

Wnt 信号通路抑制因子 DKK-1 在骨质疏松发生中的研究进展

罗磊 谭钢 康鹏德 廉永运 裴福兴

中图分类号: R318.04 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)05-0365-04

摘要: Wnt 信号通路对成骨细胞的发育及分化起着重要作用。近年来的研究发现,作为 Wnt 信号通路的抑制因子 DKK-1 能抑制骨形成,导致骨质疏松,而通过拮抗 DKK-1 的作用可使骨量增加。DKK-1 可能成为治疗骨质疏松的新靶点。笔者对 DKK-1 在成骨细胞中的信号传导途径及其在骨质疏松中的作用做了综述。

关键词: Wnt 信号通路; DKK-1; 骨质疏松

Research progress on the role of Wnt signaling pathway inhibitor DKK-1 in the occurrence of osteoporosis LUO Lei, TAN Gang, KANG Pengde, et al. West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: PEI Fuxing, Email: peifuxing@vip.163.com

Abstract: The Wnt signaling pathway plays a vital role in the process of osteoblast proliferation and differentiation. In recent years, a number of studies have found that this pathway can be impeded by an inhibitor, DKK-1. Over-expression of DKK-1 could affect bone formation and even lead to osteopenia. Blocking the DKK-1 as indicated by some researchers, could help to restore the function of osteoblast, and therefore increase bone mass. These findings suggest that using DKK-1 as a novel target could provide a new way for treating osteoporosis. Here, we reviewed the growing literature on the mechanism of DKK-1 inhibiting Wnt signaling transduction as well as its role in osteoporosis.

Key words: Wnt signal transduction; Dickkopf-1; Osteoporosis

DKK-1 (Dickkopf-1) 是 DKKs (Dickkopfs) 家族中的一员,为一种分泌型糖蛋白,通过与其相应的受体结合可抑制 Wnt 信号在细胞内的传递,从而参与调节细胞的增殖、分化及迁徙等许多方面。以往对 DKK-1 的研究集中在肿瘤领域,近年来,随着对 Wnt 信号通路与骨形成关系的认识逐渐深入,DKK-1 在骨量丢失疾病中的作用及通过抑制 DKK-1 来治疗这些疾病成为研究热点。本文拟就 Wnt 信号通路及其与骨形成的关系、DKK-1 的分子生物学特点及其作用机制、抑制 DKK-1 在治疗骨量丢失疾病中的作用做一综述。

1 Wnt 信号通路和骨形成

1.1 Wnt 信号传导通路

目前认为 Wnt 信号在细胞内的转导有四种途径:经典通路(Wnt/ β -catenin 信号通路)、平面细胞极性通路(Wnt/PCP 通路)、Wnt/ Ca^{2+} 通路以及调节纺锤体定向和不对称细胞分裂的通路^[1]。研究表明,对骨形成起主要作用的是经典通路。

在不同物种中,经典 Wnt 通路信号转导的分子机制具有高度保守性。其组成主要包括:细胞外因子(Wnt)、跨膜受体(frizzled)、胞质蛋白(β -catenin)及核内转录因子(TCF)等一系列蛋白。Wnt 蛋白与其相应的受体结合来调控细胞内的信号传导。其受体主要有两种:一种为卷曲蛋白(frizzled, Frz)。Frz 是一种 7 次跨膜蛋白,其胞外 N-末端保守的半胱氨酸富含区(cysteine rich domain, CRD)能与 Wnt 结合^[2]。另一种为辅助受体低密度脂蛋白受体相关

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30872631)

作者单位: 610041 成都,四川大学华西医院骨科

通讯作者: 裴福兴, Email: peifuxing@vip.163.com

蛋白 5/6 (LRP5/6)^[3]。其胞外区也可以与 Wnt 蛋白结合。Wnt 配体与 Frz 及 LRP5/6 结合后,作用于胞质内的蓬乱蛋白 (Dishevelled, Dsh) 使其磷酸化激活,磷酸化的 Dsh 抑制丝/苏氨酸激酶 (GSK-3 β) 活性,使 β -catenin 不能被磷酸化,进而不能被泛素-蛋白酶体系统降解。于是, β -catenin 在细胞质中积累,并进入细胞核^[4-6],与 T 细胞因子 (T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF) 相互作用,启动靶基因的表达^[7]。

1.2 Wnt 通路与骨形成的关系

Wnt 信号通路在成骨细胞的发育及分化过程中扮演着重要角色,Wnt-LRP5/6 是骨量形成的重要调节因子。Cong^[8], Little^[9], Van 等^[10]的研究结果表明 LRP5 功能丧失性突变可以导致骨质疏松,功能获得性突变能够导致高骨量。Holmen^[11]构建的 LRP5/LRP6 双基因突变小鼠模型证实了 Lrp6 (+/-)/Lrp5 (-/-) 小鼠骨密度显著低于 Lrp6 (+/+)/Lrp5 (-/-) 组。Wnt 通路组分基因敲除和转基因鼠模型也表明经典 Wnt 通路可调节成骨细胞的分化、骨基质的形成及矿化等环节并可影响破骨细胞的发生和骨吸收^[12-13]。因此,通过调节 LRP5/6 的表达可能达到促进成骨,增加骨量的目的。

2 DKK-1 及其作用机制

DKKs (Dickkopfs) 家族包括 DKK1 ~ 4,它们具有高度同源性。其中,DKK-1 和 DKK-4 能抑制 Wnt 信号,DKK-2 既能抑制又可激活 Wnt 信号通路,而 DKK-3 对 Wnt 信号没有明显的影响^[14]。目前确认的 DKK-1 受体有低密度脂蛋白受体 (LRP-5 与 LRP-6)^[3, 15]及含 kringle 结构域的 Kremen 蛋白受体^[16]。DKK-1 直接与 LRP 受体结合,或者与其跨膜受体 Kremen (Kremen-1, Kremen-2) 结合后再与 LRP5/6 结合形成三聚体,诱导快速的细胞内吞,减少细胞膜上的 LRP5/6,由此阻断了 Wnt 信号向胞内的传递^[17],使骨形成减少。实验也证实过度表达的 DKK-1 能抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化,使成骨细胞数量减少,还能抑制骨基质的矿化及骨折后的修复^[18-19]。因此,通过抑制 DKK-1,激活成骨细胞 Wnt 通路,增加骨量,对于骨量减少疾病的治疗具有重要意义。

3 DKK-1 表达与骨量调控

Wnt 信号通路对骨代谢发挥着重要作用,DKK-1 作为该通路的抑制因子可抑制骨形成。许多骨量

丢失疾病患者的血清 DKK-1 含量升高,因此,通过抑制 DKK-1 的活性来治疗这些骨量丢失疾病成为近年来的研究热点。不过该领域的研究仍处在基础研究阶段。

3.1 多发性骨髓瘤

多发性骨髓瘤是浆细胞克隆性增生的恶性肿瘤。骨髓内浆细胞的克隆性增殖,可引起溶骨性骨质破坏。DKK1 在多发性骨髓瘤中扮演了极其重要的角色。Tian 等^[20]发现新诊断的多发性骨髓瘤患者血清中 DKK-1 含量增加。他指出,骨髓瘤细胞产生的 DKK-1 能抑制成骨细胞的分化,促进多能干细胞早期增殖从而损害其分化能力,最终破坏成骨细胞与破骨细胞的平衡,细胞溶解酶大量释放引起溶骨。同时,他们对小鼠干细胞的体外实验还证实 DKK1 中和抗体能增加 BMP-2 介导的碱性磷酸酶表达,促进成骨细胞生成。随后,Shmuel 等^[21]将多发性骨髓瘤患者的癌细胞移植到免疫缺陷小鼠体内,并将其分成两组,一组给予 DKK-1 中和抗体治疗 (4~6 周),另一组为空白对照组。他们发现对照组小鼠骨密度下降,而 DKK-1 中和抗体治疗组骨密度比治疗前增高 ($P < 0.001$)。组织学检查发现实验组表达骨钙蛋白的成骨细胞数量增加,表达耐酒石酸盐酸性磷酸酶的破骨细胞数量下降。而且 DKK-1 中和抗体还可显著增加没有多发性骨髓瘤的免疫缺陷小鼠的股骨密度。Dimitrios^[22]首先将人抗 DKK-1 中和抗体 BHK880 应用于 5T2MM 小鼠骨髓瘤模型,结果也证实其可缓解溶骨性疾病的发展,促进骨形成。

这些研究均表明抑制 DKK-1 的活性可恢复多发性骨髓瘤成骨细胞的分化,减少骨吸收,促进骨形成,并有助于控制肿瘤的增长。

3.2 绝经后骨质疏松

Anastasilakis^[23]检测了绝经后骨质疏松患者血清 DKK-1 的浓度并与年龄、性别匹配的健康人群比较,发现骨质疏松组患者的 DKK-1 浓度显著高于对照组 ($P < 0.002$)。Wang^[24]将大鼠卵巢切除后给予 DKK-1 反义寡核苷酸治疗 ($20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。4 周后取大鼠股骨和胫骨评价其骨量、力学强度,进行免疫组织化学检查,并检测其破骨细胞的数量。发现 DKK-1 反义寡核苷酸能显著减轻卵巢切除后对大鼠体重、骨矿物质含量、骨密度及股骨最大负荷的抑制作用。同时还减少了卵巢切除术后依赖粒细胞集落刺激因子的原始骨髓巨噬细胞向破骨细胞的分化。形态计量学观察证实 DKK-1 反义寡核苷

酸可增加成骨细胞数量,减少破骨细胞数量,并能缓解卵巢切除术后大鼠骨小梁的缺失。通过免疫染色证实,在去卵巢大鼠骨微环境中临近骨小梁、骨内膜的成骨细胞及正在钙化的软骨细胞表达 DKK-1 及 RANKL 增多,经 DKK-1 反义寡核苷酸治疗后,其表达量减少。RANKL 是核因子 κ B 受体活化因子配基,可诱导破骨细胞分化、发育、发挥功能。DKK-1 反义寡核苷酸可抑制 RANKL 的表达,从而抑制破骨细胞分化。

3.3 糖皮质激素所致骨质疏松

随着糖皮质激素在肾脏疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病、血液病等领域被广泛应用,其导致的骨质疏松 (glucocorticoids-induced osteoporosis, GIO) 发病率逐渐上升,成为继发性骨质疏松症最常见的原因^[25],受到人们重视。GIO 发病机制复杂,目前还没有有效的治疗手段。近年来,研究发现糖皮质激素可通过 Wnt 信号途径影响间充质细胞的成骨分化和成骨细胞的功能^[26-27]。

Smith 等^[28]首先揭示了糖皮质激素可通过激活 GSK-3 β 促进 β -连锁蛋白降解,从而抑制成骨细胞分化。随后,他们又发现糖皮质激素通过诱导组蛋白脱乙酰酶的表达,抑制 TCF/LEF 介导的促基因转录作用^[29]。2004 年,Keizo 等^[30]证实了在人 DKK-1 基因启动子的 -788 ~ -774 bp 区域存在糖皮质激素反应元件,并且发现地塞米松可以增加原代培养的人成骨细胞 DKK-1 mRNA 的转录,减少 Wnt 的辅助受体 LRP-5 mRNA 的转录,而对 DKK-1 受体 Kremen1 mRNA 的转录没有影响。随后,他又发现 DKK-1 特异性抗体可部分 (35% ~ 45%) 恢复被地塞米松抑制的 Wnt3a 介导的依赖 Tcf/Lef 的转录活动^[31]。

Wang 等^[32]的研究结果表明 DKK-1 反义寡核苷酸 (DKK1-AS) 可减轻地塞米松对成骨前体细胞碱性磷酸酶活性及骨钙蛋白表达的抑制作用,有效缓解地塞米松对骨密度、松质骨体积、成骨细胞表面积、骨形成率及骨髓基质干细胞成骨分化的影响。研究证实 DKK1-AS 通过 β -catenin 或 Akt 信号调节成骨细胞活性,阻止骨髓基质干细胞的成脂分化。DKK1-AS 还能抑制地塞米松诱导的 DKK-1 高表达。

3.4 其他导致骨量减少的骨疾病

类风湿性关节炎:Diarras^[33]通过抑制 DKK-1,使类风湿性关节炎小鼠骨侵蚀逆转为骨形成,但仍然有骨赘形成。他们还发现在一般炎症性关节炎及类风湿性关节炎小鼠中,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是

DKK-1 的主要诱导剂。

骨肉瘤:Lee 等^[34]发现骨肉瘤患者血清中 DKK-1 浓度显著增高,而肿瘤周边的癌细胞分泌的 DKK-1 量最多,这可能与肿瘤的侵袭有关,因为肿瘤周边的癌细胞分泌的 DKK-1 可抑制肿瘤周围骨的修复。这些数据表明 DKK-1 可作为诊断或评估骨肉瘤预后的标志物,而抑制 DKK-1 可作为骨肉瘤的辅助治疗。

黑色素瘤:在黑色素瘤引起的骨病中,抗 DKK-1 的单克隆抗体同样也可阻止骨吸收引起的骨量减少,促进骨形成,并助于控制黑色素瘤的生长^[35]。

4 问题与展望

以上的研究表明抑制 DKK-1 功能在治疗骨质疏松、癌症引起的骨丢失以及骨关节疾病中有着诱人的前景。但上述研究都是体外或动物实验,其临床应用还有一些问题尚待解决。任何新的治疗方法,除了要考虑其有效性,还要重视其安全性。Wnt 信号通路在许多肿瘤的发生发展具有密切关系,而 DKK-1 在诱导肿瘤细胞凋亡,调控某些肿瘤细胞的浸润和侵袭方面发挥重要作用,抑制 DKK-1 后不会增加癌症的发生,值得我们谨慎对待。而且, Wnt 信号在分化晚期的成骨细胞中需要下调,以促进骨基质矿化。而 Wnt 信号的下调是通过增加 DKK-1 和 DKK-2 的表达实现的。DKK-1 对减弱 BMP 诱导的碱性磷酸酶反应和促进 ALP⁺ 成骨细胞向矿化组织的迁徙起着至关重要的作用^[36]。Zhang 等^[37]的研究发现成熟前成骨细胞的增殖和分化受到成骨细胞特异性转录因子 Osx 的调控。Osx 通过抑制 Wnt 信号促进成骨细胞分化,抑制成骨细胞的增殖。而 Osx 抑制 Wnt 信号的分子机制之一就是激活 DKK-1 基因的转录。因此,抑制 DKK-1 会不会对晚期成骨细胞的分化产生影响以及 DKK-1 抗体或反义寡核苷酸的安全有效剂量等一系列问题还有待人们进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Eisenmann DM. Wnt signaling. Worm Book, 2005, 25:1-17.
- [2] Rulifson EJ, Wu CH, Nusse R. Pathway specificity by the bifunctional receptor Frizzled is determined by affinity for wingless. Mol Cell, 2000, 6:117-126.
- [3] Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. Nature, 2000, 407:530-535.
- [4] Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell, 2002, 108:837-847.

- [5] Aberle H, Bauer A, Stappert J, et al. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 1997, 16: 3797-3804.
- [6] Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8:95-102.
- [7] Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *Cell Biol*, 2000, 149:249-254.
- [8] Gong Y, Slee RB, Fukui N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 2001, 107(4):513-523.
- [9] Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(1): 11-19.
- [10] Van WL, Cleiren E, Gram J. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(3):763-771.
- [11] Holmen SL, Giambernardi TA, Zylstra CR, et al. Decreased BMD and Limb Deformities in Mice Carrying Mutations in Both Lrp5 and Lrp6. *J Bone Miner Res*, 2004, 19:2033-2040.
- [12] 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.
- [13] Yu HM, Jerchow B, Sheu TJ, et al. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development*, 2005, 132(8):1995-2005.
- [14] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 2006, 25(57):7469-7481.
- [15] Mao B, Wu W, Li Y, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 2001, 411:321-325.
- [16] Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 2002, 417:664-667.
- [17] Mikhchev AM, Mikhcheva SA, Rostomily R, et al. Dickkopf-1 activates cell death in MDA-MB435 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(3):675-680.
- [18] Amantea CM, Kim WK, Meliton V, et al. Oxysterol-induced osteogenic differentiation of marrow stromal cells is regulated by Dkk-1 inhibitable and PI3-kinase mediated signaling. *J Cell Biochem*, 2008, 105(2):424-436.
- [19] Lia J, Sarosib I, Russell C, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*, 2006, 39(4):754-766.
- [20] Tian E. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2003, 349:2483-2494.
- [21] Shmuel Y, Wen L, Fenghuang Z, et al. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth *in vivo*. *Blood*, 2007, 109(5):2106-2111.
- [22] Dimitrios C, Evangelos T, Meletios AD. Pathogenesis and management of myeloma bone disease: five-year view. *Expert Rev Hematol*, 2009, 2(4):385-398.
- [23] Athanasios DA, Stergios AP, Avraam A, et al. The effect of teriparatide on serum Dickkopf-1 levels in postmenopausal women with established osteoporosis. *Clin Endocrinol*, 2009, 15:1365-2265.
- [24] Wang FS, Ko JY, Lin CL, et al. Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. *Bone*, 2007, 40:485-492.
- [25] Migliaccio S, Brama M, Malavolta N. Management of glucocorticoids-induced osteoporosis: role of teriparatide. *Ther Clin Risk Manag*, 2009, 5(2):305-310.
- [26] Zhou H, Mak W, Zheng Y, et al. Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem*, 2008, 283:1936-1945.
- [27] Zhou H, Mak W, Kalak R, et al. Glucocorticoid-dependent Wnt signaling by mature osteoblasts is a key regulator of cranial skeletal development in mice. *Development*, 2009, 136:427-436.
- [28] Smith E, Coetzee GA, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*, 2002, 277(20):18191-18197.
- [29] Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and independent manner. *J Biol Chem*, 2005, 280(3):2388-2394.
- [30] Ohnaka K, Taniguchi H, Kawate H, et al. Glucocorticoid enhances the expression of dickkopf-1 in human osteoblasts: novel mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318:259-264.
- [31] Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, et al. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329:177-181.
- [32] Wang FS, Ko JY, Yeh DW, et al. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology*, 2008, 149:1793-1801.
- [33] Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*, 2007, 13(2):156-163.
- [34] Lee N, Smolarz AJ, Olson S, et al. A potential role for Dkk-1 in the pathogenesis of osteosarcoma predicts novel diagnostic and treatment strategies. *Br J Cancer*, 2007, 97(11):1552-1559.
- [35] Yaccoby S, Ling W, Zhan F, et al. Antibody-based inhibition of DKK-1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth *in vivo*. *Blood*, 2007, 109:2106-2111.
- [36] van der Horst G, van der Werf SM, Farih-Sips H, et al. Downregulation of Wnt signaling by increased expression of Dickkopf-1 and -2 is a prerequisite for late-stage osteoblast differentiation of KS483 cells. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(10):1867-1877.
- [37] Zhang C, Cho K, Huang Y, et al. Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(19):6936-6941.

(收稿日期:2010-01-20)