

硬骨素在骨生成中的作用

赵凤仪 王莉

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)06-0460-04

摘要:硬骨素(sclerostin, SO)是硬化性骨化病(sclerosteosis, SOST)基因表达的一种蛋白产物。近年来, 研究发现 SO 在骨生成发生机制方面具有重要的作用。研究发现在胚胎发生期间矿化骨中存在 SOST mRNA 表达, 在出生之后, 骨细胞中 SO 蛋白和 SOST mRNA 表达均被严格地限制。在成骨细胞培养的矿化阶段, SOST mRNA 表达水平有不同变化, 其表达水平的差别与骨小梁的缺乏、存在及大小相关。还发现 SOST mRNA 表达与骨重建、细胞凋亡和细胞更新是紧密连锁的。

关键词:硬骨素; 硬化性骨化病; 骨生成; 基因表达

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.06.018

The effect of sclerostin on osteogenesis ZHAO Fengyi, WANG Li. Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Abstract: The sclerostin(SO) is a kind of protein of the sclerosteosis(SOST) gene expression. In recent years, the research discovers that the SO has important function in the mechanism of osteogenesis. There are SOST mRNA expression in mineralized bone among embryonic period and after born the SO protein product of bone cell and the SOST mRNA expressions are all limited strictly. The mineralized phase in the osteoblastic culture, the SOST mRNA expression level is variant, the difference of its expresses the level is related to deficiency of bone trabecula, size and its existence. And the SOST mRNA expression is closely linked to the bone remodel, the apoptosis and renewals.

Key words: Sclerostin; Sclerosteosis; Osteogenesis; Gene expression

骨生成是由破骨细胞、成骨细胞以及众多多肽生长因子参与的一个复杂的生理过程。骨形成动态平衡的维系是由多细胞、多基因网络调节的结果。当某些基因发生突变时, 如 LRP5、维生素 D 受体和 PTH 受体均可引起骨形成的紊乱。他们所编码的蛋白和表达的多种细胞生长因子调控细胞的增殖, 促进成骨细胞表型的发育^[1]。硬骨素(sclerostin, SO)是硬化性骨化病(sclerosteosis, SOST)基因所表达的一种蛋白质产物。近年来, 研究者发现 SO 在促进骨生成发生机制方面有着重要的作用^[2,3]。

1 在成骨细胞分化过程中 SOST mRNA 的表达

骨细胞主要由成骨始祖细胞、成骨细胞、破骨细胞和骨衬细胞组成, 破骨细胞和成骨细胞在时间和空间上耦联的生物学行为是骨形成的基础。一旦这

些细胞协同作用的失衡, 可能会导致骨代谢异常, 临床上可能出现或轻或重的不同类型的骨代谢性疾病。一些研究发现在胚胎期间所矿化的骨中有 SOST mRNA 的表达, 在出生之后, 骨细胞中 SO 蛋白和 SOST mRNA 的表达均被严格地限制。2004 年, van Bezooijen 等^[4]对鼠和人骨髓-起源骨髓基质细胞(MSCs)和鼠前成骨 KS483 细胞的成骨细胞分化期间针对 SOST mRNA 的表达始动作了研究。在骨生成条件下培养(一般加入抗坏血酸、磷酸甘油和地塞米松), 在所形成矿化基质中发现这些细胞均分化成成熟的成骨细胞。经 7 d 培养之后, 鼠 MSCs 有 ALP 阳性骨小节形成, 12 d 后这些小节均被矿化。在成骨细胞培养的矿化阶段, SOST mRNA 的表达水平呈不同变化, 发现在培养系统之间所表达的水平高低与骨小节的缺乏、存在及大小有相关性。2003 年, Schecroun 等^[5]发现在成骨细胞分化期间 SOST mRNA 的表达与后来的成骨细胞分化标志物骨钙素有关, 发现 ALP 和骨钙素表达之后对其有依赖性。

一些学者对人和鼠的骨骼 SOST mRNA 表达进

行了研究。分别从人和鼠的骨骼和硬化性骨化病患者中提取细胞总 RNA,用 RT-PCR 法对成年大鼠胫骨和来自髌关节置换后的股骨头进行检测均发现有 SOST mRNA 的表达。从南非一位硬化性骨化病患者中的乳状突起也发现有 SOST mRNA 表达,但在这些患者基因突变部位尚未发现有 SOST mRNA 降解的增加^[6,7]。为了寻找骨中表达的位点,2001 年, Akhter 和 Abe 等^[8,9]采用原位杂交对 SOST mRNA 的表达进行了更深入研究。发现 17.5 d 鼠胚胎中所有被矿化的骨有 SOST mRNA 的表达,其表达方式用 RNA 探针进行确认,均指向未被翻译的 SOST mRNA 区域。在 5 d 新生的尺骨、桡骨、尾椎骨和成年鼠胫骨的皮质骨中央具有高度 SOST mRNA 表达能力的骨细胞都被严格地限制。在各分化阶段的关节软骨检测中未发现 SOST mRNA 表达。2004 年, Sutherland 等^[10]在骨生成培养基中对 hMSC 分化成成熟的成骨细胞之后生物学行为作了研究,发现在长期的培养过程中 SOST 基因能够表达,而未分化的 hMSC 细胞尚不表达。经 25 d 培养之后, hMSC 细胞的 SOST 表达与他们所分化成的成骨细胞呈正相关。采用原代成骨细胞培养也获得相似的结果。同时,在蛋白质水平上对 SO 表达进行了研究,对 18 位自愿受试者骨活组织切片进行检测,其中有 8 位显示有特异性 SO 染色阳性,其中 7 号和 11 号标本提供了最强有力的信号,高倍放大显示骨细胞、骨小管和骨陷窝 SO 表达均呈阳性。在骨活组织切片中成骨细胞的 SO 表达年龄,成年人(28~69 岁),儿童(6 个月~12 岁)。更重要的是还观察到骨衬细胞 SO 染色阴性。此外,关节软骨 SO 染色阴性。

2004 年, Severson 等^[11]发现骨细胞、骨小管和骨陷窝 SO 染色呈阳性,在这里,骨细胞与骨表面上骨单位内的成骨细胞和衬细胞相连,意味着 SO 被转送到相邻的细胞。这种转运可看作细胞内从细胞到细胞,骨细胞骨小管是通过他们顶部间隙融合相连接。SO 还可看作是一种分泌型蛋白,这种假设,因在人 SOST cDNA 表达的成骨 KS483 细胞培养中发现有 SO 的存在而获得支持。

2 硬骨素促进成骨细胞的凋亡

在正常情况下,骨骼发育和骨形成的动态平衡中细胞凋亡的调控作用非常重要。对于正常的骨重建,细胞凋亡和细胞更新是紧密连锁的^[12,13]。当在某种情况下成骨细胞的敏感性增加、与凋亡-诱导因子的应答反应或某些重要细胞生长因子浓度改变

时,成骨细胞可能经历细胞程序性死亡或细胞凋亡。一些研究发现,如肿瘤坏死因子(TNF- α)和高水平糖皮质激素会使 TNF 受体家族成员的生物学作用增强,可增加成骨细胞的凋亡^[14,15]。

研究者发现,人成骨细胞经过 SO 处理之后,前凋亡因子 Bax 和 caspases 1、3、4 和 7(一种凋亡应答标记)的表达增加。2001 年, Deveraux 等^[16]使用 caspase 抑制剂(可直接拮抗 caspases 1、3),观察到 SO 的趋化激活作用被沉默,作者把该实验结果与 SO 的一种程序性细胞死亡相连接起来。还有报道指出,当血清缺乏或某种细胞生长因子丧失时,会使 SO 的凋亡通道被激活。2003 年, Winkler 等^[17]报道了 SO 是一种骨形态发生蛋白(BMP)拮抗剂,通过对 BMPs 拮抗或封闭下游信号通道来调节 BMP 的活性。而 SO 对 BMP 活性这种调节,很有可能会影响到成骨细胞的生物学活性和功能,这种作用方式仅能代表该机制的一部分。其他 BMP 的拮抗剂如: noggin、chordin 和 gremlin 都不能显示其前凋亡调节的活性。在 hMSC 细胞中 BMP-6 能修饰 SO 的活性,实验发现 BMP-6 可辅助 SO 介导对碱性磷酸酶活性的抑制作用,同时还发现 BMP-6 也可增加 SO 介导的对 caspase 活性的诱导作用。这些发现都支持到目前为止所涉及的一种尚未被鉴定的细胞凋亡通道。这些细胞生存所涉及的其他细胞生长因子或功能蛋白也均尚未被研究^[4]。

还有一些研究描述了 SOST/SO 在骨细胞中表达和 SO 限制 BMP 拮抗的活性。最近有研究发现, SOST/SO 能在骨细胞以外的其他骨生成细胞中也有表达,如肥大软骨细胞。研究还发现 SOST 促进子在临界的 BMP 拮抗剂条件下,能与 BMP 受体结合,封闭 BMP 诱导 SMAD 磷酸化,来对抗 BMP 诱导成骨细胞的活性。还显示 SO 具有一种增效功能,结合后会使 noggin 对 BMP 的拮抗活性灭活。这些实验结果表明,SO 蛋白具有诱导成骨细胞凋亡的作用。该基因在骨重建过程参与胞外结合蛋白与细胞生长因子之间整合作用来维系骨动态平衡。假如这些因子被分割,使得他们不可能获得对相应的靶细胞发挥生物学作用,SO 有可能促进骨细胞凋亡,造成成骨细胞数目的减少,最终使骨形成减少。因此,在骨重建和骨细胞介导的调节中 SO 可视为起到一个整体的连接作用^[11,18]。

3 硬骨素与 BMP 的拮抗作用

SO 是一种分泌型糖蛋白,与 BMP 拮抗剂 DAN

家族的成员同源,但与该家族中 noggin BMP 拮抗剂的亲缘关系较远。在 DAN 家族 noggin, gremlin 和 dan 的表达和转染研究中已指出这些功能蛋白的生物学作用,尤其是在细胞分化、骨形成和成骨样细胞方面更为突出^[19 20]。BMPs 和 BMP 拮抗剂对骨骼的作用已有报道,不再赘述^[21 22]。

SO 可与 BMP 家族的成员结合。SO 与 BMPs 结合之后,对于骨形成的调控非常重要。在硬化性骨化病患者中因 SO 的缺乏而导致过渡的骨沉积应归于 BMP 活性未遇到拮抗作用。2002 年, Hart 等^[23]采用免疫沉淀方法检测 SO 与 BMP-5、BMP-6 的结合能力。经凝胶电泳和 western 斑点杂交分析, BMP-5 和 BMP-6 能与 SO 结合。同 TGF- β 家族的成员 TGF- β 1、2 和 3 或睫状细胞神经营养因子(GDNF)不发生特异性结合。他们与 BMP 蛋白竞争同一位点。SO 与 BMP-6 结合后,同 BMP 与 BMP I、II 型受体或 DAN BMP 拮抗剂(DAN)竞争。假如 SO 与 BMPs 结合能阻止 BMPs 与其他受体结合,这样就有可能抑制 BMP 的活性。ELISA 竞争试验显示, BMP-6 可选择性与用人 SO 所包被的载体表面能发生高亲和力反应。在该条件下,鼠的 SO 也能与 BMP-6 结合。然而,一种 TGF- β 受体的成员不与 BMP 结合,亦不能与 SO 和 BMP-6 发生竞争性结合。这些研究数据证实, SO 可以特异性地与 BMP 蛋白结合,这种结合同 BMPs 与 I、II 型受体相互竞争。实验发现 DAN/ SO BMP 拮抗剂家族成员能抑制 BMPs 与 BMP 受体的结合,通过与 BMP 竞争蛋白结合来封闭、重叠 I 和 II 型受体的结合位点。在该实验模型的基础上, Groppe 等^[24]进行了更深入地研究,发现 BMP-7 上的 I 和 II 型受体结合位点因与 noggin BMP 拮抗剂结合而被封闭。还发现 SO 对 BMP-刺激 SMAD 磷酸化有拮抗作用。这一发现提示我们, SO 很有可能在早期阻断经 BMPs 介导的信号传导作用。BMP 受体复合物形成后可诱发联级反应,诱导 SMADs 1、5 或 8 的磷酸化。在鼠间充质 C3H10T1/2 细胞上, SMADs 磷酸化与 BMP-6 发生应答反应,用一种磷酸特异性抗-SMAD 抗体,经 western 斑点杂交能观察到这一现象。在一种羊多克隆抗 BMP-6 抗体或 BMP 受体存在的情况下共孵育时,这种效能作用能被封闭。在用人 SO 孵育之前,先将 BMP-6 加入细胞中, BMP-6 诱导 SMAD 磷酸化的部分作用可被封闭。这些实验表明, SO 与 BMP 受体具有竞争结合的能力,在早期 SO 能阻断 BMP-6-诱导信号的产生,如将这些数据整合归纳在一起,凭借此实验模型,可以认为 SO 能通过

阻止 BMP 与其受体的结合来抑制其信号的传导。

SO 与 BMP 拮抗剂广泛家族成员比较时会发现该蛋白具有独特的生物学性能。其一,在骨生成细胞中有高度特异性表达,尤其是与骨细胞和成骨样细胞之间联系更为紧密。其二,已报道 SOST 基因对类固醇转录调节上与其他 BMP 拮抗剂有明显不同。有的学者已指出,能否利用 SO 这种独特性能,从合成代谢的角度出发治疗骨质丢失以满足医学的需要,为骨质疏松的预防与治疗提供一种新的途径^[25]。

【参 考 文 献】

- [1] Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35: 1301-1305.
- [2] Balemans W, Ebeling M, Patel N, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 537-543.
- [3] Brunkow ME, Gardner JC, VanNess J, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 577-589.
- [4] van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*, 2004, 199: 805-814.
- [5] Schecroun N, Delloye C. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone*, 2003, 32: 252-260.
- [6] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [7] Severson B, Taylor S, Pan Y. Cbfa1/RUNX2 directs specific expression of the sclerosteosis gene (SOST). *J Biol Chem*, 2004, 279: 13849-13858.
- [8] Akhter MP, Cullen DM, Gong G, et al. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. *Bone*, 2001, 29: 121-125.
- [9] Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, et al. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 663-673.
- [10] Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, et al. Unique regulation of SOST, the sclerosteosis gene, by BMPs and steroid hormones in human osteoblasts. *Bone*, 2004, 35: 448-454.
- [11] Severson B, Taylor S, Pan Y, et al. Cbfa1/RUNX2 directs specific expression of the sclerosteosis gene (SOST). *J Biol Chem*, 2004, 279: 13849-13858.
- [12] Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med*, 2000, 108: 153-156.
- [13] Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev*, 1999, 13: 3037-3051.

(下转第 472 页)

- [14] Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* , 2003 , 316 : 23-32.
- [15] Turner PR , Mefford S , Christakos S. Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP). *Mol Endocrinol* , 2000 , 14 : 241-254.
- [16] Deveraux QL , Schendel SL , Reed JC. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* , 2001 , 19 : 57-74.
- [17] Winkler DG , Sutherland MK , Geoghegan JC. Osteocyte control of bone formation via sclerostin , a novel BMP antagonist. *EMBO J* , 2003 , 22 : 6267-6276.
- [18] Hamersma H , Gardner Jand Beighton P. The natural history of sclerosteosis. *Clin Genet* , 2003 , 63 : 192-197.
- [19] Hanaoka E , Ozaki T , Nakamura Y , et al. Overexpression of DAN causes a growthsuppression in p53-deficient SAOS-2 cells. *Biochem* , 2000 , 278 : 20-26.
- [20] Pereira RC , Economides AN , Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce gremlin , a protein that limits their activity in osteoblasts. *Endocrinology* , 2000 , 141 : 4558-4563.
- [21] Tsumaki N , Nakase T , Miyaji T , et al. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res* , 2002 , 17 : 898-906.
- [22] Zhang D , Ferguson CM , O'Keefe RJ , et al. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res* , 2002 , 17 : 293-300.
- [23] Hart PJ , Deep S , Taylor AB , et al. Crystal structure of the human Tbr2 ectodomain $\pm$ TGF- β 3 complex. *Nature Struct Biol* , 2002 , 9 : 203-208.
- [24] Groppe J. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* , 2002 , 420 : 636-642.
- [25] Canalis E , Economides AN , Gazzo E. Bone morphogenetic proteins , their antagonists , and the skeleton. *Endocr Rev* , 2003 , 24 : 218-235.