

骨相关细胞中钙敏感受体研究进展

郑家强 杨建虹

中图分类号: R681.1 Q253 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)09-0685-04

摘要: 钙平衡对机体的正常生理功能至关重要。骨组织是人体最重要的钙库,维持骨组织的动态平衡有利于机体的钙平衡。钙敏感受体在多种细胞中都有表达。研究发现在成骨细胞中,钙敏感受体促进细胞增殖、分化以及矿化作用,而在破骨细胞中,钙敏感受体介导高浓度钙离子引起细胞分化和凋亡。此外,钙敏感受体还能协助造血干细胞的准确定位。而肿瘤细胞中钙敏感受体的高度表达,提示该肿瘤细胞具有骨转移的倾向。笔者综述了钙敏感受体在成骨细胞、破骨细胞、造血干细胞、肿瘤骨转移中的研究进展。

关键词: 钙敏感受体; 成骨细胞; 破骨细胞; 造血干细胞; 骨转移

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.09.015

Research progress on Calcium-Sensing Receptor(CaR) in bone-related cells ZHENG Jiaqiang, YANG Jianhong. The School of Life Sciences, Graduate University of Chinese Academic of Science(GUCAS), Beijing 100049, China

Abstract: Calcium homeostasis is crucial in maintaining normal physiology function. Bone is the most important calcium pool in human body and keeping the dynamic balance of bone is beneficial for calcium homeostasis. Many cells can express wild type Calcium-Sensing Receptor(CaR). Study shows that CaR promotes proliferation, differentiation and mineralization in osteoblast and stimulates differentiation as well as apoptosis under high Ca^{2+} concentration in osteoclast. Furthermore, CaR regulates localization of haematopoietic stem cells. However, CaR expressing in tumor cells, indicate that tumor osseous metastasis may occur. This paper reviews research progress on CaR in osteoblast, osteoclast, haematopoietic stem cells, tumor osseous metastasis.

Key words: CaR; Osteoblast; Osteoclast; Haematopoietic stem cells; Osseous metastasis

人体稳定钙平衡的三大器官是骨骼、肠和肾。当血钙低于正常浓度(1 ~ 1.3 mmol/L)时,低钙促进甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)的分泌,1,25-(OH)₂VD₃合成增加,促进肠道从食物中吸收钙离子,致使血钙升高;反之,当血钙超过正常浓度时,一方面,高钙抑制甲状旁腺细胞分泌PTH,1,25-(OH)₂VD₃合成减少,抑制肠钙吸收和骨钙动员,另一方面,肾脏将多余的钙离子排出体外,致使血钙降低。

骨组织包含了机体99%的钙,是重要的“钙库”,所以,维持其动态平衡对钙平衡至关重要。骨骼由有机成分和无机成分组成,有机成分包括成骨细胞及其分泌的I型胶原蛋白、骨钙素等产物,无机

成分主要是钙盐和磷酸盐等。由成骨细胞的成骨作用和破骨细胞的溶骨作用“偶联”形成的动态平衡,维持正常的骨重建。骨重建作用在骨内腔中进行,其微环境中钙离子浓度的变化很大,例如,在破骨细胞溶骨作用时,钙离子浓度可达到40mmol/L,是正常血钙浓度的33倍。因此,钙离子浓度的变化将直接影响骨重建过程。由于成骨细胞、破骨细胞等骨相关细胞表面都有钙敏感受体,通过钙敏感受体感受细胞外钙离子细微变化,从而调节骨重建过程,稳定钙平衡。由此可见,以骨相关细胞表面的钙敏感受体为靶点,筛选其激动剂或抑制剂治疗骨质疏松症将成为未来的发展方向之一。笔者综述了最近几年国内外在骨组织细胞中钙敏感受体研究方面的进展。

1 钙敏感受体

钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaR)属于

G蛋白偶联受体第三超家族,是一个糖蛋白,在多种细胞和组织中均有表达。最初从牛甲状旁腺细胞中克隆得到,随后又在肾细胞、小肠细胞、骨细胞、心肌细胞^[1]等中相继发现,最近在味觉组织^[2]中也发现钙敏感受体的表达。除了人、鼠等哺乳动物和一些鱼类、两栖动物中存在此受体外,目前还在拟南芥的叶绿体内膜发现钙敏感受体的表达^[3]。经比较发现,各种属间的钙敏感受体相似度大于90%。人钙敏感受体由1078个氨基酸组成,7次跨膜,由胞外区、跨膜区和胞内区组成。胞外区的N-糖基化对钙敏感受体在细胞膜上的表达和定位至关重要。钙敏感受体不仅能够感受细胞外钙离子浓度的细微变化,同时还能感受 Mg^{2+} 等其他二价和多价离子浓度的变化,通过G蛋白下游的信号通路,将信号传入细胞内,引起相应的生物学效应。研究发现:甲状旁腺细胞中的钙敏感受体发生突变时,将导致高血钙症或低血钙症。钙敏感受体以二聚体的形式发挥作用,钙离子结合位点主要集中在细胞外结构区域——两个钙敏感受体形成的空隙。钙离子与钙敏感受体结合表现出Hill系数是2~4,暗示钙敏感受体上可能存在多个钙离子的结合位点^[4]。

2 钙敏感受体和成骨细胞

研究表明:不同类型和分化时期的成骨细胞中都有钙敏感受体的稳定表达,如小鼠胚胎成骨细胞(MC3T3-E1),小鼠成骨肉瘤细胞(UMR-106),人成骨肉瘤细胞(SAOS-2)和人骨肉瘤(MG-63)等。Yamaguchi等^[5]发现在骨组织微环境中,软骨细胞和成骨细胞中钙敏感受体的活化能够促进骨重建过程。

在MC3T3-E1和大鼠颅盖骨细胞中,高浓度钙离子、新霉素和 Gd^{3+} 等钙敏感受体激动剂,能够促进细胞的分裂、增殖。当导入外源钙敏感受体的互补序列后,细胞增殖作用减弱,说明钙离子等是通过钙敏感受体发挥作用的。此外,Chang等^[6]利用基因敲除实验发现,在小鼠胚胎发育13 d以前敲除软骨发生细胞中的钙敏感受体,小鼠胚胎就会死亡,而在胚胎发育16~18 d敲除钙敏感受体,虽然小鼠胚胎能够存活,但是生长板发育减缓。因此,在胚胎发育早期和骨骼形成过程中钙敏感受体发挥关键作用。

钙敏感受体是G蛋白偶联受体家族成员。与钙敏感受体相关的G蛋白有两种:激活型 G_s 和抑制型 G_i 。Edward等^[7]构建了一个持续表达 G_s 型信号的钙敏感受体(R_{s1}),用于提高成骨细胞的成骨作

用。体内实验表明, R_{s1} 的表达显著促进成骨作用:在9周龄小鼠中,股骨生长速度提高了12倍,股骨总量提高了3.8倍。同时,骨总量、细胞构成、骨矿分布、成骨细胞和血清中骨转化标志物都有提高。然而,如果在出生4周后的小鼠中表达 R_{s1} ,就不会有上述现象,说明 R_{s1} 对成骨细胞的作用具有精确的瞬时效应。Dvorak等^[8]在小鼠成骨细胞中,导入一个强启动子,构建了组成型表达钙敏感受体的小鼠模型。发现成骨细胞持续表达核激活因子受体配体(receptor activator of NF- κ B Ligand, RANKL),促进破骨细胞的分化或激活,溶骨作用增强,而小鼠成骨作用却没有变化,但小鼠出现骨质疏松症状。说明成骨细胞中钙敏感受体激活也能促进溶骨作用。

成骨细胞中钙敏感受体是通过促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)通路发挥作用的。在MC3T3-E1中,提高胞外钙离子浓度或使用钙敏感受体的激动剂,都会提高P42/44MAPK和p38 MAPK的磷酸化水平,而c-Jun氨基端激酶(JNK)通路却没有这种变化,而抑制MAPK,将抑制磷酸化作用。在小鼠颅骨细胞中,钙敏感受体介导高浓度的钙离子(>5 mmol/L)通过JUN通路,促进细胞增殖^[9]。钙离子通过钙敏感受体激活MEK/MAPK通路,促进甲状腺激素相关多肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)的产生,而PTHrP在绝经性骨质疏松症中具有促进骨形成的作用^[10]。雷诺酸锶(strontium ranelate)是一种治疗骨质疏松药物,具有促进成骨细胞增殖的作用。研究发现,雷诺酸锶以钙敏感受体作为靶点,至少通过两条通路发挥作用:激活ERK, PKC和PKD通路以及激活p38MAPK通路^[11]。因此,激活成骨细胞中钙敏感受体,能够促进成骨细胞的增殖、分化和矿化作用。然而钙敏感受体的作用机制仍有待进一步研究。

3 钙敏感受体和破骨细胞

破骨细胞来源于造血单核巨噬细胞,是一种巨大、多核、高度分化的溶骨细胞。核激活因子受体配体(receptor activator of NF- κ B Ligand, RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)是破骨细胞形成和分化过程中必需的两个细胞因子。RANKL通过与受体RANK结合,促进前破骨细胞分化为有功能的成熟破骨细胞。钙敏感受体在单核巨噬细胞和成熟的破骨细胞中都有表达,推断其在破骨细胞形成的不同阶段均发挥作用。

在钙敏感受体敲除小鼠($\text{CaR}^{-/-}$)中,从骨髓前体细胞分化为成熟破骨细胞的比例,比正常小鼠($\text{CaR}^{+/+}$)减少了70%,表明钙敏感受体与破骨细胞的分化相关;另一方面,正常小鼠($\text{CaR}^{+/+}$)中,高浓度钙离子促进破骨细胞的凋亡,钙敏感受体敲除小鼠($\text{CaR}^{-/-}$)却无此现象,说明钙敏感受体在破骨细胞凋亡中发挥作用。PLC和NF- κ B信号通路可能介导破骨细胞的凋亡作用^[12]。溶骨作用使胞外钙离子浓度升高,细胞骨架发生改变。此外,溶骨作用导致血钙浓度上升,从而抑制破骨细胞的溶骨作用。研究发现,高浓度的钙离子(毫摩尔级),引起破骨细胞快速皱缩,溶骨作用受到严重抑制。而高浓度钙离子抑制破骨细胞是通过钙离子作用于破骨细胞表面的钙敏感受体发挥作用的^[13]。Kameda等^[14]在兔成熟的破骨细胞中发现了钙敏感受体的表达,并发现高浓度的钙离子和钙敏感受体激动剂——新霉素和 Gd^{3+} 都会抑制破骨细胞的溶骨作用。然而,高浓度的钙离子既促进成骨作用,又抑制破骨作用的分子机制,有待于深入研究。

4 钙敏感受体和造血干细胞

成骨细胞和破骨细胞均由造血干细胞分化而来。在胚胎发育的早期造血干细胞从卵黄囊转移到肝脏,胎儿出生后,造血干细胞就转移到骨髓,此后一直保留在骨髓中。哺乳动物软骨骨化作用是骨髓中造血细胞发育和成熟的关键^[15]。钙敏感受体在造血细胞和单核/巨噬细胞中都有表达。体内和体外实验表明,钙敏感受体诱导造血细胞和单核/巨噬细胞的定位^[16]。Adams等研究发现,在缺少钙敏感受体的小鼠中,出生前初级造血细胞主要存在于外周循环和脾脏中,骨髓中很少。同时,钙敏感受体缺失小鼠($\text{CaR}^{-/-}$)骨髓中造血细胞数量极少,髓外造血功能增强。钙敏感受体缺失的细胞不能定位和保留在骨微环境中,可能是由于这些细胞不能和成骨细胞分泌的I-胶原蛋白结合所致。因此,钙敏感受体促使造血干细胞定位于骨髓中,同时参与骨髓中干细胞的分化和骨平衡作用。

5 钙敏感受体和肿瘤骨转移

肿瘤细胞表面也表达钙敏感受体,感受胞外钙离子浓度的变化^[17]。激活钙敏感受体能够促进乳腺癌细胞和甲状腺癌细胞分泌PTH相关多肽(PTHrP),而PTHrP促进肿瘤细胞生存和生长、骨转移、诱导骨骼疾病相关并发症^[18]。恶性肿瘤的体液

性高钙血症(humoral hypercalcemia of malignancy, HHM)是由乳腺癌、前列腺癌等引起的一种副肿瘤综合征^[19]。在HHM条件下,破骨作用增强,骨细胞微环境中钙离子浓度持续上升,而肿瘤细胞上的钙敏感受体又会引导肿瘤细胞在骨组织聚集,从而促进了肿瘤的骨转移。结肠癌等肿瘤细胞中也发现了钙敏感受体的表达,这表明肿瘤细胞具有骨转移的倾向。最新研究发现,钙敏感受体通过Wnt通路促进结肠细胞的分化^[20]。因此,通过抑制钙敏感受体的表达和钙敏感受体的活性,可以预防和抑制肿瘤的骨转移^[21]。

6 展望

综上所述,钙敏感受体在维持机体钙平衡等生理机制中发挥重要作用。胞外 Ca^{2+} 及钙敏感受体调节剂通过钙敏感受体及相关的信号通路调控骨相关细胞的生长、增殖、分化和凋亡等,并与佝偻病、骨软化症、骨质疏松症及肿瘤骨转移等疾病的发生密切相关。在成骨细胞中,钙敏感受体促进细胞增殖、分化以及矿化作用,而在破骨细胞中,钙敏感受体将引起细胞分化和凋亡。钙敏感受体维持机体平衡的作用机制仍有待进一步的研究。目前,以成骨细胞中钙敏感受体作为药物靶点^[22,23],已经开发出一些治疗骨质疏松症的药物,如雷诺酸锶(strontium ranelate),Reclast, NPS R-568^[24]等。然而,对破骨细胞和造血干细胞中钙敏感受体的研究仍较少,因此,揭开钙敏感受体在破骨细胞、造血干细胞中的作用机理,对预防和治疗骨相关疾病都有深远的意义。此外,钙敏感受体广泛存在于生物体中,揭示不同细胞中钙敏感受体的功能和机制仍是未来研究的热点。同时,以钙敏感受体作为靶点,利用我国丰富的动植物药物资源,寻找安全、高效的钙敏感受体的激动剂或抑制剂,也将成为预防和治疗骨相关疾病及肿瘤骨转移等疾病的有效途径。

【参考文献】

- [1] Berra RR, Raqeeb A, Laforenza U, et al. Cardiac microvascular endothelial cells express a functional Ca^{2+} -sensing receptor. *J Vasc Res* 2009; 46(1): 73-82.
- [2] San GA, Uneyama H, Maekawa T, et al. The calcium-sensing receptor in taste tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378(3): 414-418.
- [3] Vainonen JP, Sakuragi Y, Stael S, et al. Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* 2008; 275(8): 1767-1777.

- [4] Huang Y, Zhou Y, Castiblanco A, et al. Multiple Ca^{2+} -binding sites in the extracellular domain of the Ca^{2+} -sensing receptor corresponding to cooperative Ca^{2+} response. *Biochemistry* 2009, 48(2):388-398.
- [5] Yamaguchi T, Sugimoto T. Impaired bone mineralization in calcium-sensing receptor (CaSR) knockout mice: the physiological action of CaSR in bone microenvironments. *Clin Calcium* 2007, 17(10):1567-1573.
- [6] Chang W, Tu C, Chen TH, et al. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal* 2008, 1(35):1-13.
- [7] Hsiao EC, Boudignon BM, Chang WC, et al. Osteoblast expression of an engineered Gs-coupled receptor dramatically increases bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105(4):1209-1214.
- [8] Dvorak MM, Chen TH, Orwoll B, et al. Constitutive activity of the osteoblast Ca^{2+} -sensing receptor promotes loss of cancellous bone. *Endocrinology* 2007, 148(7):3156-3163.
- [9] Chattopadhyay N, Yano S, Tfelt-Hansen J, et al. Mitogenic Action of Calcium-Sensing Receptor on Rat Calvarial Osteoblasts. *Endocrinology* 2004, 145(7):3451-3462.
- [10] Ahlstrom M, Pekkinen M, Riehle U, et al. Extracellular calcium regulates parathyroid hormone-related peptide expression in osteoblasts and osteoblast progenitor cells. *Bone* 2008, 43(3):483-490.
- [11] Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone* 2008, 42(6):1131-1136.
- [12] Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, et al. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J* 2006, 20:2562-2564.
- [13] Kanatani M, Sugimoto T, Kanzawa M, et al. High extracellular calcium inhibits osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 261:144-148.
- [14] Kameda T, Mano H, Yamada Y, et al. Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 245:419-422.
- [15] Jacenko O, Roberts DW, Campbell MR, et al. Linking hematopoiesis to endochondral skeletogenesis through analysis of mice transgenic for collagen X. *Am J Pathol* 2002, 160:2019-2034.
- [16] Olszak IT, Poznansky MC, Evans RH, et al. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 2000, 105:1299-1305.
- [17] Manning AT, O'Brien N, Kerin MJ. Roles for the calcium sensing receptor in primary and metastatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006, 32(7):693-697.
- [18] Schramek H. MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* 2002, 17:62-67.
- [19] Tfelt-Hansen J. The role of calcium-sensing receptor and signalling pathways in the pathophysiology in two *in vitro* models of malignant hypercalcemia: the rat rice H-500 Leydig testis cancer and prostate cancer (PC-3) cells. Expression and regulation of pituitary tumor transforming gene in Leydig testis cancer and astrocyte and astrocytoma cells. *Dan Med Bull* 2009, 55(1):17-46.
- [20] Whitfield JF. The calcium-sensing receptor—a driver of colon cell differentiation. *Curr Pharm Biotechnol* 2009, 3(3):311-316.
- [21] Mihai R. The calcium sensing receptor: from understanding parathyroid calcium homeostasis to bone metastases. *Ann R Coll Surg Engl* 2008, 90(4):271-277.
- [22] Chad Deal. Potential new drug targets for osteoporosis. *Nature Clin Pract Rheumatol* 2009, 5(1):20-27.
- [23] Hu J. Allosteric modulators of the human calcium-sensing receptor: structures, sites of action, and therapeutic potentials. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008, 8(3):192-197.
- [24] Murakami Y, Furuya Y, Wada M, et al. Pharmacological properties of the calcimimetic compound NPS R-568 *in vitro* and *in vivo*. *Clin Exp Nephrol* 2000, 4:293-299.

(收稿日期 : 2009-06-08)