

MITF 在破骨细胞中的作用研究进展

金小冬 卢丽 李青南*
广东药学院生命科学与生物制药学院新药功能研究中心 广东省生物技术候选药物研究重点实验室,广州 510006

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 05-0547-05

摘要: MITF (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 是小眼畸形相关转录因子,它在破骨细胞中的作用成为近几年骨科领域的研究热点。不断有研究证实,MITF 调节破骨细胞中众多功能相关基因的转录,包括抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), 组织蛋白酶 K (Cathepsin K), 破骨细胞相关受体 (osteoclast-associated receptor, OSCAR), 氯离子通道-7 (chloride channel-7, Clcn7), 骨硬化相关跨膜蛋白-1 (osteopetrosis-associated transmembrane protein 1, Ostml) 和 E-钙粘蛋白 (E-cadherin) 等。无论在 MITF^{mi/mi} 突变的小鼠模型还是来源于 MITF^{mi/mi} 突变的小鼠体外培养的破骨样细胞中,我们都能检测到上述与破骨细胞众多功能相关基因的表达都会受到明显抑制,导致破骨细胞功能异常,小鼠患有严重的骨硬化病。因为小鼠和人类的 MITF 基因序列具有很高的同源性,所以理解 MITF 调控系统对小鼠破骨细胞的作用也将有助于我们阐明妇女绝经后的骨质疏松症、骨硬化病或者发生在多发性骨髓瘤患者身上的溶骨性骨质破坏和高钙血症等人类疾病的分子作用机制。现就 MITF 在破骨细胞中的作用做一综述。

关键词: 小眼畸形相关转录因子;抗酒石酸酸性磷酸酶;组织蛋白酶 K;破骨细胞相关受体;氯离子通道-7;骨硬化相关跨膜蛋白-1;E-钙粘蛋白

Research progress in the function study of MITF in osteoclasts

JIN Xiaodong, LU Li, LI Qingnan
School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, The Center for New Drug Function Research, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology Candidate Drug Research, Guangzhou 510006, China
Corresponding author: LI Qingnan, Email: qingnanli@ sina. com

Abstract: In recent years, the function of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in osteoclasts has become a hot field in orthopedics. Various studies have confirmed that MITF can regulate the transcription of numerous osteoclast functionally related genes, including tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), Cathepsin K, osteoclast-associated receptor (OSCAR), chloride channel-7 (Clcn7), osteoporosis-associated transmembrane protein 1 (Ostml), and E-cadherin. Not only in the MITF^{mi/mi} mutant mouse model but also in osteoclast-like cells derived from mutant MITF^{mi/mi} mice, the expression of these numerous osteoclast functionally related genes was significantly inhibited, resulting in abnormal osteoclast function, leading to severe osteoporosis in mice. The MITF gene sequences in mouse and human are highly homologous. So, understanding the regulatory system of MITF in mouse osteoclasts provides us an attractive model, which will help us to elucidate the molecular mechanism of human disorders, including osteoporosis in postmenopausal women, osteopetrosis, the osteolytic bone destruction, and hypercalcemia in patients with multiple myeloma. This article reviews the regulatory effect of MITF in osteoclasts.

Key words: MITF; TRAP; Cathepsin K; OSCAR; Clcn7; Ostml; E-cadherin

MITF 是小眼畸形相关转录因子。小眼畸形最早发现于突变小鼠,1942 年 Hertxig 发现一种放射诱变的突变小鼠,其表现为小眼畸形,皮毛和视网膜的色素减退,其相关基因被称为 mi 位点^[1]。1993 年,小鼠的小眼畸形相关转录因子 MITF 被克隆,证实小鼠 MITF 基因位于 mi 位点上^[2]。MITF 蛋白属于 Tfe 转录因子超家族成员,能够以二聚体形式结合以“CANNTG”为核心的 E-盒或 M-盒序列,起到调控目标基因转录表达的作用。以往研究证实 MITF 参与了黑色素细胞、眼色素上皮细胞及柱状细胞的

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (No:81203003)
* 通讯作者: 李青南,博士,教授,硕士生导师, Email: qingnanli@ sina. com

发育与分化,直到 2000 年才首次提出 MITF 也参与破骨细胞的发育、分化与功能调节^[3],而 MITF 在破骨细胞中的作用也成为近几年骨科领域的研究热点。

1 MITF 的基本结构

MITF 具有基本-螺旋-环-螺旋-亮氨酸拉链 (basic-Helix-Loop-Helix-LeucineZip-per, bHLHZip) 结构。MITF 在结构上与 TFEC、TFE3 和 TFEB 最接近,因此可以将其划分入 TFE 家族^[4,5]。小鼠中该基因的结构基因由 9 个外显子构成,编码由 419 个氨基酸残基构成的 MITF 蛋白,其中包含 1 个 bHLHZip 结构,为该蛋白质功能区^[6]。MITF 参与了包括色素细胞、肥大细胞、破骨细胞的发育、分化和功能调节。MITF 在小鼠身上至少有 16 种不同的突变等位基因^[7,8],此外,与人类同源的该基因突变体可导致遗传性疾病 Waardenburg 氏综合征 II 型^[9]。在不同程度上,小鼠的 MITF 突变等位基因可以影响小鼠毛色的形成以及眼睛、耳朵的发育,另外还影响肥大细胞的增生、破骨细胞的功能和骨吸收^[7,8]。仅仅在小鼠身上包含三对显性突变等位基因 (*mi*, *or*, *crc*) 其中一对或者两对隐性突变等位基因 (*di*, *vit*) 即可表现出骨硬化病^[8]。在 MITF 突变的小鼠身上,与隐性等位基因突变导致的骨硬化症相比,显性等位基因突变导致的骨硬化症更严重,其中 *mi* 等位基因表现出最严重的骨硬化表型^[7,8]。

2 MITF 对破骨细胞的调节作用

MITF 可通过不同途径参与破骨细胞的分化过程。MITF 可与 PU. 1 或 PU. 1 相互作用蛋白协同作用诱导破骨细胞的特异性标记基因 TRAP 及破骨细胞相关受体 (OSCAR) 基因的表达。MITF 和 TFE3 还可通过作用于组蛋白酶 K 启动子上的三个顺式作用元件,在转录水平调控组蛋白酶 K 的表达。在 *Clen7* 启动子上有两个 MITF 结合位点 (2 个 M-box),而在 *Ostm1* 启动子上有单一 MITF 结合位点 (1 个 M-box)。1 个 *Clen7* M-box 的突变可以阻止 MITF 的反式激活。还有 MITF 反式激活 E-钙粘蛋白启动子是通过一个保守的 E-box 样序列。在 MITF 基因敲除小鼠中虽具有单核破骨细胞,但这些细胞不能正常融合为多核细胞,缺乏明显的皱褶缘,丧失了骨吸收功能,患有骨硬化病。提示 MITF 基因失活小鼠的破骨细胞缺陷发生于破骨细胞分化的晚期。

2.1 MITF 调节 TRAP 基因的表达在破骨细胞分化的晚期

目前有证据表明 MITF 调节破骨细胞分化晚期 TRAP 基因的转录,而 TRAP 是破骨细胞活化的特异性标志。体内实验对小鼠胚胎前肢的破骨细胞分析表明,在长骨软骨内成骨的过程中 MITF 和 TRAP 是共同表达的。来源于 *mi/mi* 突变的小鼠破骨细胞中 TRAP mRNA 的表达要低于正常老鼠的 8 倍,这表明 MITF 的功能与 TRAP 的表达是有直接关系的^[3]。TRAP 也可以在其它类型的细胞中表达,特别是在某些类型的巨噬细胞中^[10,11]。然而,在腹膜巨噬细胞中 TRAP mRNA 的表达不受 *mi* 突变的影响,这表明 MITF 对 TRAP 表达的调节作用是破骨细胞特有的。对 MITF 调控 TRAP 基因的表达最有说服力的证据来源于一个 TRAP-GFP 转基因小鼠的实验,在野生型小鼠的破骨细胞中 TRAP-GFP 的表达与内源性 TRAP 基因的表达是类似的,而在 *mi/mi* 突变的小鼠破骨细胞中 TRAP-GFP 的表达是降低的^[3]。总之,目前的实验结果可以证明 MITF 调控破骨细胞中 TRAP 基因的表达。MITF 调控系统给我们研究破骨细胞终末分化过程中的基因调控提供一个很好的切入点。理解相关基因是如何调控成熟的破骨细胞对我们研究相关人类疾病的分子发病机制有很大帮助,例如妇女绝经后的骨质疏松症或者或发生在多发性骨髓瘤患者身上的溶骨性骨质破坏和高钙血症^[12-14]。

2.2 MITF 调控破骨细胞中 Cathepsin K 的表达

Cathepsin K 是在破骨细胞中高度表达的半胱氨酸蛋白酶,对骨基质蛋白成分的降解起着至关重要的作用。它选择性的在破骨细胞介导的骨吸收中起特殊的作用,是介导破骨细胞引起骨吸收的重要因素。G. Motyckova 等人^[15]证实了 MITF 家族调控了破骨细胞中 Cathepsin K 的表达,因为与野生型小鼠比较,在 *mi/mi* 突变的小鼠破骨细胞中组织蛋白酶 K mRNA 和蛋白表达量都明显下降,当然,在 *mi/mi* 突变的小鼠破骨细胞中也能检测到少量 Cathepsin K mRNA 和蛋白的表达,这表明可能是除 MITF 以外其他家族成员也参与了破骨细胞中组织蛋白酶 K 的调控。Cathepsin K 启动子包含 4 个 E-box 元件普遍认为是 MITF 的结合位点,其中有 3 个在转录过程中与 MITF 家族有关。另外,与野生型 MITF 小鼠比较,患有骨硬化病的 MITF 突变等位基因小鼠的破骨细胞中组织蛋白酶 K 启动子的活性受到干扰^[16,17],G. Motyckova 等人^[15]的研究还表明

在体外培养的人源破骨细胞上,当破骨细胞核内 MITF 过表达时,破骨细胞中内源性 Cathepsin K mRNA 表达水平也会随之上调,进一步证明了 MITF 转录因子家族调控破骨细胞中 Cathepsin K 的表达。Cathepsin K 和 MITF 家族的关系可以帮助我们解释在致密性成骨不全症和骨硬化病患者身上所对应的缺陷症有表型重叠。

2.3 MITF 和 PU.1 共同调控破骨细胞中 OSCAR 的表达

OSCAR 是白细胞受体复合编码家族的一个新成员,在破骨细胞中特异性表达并调控破骨细胞的生成^[18]。白细胞受体复合家族的基因能够编码不同类型的免疫球蛋白样表面受体,并且在先天性和适应性免疫应答的调节中发挥了关键作用。与白细胞受体复合家族其他成员相反的是,OSCAR 的表达只能在破骨细胞的前体细胞和成熟的破骨细胞中检测到,这表明 OSCAR 可能在破骨细胞生成过程中发挥着重要作用^[18]。ETS 转录因子家族 PU.1 在造血细胞谱系优先表达并且在多种类型的细胞包括 B 细胞、巨噬细胞和破骨细胞的分化过程中起着关键性的作用^[19,20]。尽管 PU.1 的表达贯穿于野生型小鼠破骨细胞分化的各个阶段,但 PU.1 敲除的小鼠破骨细胞分化在早期就已经停止,最终导致了骨硬化病的发生。Hongseob So 等人^[21]证实了 MITF 和 PU.1 共同调控破骨细胞中 OSCAR 的表达,对于 MITF 和 PU.1 的协同作用,MITF 结合其在 OSCAR 启动子中的同源位点是关键,然而 PU.1 与其在 OSCAR 启动子中识别位点的结合是非必要的。此外,破骨细胞中 OSCAR 的表达进一步受到 RANKL/p38/MITF 信号通路的调控。

2.4 MITF 调控破骨细胞中 Clcn7 和 Ostml 的表达

Clcn7 是成熟破骨细胞皱褶缘中表达的主要氯离子通道蛋白^[22]。当细胞中 MITF 蛋白表达异常时,Clcn7 的表达也会受到影响。Clcn7 活性的破坏会导致小鼠和人患有严重的骨硬化病是由于破骨细胞不能分泌酸去溶解骨矿^[22,23]。包含有 Ostml 基因中的一个突变体在灰色致死 (GL) 小鼠和人的等位基因中其特点是都患有严重骨硬化症^[24]。Ostml 蛋白可以和 Clcn7 形成一个复合物并且被认为是活性 Clcn7 的 β -亚基^[25]。与 Ostml 突变相关的骨硬化表型可能是由于破骨细胞骨吸收腔隙中 Clcn7 依赖的酸化作用机制损伤所导致的^[25]。Nicholas A. Meadows 等人^[26]证实了在破骨细胞成熟分化过程中,MITF 调控了 Clcn7 和 Ostml 基因的表达。特别

是通过破骨细胞转染的荧光素酶报告基因检测并且结合电泳迁移率变动实验对 MITF 调控 Clcn7 和 Ostml 的启动子提供了有力的证明,同时染色质免疫沉淀实验证实了 MITF 结合了 Clcn7 的启动子。另外,Nicholas A. Meadows 等人^[26]也证实了在 mi/mi 突变小鼠的破骨细胞中 Clcn7 mRNA 的表达受到抑制,同时当破骨细胞中 MITF 蛋白过表达时,Clcn7 mRNA 的表达会随之上调。

2.5 MITF 调控破骨细胞中 E-cadherin 的表达

钙粘蛋白属于跨膜糖蛋白家族,是一种同亲型结合、Ca 依赖的细胞粘着糖蛋白^[27]。对胚胎发育的细胞识别、迁移和组织分化以及成体组织器官构成具有重要作用^[28]。E-钙粘蛋白属于钙粘蛋白家族成员之一,E-钙粘蛋白的表达发生在破骨细胞前体细胞融合为多核破骨细胞的过程中。在体外培养的破骨细胞分化过程中,添加抑制 E-钙粘蛋白的抗体或者拮抗合成肽可以阻止破骨细胞前体细胞融合为多核破骨细胞^[29]。Kim C. Mansky 等人^[30]证实与野生型小鼠比较,来源于 mi/mi 突变小鼠的体外培养的破骨样细胞中 E-cadherin mRNA 的表达水平明显降低。Kim C. Mansky 等人^[30]还证实了 MITF 可以和 E-钙粘蛋白序列的近端形成复合物并且 MITF 反式激活 E-钙粘蛋白启动子是通过一个保守的 E-box 样序列。

3 小结与展望

MITF 调控的基因对破骨细胞功能的影响有很大的关系,作为破骨细胞分化成熟的标记物像 TRAP、Cathepsin K、CLCN7、Ostml, E-cadherin 和 OSCAR 等,无论是在破骨细胞的骨吸收阶段还是在破骨细胞成熟的晚期阶段,MITF 都直接参与了这些基因的调控和表达。因此,MITF 调控系统为我们研究破骨细胞成熟分化过程中的一系列基因表达调控提供了一个非常有吸引力的模型。而了解这些基因在成熟的破骨细胞中是如何表达调控的将有助于我们阐明妇女绝经后的骨质疏松症、骨硬化病或者发生在多发性骨髓瘤患者身上的溶骨性骨质破坏和高钙血症等人类疾病的分子作用机制。鉴于此,探讨 MITF 在破骨细胞中的作用为我们深入研究破骨细胞功能的分子作用机制提供了很好的靶点和切入点,也为我们阐明与破骨细胞功能相关的疾病研究以及新药开发奠定了基础。

【参考文献】

[1] Hertwig P. Neue Mutationen und Kopplungsgruppen bei der

- Hausmaus. Z. Indukt. Abstammungsu. Vererbungsl, 1942, 80: 220-246.
- [2] Morleo M, Franco B. Microphthalmia with Linear Skin Defects Syndrome. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. Gene Reviews. Seattle (WA); University of Washington, Seattle; 1993-2009.
- [3] Luchin A, Purdom G, Murphy K, et al. The Microphthalmia Transcription Factor Regulates Expression of the Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Gene During Terminal Differentiation of Osteoclasts. J Bone Miner Res, 2000, 15(3): 451-460.
- [4] Hemesath TJ, Steingrímsson E, McGill G, et al. Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev, 1994, 8(22): 2770-2780.
- [5] Hughes MJ, Lingrel JB, Krakowsky JM, et al. A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. J Biol Chem, 1993, 268(28): 20687-20690.
- [6] Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic helix-loop-helix zipper protein. Cell, 1993, 74(2): 395-404.
- [7] Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia mi mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. Nat Genet, 1994, 8(3): 256-263.
- [8] Moore KJ. Insight into the microphthalmia gene. Trends Genet, 1995, 11(11): 442-448.
- [9] Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia MITF gene. Nat Genet, 1994, 8(3): 251-255.
- [10] Razdun HJ, Kreipe H, Parwaresch MR. Tartrate-resistant acid phosphatase as a differentiation marker for the human mononuclear phagocyte system. Hematol Onco, 1983, 1(4): 321-327.
- [11] Jin DI, Jameson SB, Reddy MA, et al. Alterations in differentiation and behavior of monocytic phagocytes in transgenic mice that express dominant suppressors of ras signaling. Mol Cell Biol, 1995, 15(2): 693-703.
- [12] Raisz LG. Mechanisms and regulation of bone resorption by osteoclastic cells. In: Coe FL, Favus MJ (eds). Disorders of Bone; Mineral Metabolism. 1992, Raven Press, New York, NY, U. S. A, 287-311.
- [13] Hall TJ, Chambers TJ. Molecular aspects of osteoclast function. Inflamm Res, 1996, 45(1): 1-9.
- [14] Reddy SV, Roodman GD. Control of osteoclast differentiation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1998, 8(1): 1-17.
- [15] Motyckova G, Weillbaecher K N, Horstmann M, et al. Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: Regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. PNAS, 2001, 98(10): 5798-5803.
- [16] Hemesath TJ, Steingrímsson E, McGill G, et al. microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. Genes Dev, 1994, 8(22): 2770-2780.
- [17] Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. Nat Gene, 1994, 8(3): 256-263.
- [18] Kim N, Takami M, Rho J, et al. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. J Exp Med, 2002, 195(2): 201-209.
- [19] Simon MC, PU. 1 and hematopoiesis: lessons learned from gene targeting experiments. Semin Immunol, 1998, 10(2): 111-118.
- [20] Singh H, DeKoter RP, Walsh JC. PU. 1, a shared transcriptional regulator of lymphoid and myeloid cell fates. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999, 64: 13-20.
- [21] So H, Rho J, Jeong D, et al. Microphthalmia Transcription Factor and PU. 1 Synergistically Induce the Leukocyte Receptor Osteoclast-associated Receptor Gene Expression. J Biol Chem, 2003, 278(26): 24209-24216.
- [22] Kornak U, Kasper D, Bosl MR, et al. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. Cell, 2001, 104(2): 205-215.
- [23] Campos-Xavier AB, Saraiva JM, Ribeiro LM, et al. Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. Hum Genet, 2003, 112(2): 186-189.
- [24] Ramirez A, Faupel J, Goebel I, et al. Identification of a novel mutation in the coding region of the grey-lethal gene OSTM1 in human malignant infantile osteopetrosis. Hum Mutat, 2004, 23(5): 471-476.
- [25] Lange PF, Wartosch L, Jentsch TJ, et al. ClC-7 requires Ostml as a beta-subunit to support bone resorption and lysosomal function. Nature, 2006, 440(7081): 220-223.
- [26] Meadows NA, Sharma SM, Faulkner GJ, et al. The Expression of Clcn7 and Ostml in Osteoclasts Is Coregulated by Microphthalmia Transcription Factor. J Biol Chem, 2007, 282(3): 1891-904.
- [27] Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science, 1991, 251(5000): 1451-1455.
- [28] Grunwald GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol, 1993, (5): 797-805.
- [29] Mbalaviele G, Chen H, Boyce BF, et al. The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclasts from mononuclear precursors in murine marrow. J Clin Investig, 1995, 95(6): 2757-2765.
- [30] Mansky KC, Marfatia K, Purdom GH, et al. The microphthalmia transcription factor (MITF) contains two N-terminal domains required for transactivation of osteoclast target promoters and rescue of mi mutant osteoclasts. J Leukoc Biol, 2002, 71(2): 295-303.

MITF在破骨细胞中的作用研究进展

作者:

[金小冬](#), [卢丽](#), [李青南](#), [JIN Xiaodong](#), [LU Li](#), [LI Qingnan](#)

作者单位:

[广东药学院生命科学与生物制药学院新药功能研究中心 广东省生物技术候选药物研究重点实验室, 广州, 510006](#)

刊名:

[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名:

[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年, 卷(期):

2014(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201405020.aspx