Cbfa1<sup>-/-</sup>) 的小鼠胚胎组织中分离出的颅盖骨细胞和正常的脾细胞共同培养,通过对 ODF 和 OCIF 的 mRNA 表达的研究,结果表明, Cbfa1 通过控制 ODF、OCIF 在破骨细胞形成中发挥作用。

在正常情况下,骨形成和骨吸收同时进行,破骨细胞前体和成骨细胞系的相互作用是破骨细胞形成的前提条件。最近发现骨保护素 (OPG) 和核因子  $\kappa$ B 受体激活因子配体 (RANKL) 对破骨细胞发生具有重要作用。OPG 是成骨细胞分泌的一种糖蛋白,属于肿瘤坏死因子 (TNF) 受体家族,它可在体内和体外抑制破骨细胞的形成和骨吸收; RANKL 属于 TNF 配基家族,可与 OPG 结合。Kitazawa 等<sup>[21]</sup>的研究表明 Cbfa1 基因与鼠源性 RANKL 启动子区结合可直接调节 RANKL 的表达。通过对 5.9 kb 的人 OPG 启动子序列的克隆和计算机分析发现 12 个公认的 Cbfa1 结合元件 (*ose2*) 的存在,表明 OPG 可能被 Cbfa1 调节。Thirunavukkarasu 等<sup>[22]</sup>首先直接证明, Cbfa1 可以在转录和蛋白质水平调节 OPG 的表达。由于 OPG 可以抑制破骨细胞的形成和功能,从而抑制骨吸收。由此可见, Cbfa1 可调节 OPG 的表达起抑制骨吸收的作用,同时其本身又具有促进骨形成的作用,进而在骨形成和骨吸收中起纽带作用。

## 2.3 对软骨细胞的作用

Cbfa1 不仅对成骨细胞分化起着调控作用,在软骨生成和软骨内骨化过程中也发挥着不可或缺的作用。

Takeda 等<sup>[23]</sup>发现, Cbfa1 在小鼠受孕 10.5 天时开始在侧板中胚层及将要形成肢体的间充质细胞聚集区表达,之后持续表达,在前肥大型软骨细胞及成

骨细胞区表达较高;此后在软骨区表达逐渐下降,至出生时基本检测不到;也提示了永久性软骨细胞也有潜力进入软骨内的成骨分化过程,只是由于其他因子的作用抑制了 Cbfa1 的表达而使其获得了永久性表型。Inada 等<sup>[24]</sup>的研究发现, Cbfa1 的表达模式对软骨细胞的发生发挥调控作用。Cbfa1 基因缺失小鼠,除未见矿化骨基质外,软骨内化骨及膜内化骨均受到严重影响,软骨细胞表现出比正常低的碱性磷酸酶 (ALP) 活性, Ihh (India hedgehog) 和 X 型胶原 (分别为前肥大型和肥大型软骨细胞标志) 的表达同样受到抑制,增殖型软骨细胞向肥大型方向的分化受阻滞。导入 Cbfa1 基因后,抑制效应可获得部分缓解,并在一定程度上促进生长板软骨细胞分化。这说明 Cbfa1 在非肥大型软骨细胞向肥大型分化阶段发挥正调控作用。Cbfa1 可能和已知的 Ihh/PTHrP (甲状旁腺素相关蛋白) 途径相互配合,调控软骨细胞分化,也可能作为共同调节因子与 Smad 共同介导 BMP2 诱导的成软骨作用。

Cbfa1 在软骨发生早期呈低水平表达,在永久性软骨组织 (如气管软骨环等) 中几乎不能检测到,但在生长板肥大型软骨细胞中却有较高水平表达,说明其有可能调控肥大型软骨细胞的进一步分化。有研究发现,当 Cbfa1 基因转录到鸡胚原代培养的软骨细胞中时,该软骨细胞 ALP 活性及 X 型胶原合成显著增高,当 Cbfa1 竞争性抑制蛋白 DN-Cbfa1 (dominant negative Cbfa1) 表达于成熟的软骨细胞时,该细胞的标志基因表达降低,细胞形态转变为非成熟型软骨细胞。

## 3 问题与展望

随着研究的深入,使我们对 Cbfa1 在骨代谢中的应用和发展有了更新的认识,但同时也给我们提出了很多问题,如:既然 Cbfa1 在间充质细胞向成骨细胞分化过程中起重要作用,而研究证明骨肉瘤是起源于间充质细胞向成骨细胞系统分化的肿瘤,那么 Cbfa1 与骨肉瘤的发生有何关系?是否在将来可应用 Cbfa1 或其蛋白质在成人中产生新的骨骼?是否可用 Cbfa1 来防治骨质疏松症?相信随着科研技术的不断发展,这些问题将可得到确切的答案。

### 【参 考 文 献】

- [1] Krishnan V, Moore TL, Ma LY, et al. PTH bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. Mol Endocrinol, 2003, 17: 423-435.

- [ 2 ] Tsuji K, Ito Y, Noda M. Expression of the PEBP2 $\alpha$ /AML3/Cbfa1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells. *Bone*, 1998, 22 (2) :87-92.
- [ 3 ] Takazawa Y, Tsuji K, Nifuji A, et al. An osteogenesis-related transcription factor, core-binding factor  $\alpha 1$ , is constitutively expressed in the chondrocytic cell line TC6, and its expression is upregulated by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinol*, 2000, 165 (3) :579-586.
- [ 4 ] Lee MH, Javed A, Kim HJ, et al. Transient upregulation of Cbfa1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor  $\beta$ 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *Cell Biochem*, 1999, 73 (1) :114-125.
- [ 5 ] Hay E, Lemonnier J, Modrowski D, et al. N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *Cell Physiol*, 2000, 183 (1) :117-128.
- [ 6 ] Fujita T, Fukuyama R, Izumo N, et al. Transactivation of core binding factor  $\alpha 1$  as a basic mechanism to trigger parathyroid hormone-induced osteogenesis. *Jpn Pharmacol*, 2001, 86 :405-416.
- [ 7 ] Ziros PG, Gli AP, Georgakopoulos T, et al. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *Biol Chem*, 2002, 277 :23934-23941.
- [ 8 ] Wen J, Lu Q, Zhu QL. Runx-2 and tooth development. *International Journal of Stomatology*, 2008, 35 (2) :164-166.
- [ 9 ] Komori T, Kishimoto T. Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8 (4) :494-499.
- [ 10 ] 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 (5) :755-764.
- [ 11 ] Otto F, Thoenell AP, Crompton T, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 1997, 89 (5) :765-771.
- [ 12 ] Wang WW, Wei YY, Shi YY. Effects of Bushen Chinese Medicine on Expression of Cbfa1 in Aging Osteoblast of Rat. *Chinese Journal of Information on TCM*, 2007, 14 (11) :29-31.
- [ 13 ] Ducy P, Starbuck M, Primel M, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, 1999, 13 (8) :1025-1036.
- [ 14 ] Lian JB, Stein GS, Stein JL, et al. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *Cell Biochem Suppl*, 1998, 30 (31) :62-72.
- [ 15 ] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 88 (5) :747-754.
- [ 16 ] Ding XY, Qiu MC, Peng YD, et al. Effects of OGP<sub>10-14</sub> and its analogue G48A on expression of Cbfa1 and IGF-1 mRNA in osteoblasts. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2008, 28 (2) :137-140.
- [ 17 ] Xiao ZS, Hjelmeland AB, Quarles LD. Selective deficiency of the "bone-related" Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis. *Biol Chem*, 2004, 279 :20307-20313.
- [ 18 ] Banerjee C, Javed A, Choi JY, et al. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 N-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology*, 2001, 142 :4026-4039.
- [ 19 ] Shui C, Spelsberg TC, Khosla S, et al. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Bone Miller Res*, 2003, 18 :213-221.
- [ 20 ] Gao YH, Shinki T, Yuasa T, et al. Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation in osteoclastogenesis: Regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Comm*, 1998, 252 (3) :697-702.
- [ 21 ] Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promoter structure of mouse RANKL/TRANSC/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1445 :134-141.
- [ 22 ] Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, et al. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *Biol Chem*, 2000, 275 (33) :25163-25172.
- [ 23 ] Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, et al. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev*, 2001, 15 (4) :467-481.
- [ 24 ] Inada M, Yasui T, Nonmura S, et al. Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn*, 1999, 214 (4) :279-290.

(收稿日期:2008-07-16)