

低氧诱导因子-1 α 参与骨发育及骨代谢调控的研究进展

邵进 张岩 王治 杨铁毅*

上海市浦东新区公利医院骨科,上海 200135

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 02-0349-07

摘要: 低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是组织细胞在低氧状态下激活相应基因转录的核心调节因子之一,在骨发育和代谢过程中起到非常重要的作用。通过敲除 *Vhl* 基因高表达 HIF-1 α 可以促进血管和骨组织的生成,但这一过程的分子机制依然不明确。目前已知 HIF-1 α 在骨的发育过程中可以调节多种蛋白因子和信号通路,如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和经典 Wnt 信号通路,而这些蛋白因子和信号通路大多能对细胞的分化、增殖及功能进行调节。本文综述骨组织发育和代谢过程中 HIF-1 α 、Wnt 信号通路、骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 等所起的作用以及它们之间的联系,从而进一步探讨 HIF-1 α 在骨发育及骨代谢调控中的机制。

关键词: HIF-1; OPG; Wnt 信号通路; 骨发育; 骨代谢

Research progress of the regulatory mechanism of HIF-1 α in bone development and bone metabolism

SHAO Jin, ZHANG Yan, WANG Zhi, YANG Tieyi

Department of Orthopedics, Public Hospital of Pudong New District, Shanghai 200135, China

Corresponding author: YANG Tieyi, Email: yangtieyi@163.com

Abstract: Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is one of the master regulators of hypoxia reaction, which plays an important role in osteogenesis and bone metabolism. It is known that over-expression of HIF-1 α in mature osteoblasts through deletion of the von Hippel-Lindau (*Vhl*) gene profoundly increases angiogenesis and osteogenesis, but the molecular mechanism of this process is still unclear. It is known that HIF-1 α can regulate many protein factors and the activation of several signaling pathways, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and Wnt signaling pathway. These protein factors and signal pathways play essential roles in the regulation of cell differentiation, proliferation, and function. This review discusses the main function of HIF-1 α and its interaction with other protein factors or signaling pathways, including osteoprotegerin (OPG) and Wnt signaling pathway.

Key words: HIF-1; OPG; Wnt signaling pathway; Bone development; Bone metabolism

低氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIFs) 属于螺旋-环-螺旋 (bHLH) 转录因子家族,包括 3 种亚型 (HIF-1, HIF-2 和 HIF-3),目前的研究主要集中于 HIF-1 及其氧感应元件 HIF-1 α 。HIF-1 最初发现于低氧条件下培养的哺乳动物细胞,它是低氧条件下调控细胞内环境稳态的核心转录因子。HIF-1 α

在常氧条件下极不稳定,氧依赖降解结构域的脯氨酸容易发生羟化,并与 pVHL (protein Von Hippel-Lindau) 结合而被蛋白酶体降解。低氧或缺氧时, HIF-1 α 聚积并转运至细胞核内与 HIF-1 β 形成聚合体,激活对其敏感的靶基因转录,进而引起组织细胞一系列的耐氧适应性反应^[1]。文献报道 *Vhl*^{-/-} 即 HIF-1 α 高表达的小鼠表现为类似“石骨症”骨改建过程中的失衡征象,而 HIF-1 α 缺失个体则表现为新生小鼠体积变小,肢体短缩,软骨内化骨发育延迟。这说明 HIF-1 α 通路对于骨的发育和改建有重要的调节作用,但目前 HIF-1 α 是通过影响哪些蛋白因子或信号通路来实现对骨代谢的调节依然不清楚。

基金项目: 国家自然科学基金(81201367);浦东新区卫生系统重点学科建设资助项目(PWZx2014-09);浦东新区卫生系统学科带头人培养计划(PWRd2012-16);上海市自然科学基金(10ZR1427700)

* 通讯作者: 杨铁毅, Email: yangtieyi@163.com

本文将通过分析在骨发育和代谢过程中起重要作用的蛋白因子及信号通路,以及它们与 HIF-1 α 的联系来寻找新的线索。

1 HIF-1 α 与成骨作用

1.1 HIF-1 α 介导血管生成与骨生成之间的藕联

血管生成与骨生成在骨的发育过程中是相互藕联。这个过程的具体机制目前还没有完全阐明,但是可以确定组织的局部缺氧是一个重要的诱导因素。参与此调节过程的细胞因子很多,其中 VEGF 备受关注,它由条件性低氧激活并在介导血管生成与骨生成之间的藕联中起到至关重要的作用^[2,3]。

HIF-1 α 可以调控 VEGF 的表达。在骨生成之初,VEGF 由软骨细胞分泌释放到周边环境中并激活血管的生成,使血管侵入软骨组织中生长,为下一步骨的生成做准备。如果在动物实验中加入可溶性 VEGF 抗体,则软骨附近的血管生成被完全阻断,并且软骨组织体积增大而骨质量却有所下降^[4]。VEGF 对于生长板处的血管生成是必不可少的。Zelzer 等通过实验发现,在小鼠胚胎发育的第 13.5~14.5d,软骨膜细胞分泌的 VEGF 便可以起到募集血管的作用,并使血管在 14.5d 时侵入胫骨软骨组织中去。在只能分泌可溶性 VEGF₁₂₀ 但不能合成 VEGF₁₆₄ 和 VEGF₁₈₈ 亚型的小鼠中,软骨组织中血管的生成是延迟的。这一观察结果不仅进一步证明了 VEGF 起到募集血管并使之侵入软骨的作用,而且还说明 VEGF₁₆₄ 和 VEGF₁₈₈ 这两个亚型可能是特异性介导软骨组织血管生成的血管内皮生长因子^[5]。VEGF 的细胞合成不仅受到低氧因素的诱导还受到其它信号通路的影响,如前列腺素 E1/E2、转化生长因子 β 、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、成纤维细胞生长因子-2、类胰岛素生长因子-1、内皮素-1 和维生素 D3。值得注意的是,根据已有的报道这些蛋白因子均受到 HIF-1 α 通路的调控或影响。近期有研究表明,人为操控 HIF-1 α 通路可以造成 VEGF 和其它血管生成因子的过量合成与分泌,从而刺激长骨的血管生成,在有血管过度生长的长骨部位也伴随着过度活跃的骨生成现象^[6]。

1.2 HIF-1 α 高表达促进骨生成

Thomas 研究显示在 *Vhl* 基因敲除小鼠骨细胞中 HIF-1 α 含量明显上升,并且长骨的体积增大,但是颅盖骨的发育在该小鼠即 HIF-1 α 高表达个体中并没有受到影响^[7]。这个发现对于研究 HIF-1 α 很

有意义,但必须注意到 *Vhl*^{-/-} 个体的表型并不仅仅是 HIF-1 α 活性上升所引起。还有其它一些基因,如 HIF-2 α 的表达量也上升。相关实验也表明 *Hif*-1 α ^{-/-} 和 *Hif*-1 α ^{-/-} & *Vhl*^{-/-} 个体拥有不同的表型,进一步说明有其它蛋白因子在 *Vhl*^{-/-} 的长骨体积增加中起作用^[8,9]。

破骨细胞 (osteoclast) 行使骨吸收的功能,它与成骨细胞在功能上是相对立的。通过二者协同作用,才使骨骼的发育、生成及改建得以实现。在 *Vhl*^{-/-} 突变体中骨质量的增加很容易让人联想到是骨吸收能力缺失即破骨细胞数量或功能活性下降所造成的。但是实验数据却显示,在 3 周大的 *Vhl*^{-/-} 小鼠中破骨细胞的相对数量与对照组相比没有明显差异。骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 是破骨细胞的抑制因子,OPG 浓度测定显示在 *Vhl*^{-/-} 个体血清中骨保护素浓度与对照组相比没有变化。这说明在 *Vhl*^{-/-} 小鼠中骨质量增加并不是由骨吸收能力下降造成的^[7,9]。

2 成骨细胞-破骨细胞功能藕联所依赖的关键性信号通路

2.1 RANKL/RANK/OPG 信号通路

成骨与破骨细胞功能藕联是维持骨组织形态与功能稳定的关键因素。成骨细胞主要通过 RANKL/RANK/OPG 信号系统调控破骨细胞功能。目前,这个信号系统被认为是维持成骨细胞-破骨细胞功能藕联的主要信号通路^[10,11]。RANKL 属于肿瘤坏死因子 α 超家族,主要由成骨细胞/骨髓基质细胞分泌,可与破骨细胞前体细胞膜表达的肿瘤坏死因子受体超家族 I 型跨膜蛋白—RANK 结合,并在成骨细胞/骨髓基质细胞分泌的巨噬细胞集落刺激因子的协同作用下,激活相应的信号通路,诱导破骨细胞分化成熟。与此同时,成骨细胞/骨髓基质细胞分泌 RANKL 的诱饵受体-OPG,二者结合后阻碍 RANKL 和 RANK 相互作用,从而抑制破骨细胞的分化和功能(图 1)。若体内成骨细胞/骨髓基质细胞分泌的 RANKL/OPG 比率失衡,则可能产生骨硬化病、骨质疏松症等疾病^[12]。

RANKL/RANK/OPG 通路也受到其它信号通路的调节。某些由成骨细胞产生的细胞因子(如白介素-1 等),通过促进成骨细胞分泌 RANKL 而调节成骨细胞-破骨细胞功能藕联^[13];同时,一些与骨塑建、骨改建过程密切相关的信号通路,例如 Wnt/ β -catenin、Notch 信号通路等均可通过促进成骨细胞分

泌 OPG 而影响成骨细胞-破骨细胞功能耦联^[14]。因此,RANKL/RANK/OPG 信号系统是调控成骨细胞-破骨细胞功能耦联的关键性信号通路,RANKL 和 OPG 成为骨塑建和骨改建的核心调控因子。在低氧诱导下 RANKL/OPG 的比率发生变化,OPG 的表达量升高,并且骨吸收活性下降^[15]。然而,在 *Vhl*^{-/-} 个体中伴随着 HIF-1 α 和 HIF-2 α 的高表达,破骨细胞数量与活性没有受到影响,而且血清中 OPG 的含量也没有变化^[2]。

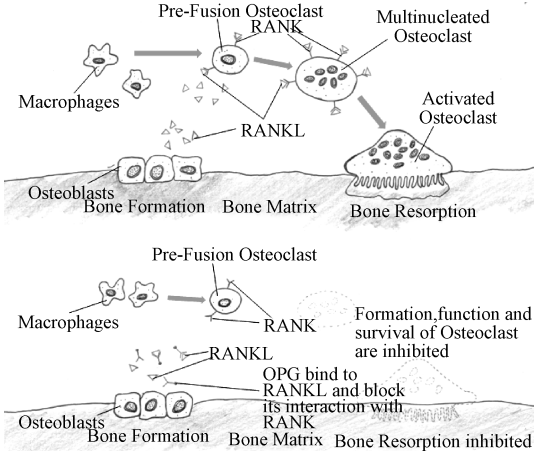


图1 RANKL/RANK/OPG 信号通路

Fig. 1 The RANKL/RANK/OPG signaling pathway

2.2 Eph/ephrin 介导的双向信号转导通路

通过细胞间相互作用,由 Eph 与 ephrin 介导的双向信号转导,已被证实参与诸多生物学行为并发

挥重要的作用,包括在骨改建、骨修复等^[16];正常骨组织中,表达成骨细胞膜的受体 EphB4 与表达破骨细胞膜的受体 ephrinB2 形成正逆双向信号转导通路^[17,18]。正向信号经过 EphB4 受体进入成骨细胞,抑制 RhoA 活性而促进成骨细胞分化,逆向信号经过 ephrinB2 受体进入破骨细胞,阻断 c-Fos 表达而抑制破骨细胞分化,从而调节成骨细胞-破骨细胞功能耦联^[19-24]。

3 Wnt 信号通路与骨发育的关系

3.1 Wnt 信号通路调节骨的形成与代谢

经典 Wnt 信号通路又称 Wnt/ β -catenin 信号通路(图 2),从生物的胚胎发育时期起在各种组织器官包括骨组织中,起着调控细胞增殖与分化的重要作用^[25, 26]。

经典 Wnt 信号通路在基因水平调节骨的质量。在过去的数十年内发现 4 种骨密度与骨质量异常的遗传疾病,其中 3 种疾病可出现骨质量上升,而另一类疾病却是骨质量下降,研究发现这 4 种遗传疾病均是经典 Wnt 信号通路异常所致。这四种遗传病中两类是发生在 *Lrp5* 基因上,这个基因编码 Wnt 的共受体 LRP5 (LDL-receptor-related protein),功能缺失型突变的病人有严重的假性骨质疏松症 (osteoporosis-pseudoglioma syndrome),而功能亢进型突变者则有比常人更高的骨密度与骨质量^[27-30]。这两个突变都是通过调节 SOST (SCLEROSTIN) 的

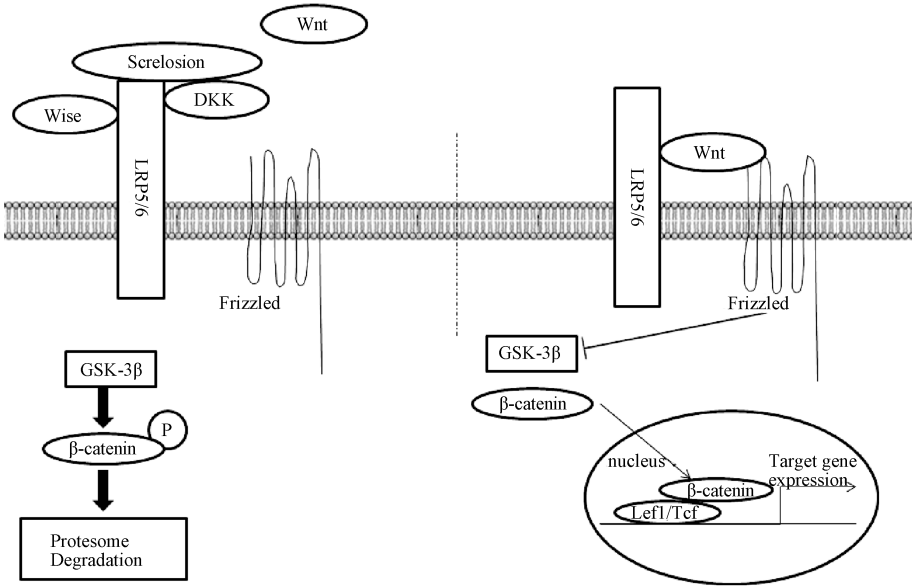


图2 经典 Wnt 信号通路示意图

Fig. 2 Diagram of the classical Wnt signaling pathway

表达来实现的。SOST 由骨细胞分泌,是 Wnt 的竞争性拮抗剂,它可以与 LRP5 或者 LRP4、LPR6 结合,从而阻断 Wnt 信号分子与这些受体的结合。骨组织中 SOST 缺失的病人往往患有硬化性骨化病和 Von Buchem 综合症^[31,32]。另一个 Wnt 的拮抗剂 dickopf1 (DKK1) 的功能缺失突变个体的表型与 SOST 缺失相似,也是骨质量的增加,说明 Wnt 信号通路在骨发育和代谢中起着重要的作用^[33, 34]。

经典 Wnt 信号通路即 Wnt/ β -catenin 通路可以促进成骨细胞的活性。在小鼠实验中条件性激活或下调 β -catenin 会相应地减少或促进骨吸收,这与在 Lrp5, Sost 等的突变体中观察到的表型并不完全一致。如果 β -catenin 是 Wnt 下游的唯一中心分子,那么它的活性上升或下降所造成的表型应该与 Lrp5、Sost 等的突变体一致,也就是说除了 β -catenin 外 Wnt 还可以调控其它分子通路。目前已知除了 Wnt/ β -catenin 通路外还有另外两条不依赖于 β -catenin 的非经典 Wnt 信号通路,它们是 Wnt/平面细胞极性 (Wnt/PCP) 信号通路 (图 3) 和 Wnt/钙离子 (Wnt/ Ca^{2+}) 信号通路^[35]。文献报道由 WNT5a 介导的 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路可以调节破骨细胞的分化与功能活性^[36],而 WNT7b 通过激活下游的蛋白激酶 C δ (PKC δ) 促进成骨细胞的分化^[37, 38]。

3.2 Wnt 信号通路在维持骨代谢平衡中的作用

经典的 Wnt 信号通路可以调节间充质细胞向

成骨细胞方向分化,而成骨细胞与骨细胞分泌的 Wnt 又可以通过 β -catenin 调节破骨细胞的形成。实验证明 OPG 的表达受到 Wnt 信号通路的间接调节,Wnt/ β -catenin 活性上升时 OPG 的合成与分泌都会上调^[39-41]。也有报道指出 Wnt/ β -catenin 对成骨细胞的影响并非想像中那样简单,因为在胚胎早期 Wnt/ β -catenin 促进破骨细胞的分化,而在后期 WNT3a 则起到抑制作用^[42, 43]。激活 WNT5a 介导的 Wnt/ Ca^{2+} 通路可能促进破骨细胞的分化,而 WNT7b 介导的 Wnt/PCP 通路却可以通过蛋白激酶 C δ (PKC δ) 诱导成骨细胞的分化^[44]。Wnt 信号对于骨代谢的调控是很复杂的。

通过对多种 Wnt/ β -catenin 通路缺陷型小鼠的研究发现,Wnt/ β -catenin 通路的缺陷均会造成骨生成能力下降,但是骨吸收能力是否受到影响却因突变体而异^[45, 46],Wnt/ β -catenin 信号通路中有一些分子可能与其它信号通路或蛋白因子相互作用,从而调节破骨细胞的数量或活性。

骨组织是通过骨细胞分泌的 Wnt 拮抗剂来抑制骨生成作用,这些抑制剂包括 SOST、WISE 和 DKK,它们能与 LRP5 或 LRP6 结合,从而阻断 Wnt 与受体结合,进而阻断信号的进一步传递。SOST 还可以与 LRP4 结合,增强其对经典 Wnt 通路的抑制作用^[31-33]; DKK1 可以与 LRP4 并且还可以与 Kremen 受体作用,这解释了为什么 DKK1 突变体中

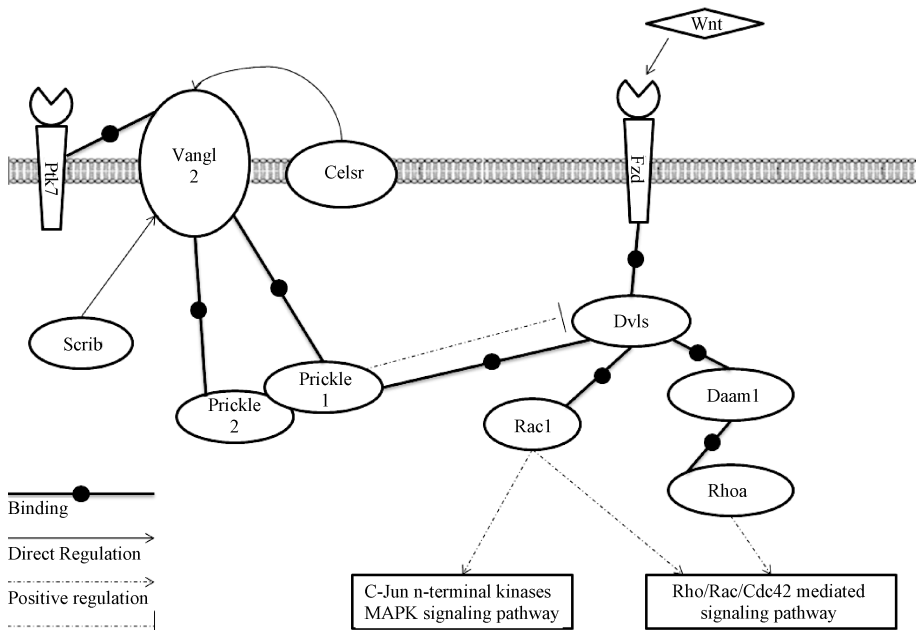


图 3 Wnt/PCP 信号通路示意图

Fig. 3 Diagram of the Wnt/PCP signaling pathway

除骨形成作用增加外还伴有骨吸收作用的下降,但其中的具体分子机制还有待研究。下调这些拮抗剂的浓度或抑制它们的活性均可以造成骨质量的增加。DKK2 也可以促进成骨细胞的成熟,有促进骨生成的作用^[33, 34]。DKK2 缺失会造成骨吸收作用上升,并且骨的矿物质化也会出现异常。

3.3 Wnt 信号通路与其它信号通路的互作及其对骨代谢的调控

Wnt 信号通路在骨组织中也与其它信号分子相互作用,其中与骨发育与代谢关系最密切的是甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)和骨形态发生蛋白(BMP)。PTH 可以促进骨形成,也能间接增强骨吸收,它是通过与 PTH 相关肽 I 型受体(PTH1R)结合而起作用的。PTH1R 是一种 G 蛋白耦联型受体,它在多种骨髓细胞均可表达,包括基质细胞、淋巴细胞和成骨细胞等。在骨组织中 PTH 与 Wnt/ β -catenin 信号通路相互作用,并可以调节 Wnt/ β -catenin 信号通路活性。PTH 与 Wnt/ β -catenin 的相互作用机制是多方面的:①PTH 可以下调 Wnt 拮抗剂的表达,如 Sost 和 Dkk1,并且 PTH 合成或分泌有缺陷的小鼠会有骨质疏松症^[47-49];②PTH 可以直接与 LRP6 相互作用,即使在没有 Wnt 的条件下,也可以在一定程度上激活 Wnt 下游通路^[50];③PTH 与其受体形成的复合物可以使 β -catenin 磷酸化从而稳定 β -catenin,进而上调 Wnt/ β -catenin 的活性^[51];④PTH 可以促进骨髓干细胞分化而来的 T 细胞旁分泌 WNT10b^[52],促进成骨细胞前体细胞的分化。

BMP 信号通路在骨发育、形成和修复过程中也起到至关重要的作用^[53],在动物体内 BMP 和 Wnt 信号之间的相互作用非常广泛但又极其复杂,它们既可以起协同作用又可以是拮抗作用,这取决于细胞类型和生物个体发育所处的时期,可以推断在骨组织中情况也是类似的^[54, 55]。敲除小鼠体内 *Noggin* 可以增加 BMP 的活性,骨形成受抑制,而骨密度减低^[56],可能是 BMP 抑制了 Wnt 通路活性。BMP 也可以通过抑制 Wnt 通路的拮抗剂来增强 Wnt 信号通路的活性^[57]。

4 HIF-1 α 和 Wnt 信号通路

在细胞实验中发现低氧诱导会导致 Sost 表达下降从而增强 Wnt 信号通路。Wnt 的竞争性抑制分子 Sost 通过与 Wnt 的受体竞争性结合从而抑制 Wnt 信号通路的活性。Sost 基因的突变或者是功能上的

缺失都会造成骨硬化性发育不良,这主要是由于经典 Wnt 信号通路活性过高引起的。低氧诱导可以使 UMR 106.01 细胞 β -catenin 下游报告基因表达,低氧诱导还可以上调 BMP 拮抗剂 *Gremlin* 和 *Noggin* 基因的转录水平,并且使 Smad-4/5/8 磷酸化水平降低,而无论是在正常氧分压还是在缺氧条件下调节 VEGF 信号通路都不影响 Sost 的表达^[57]。在低氧条件下细胞可能是通过增强 BMP 信号来实现对 Wnt 通路的调节,这是一个与 VEGF 相对独立的机制。低氧条件下成骨细胞核中的 β -catenin 含量增加并且伴有相应基因转录活性的上升。

在缺氧条件下 HIF-1 α 是抑制 Wnt 信号通路活性的,低氧诱导会使 Sost 的表达上升,并且 HIF-1 α 与 Osterix 协同作用共同抑制 Wnt 信号的活性^[58]。其原因:①体外实验并不能真实反应体内的情况;②所有实验都没有涉及真正的 HIF-1 α 高表达个体,而是通过低氧诱导来代表 HIF-1 α 高表达。实验中对对照组均为 21% 氧含量,而实验组为 1% 氧含量,低氧条件原本就不是一个正常状态,对细胞的影响也不可能只有 HIF-1 α 含量上升而已。这些实验中成骨细胞的分化增殖均受到抑制,也与 *Vhl*^{-/-} 个体中骨形成活性上升不吻合,HIF-1 α 究竟增强还是抑制 Wnt 信号通路目前还难以定论。

5 展望

Wnt 信号通路不仅本身发挥重要的作用,而且在 HIF-1 α 与其它通路间也可起到介导作用。RANKL 和 OPG 的表达量是受 Wnt 信号通路调控的^[10];Eph/ephrin 可以作用于 Wnt 信号通路^[59];HIF-1 α 高表达的小鼠即 *Vhl*^{-/-} 的表型为骨形成作用的增强,这一点也与在人体内 Wnt 信号通路活性增强的表型相似。这可能是由 HIF-1 α 通过 Wnt 通路再影响下游的 RANKL/RANK/OPG 或 Eph/ephrin 造成的。

关于 HIF-1 α 与 Wnt 通路相互矛盾的原因可能是:(1) Wnt 信号的作用十分广泛,它不仅有经典与非经典通路,其信号分子 WNT 亚型就有数十种,很难用一种模型将它们一一检测,并且在相同的通路中一些蛋白因子还可能与其它蛋白或通路相互作用,例如 β -catenin 就在细胞粘着中起到重要作用^[60]。(2) HIF-1 α 高表达模型存在缺陷,HIF-1 α 高表达是通过 *Vhl* 基因的敲除来实现的,但是 *Vhl*^{-/-} 缺失并不只上调 HIF-1 α 的表达量,HIF-2 α 的表达量也上升,其表型并非是由单一的 HIF-1 α 高表达所

致^[2]。在细胞实验中除了下调或敲除 *Vhl* 外,另一种高表达 HIF-1 α 的方法便是低氧诱导,其对细胞产生的影响更为复杂,并不是简单的 HIF-1 α 高表达而已。

目前可以明确的是在骨代谢中 HIF-1 α 可以影响 Wnt 信号通路的活性,然而真正明确 HIF-1 α 如何影响 Wnt 信号通路的机制依然是一个复杂而艰巨的工作。

鉴于 HIF-1 α 是一个转录因子,它会不会直接调节 OPG、RANKL 或 Eph 等的表达从而影响骨的形成与代谢? 进一步研究 HIF-1 α 在骨发育及骨代谢调控中的机制将有助于明确一些疾病的分子形成机制,为其防治提供理论依据。

【 参 考 文 献 】

- [1] Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia[J]. J Clin Invest, 2007, 117(4): 862-865.
- [2] Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development[J]. J Clin Invest, 2007, 117(6): 1616-1626.
- [3] De Francesco EM, Pellegrino M, Santolla MF, et al. GPER mediates activation of HIF-1alpha/VEGF signaling by estrogens [J]. Cancer Res, 2014 Jun 3. pii: canres.3590.2013. [Epub ahead of print]
- [4] Maes C, Carmeliet P, Moermans K, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188[J]. Mech Dev, 2002, 111(1-2): 61-73.
- [5] Zelzer E, McLean W, Ng YS, et al. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis [J]. Development, 2002, 129(8): 1893-1904.
- [6] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation[J]. Nat Med, 1999, 5(6): 623-628.
- [7] Wan C, Shao J, Gilbert SR, et al. Role of HIF-1 α in skeletal development[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1192(1): 322-326.
- [8] Mamede AC, Abrantes AM, Pedrosa L, et al. Beyond the limits of oxygen: effects of hypoxia in a hormone-independent prostate cancer cell line[J]. ISRN Oncol, 2013, 2013: 918207.
- [9] Fan L, Li J, Yu Z, et al. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 239356.
- [10] Mencej-Bedrac S, Zupan J, Mlakar SJ, et al. Raloxifene pharmacodynamics is influenced by genetic variants in the RANKL/RANK/OPG system and in the Wnt signaling pathway [J]. Drug Metabol Drug Interact, 2014, 29(2): 111-114.
- [11] Peng X, Guo W, Ren T, et al. Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e58361.
- [12] Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system [J]. Endocrinology, 2001, 142(12): 5050-5055.
- [13] Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation [J]. Histo Histopathol, 2009, 24(3): 337-346.
- [14] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin [J]. Arthritis Research & Therapy, 2007, 9(Suppl 1): S1.
- [15] Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009, 19(3): 197-218.
- [16] Del FA, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2012, 4: 2302-2321.
- [17] Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease[J]. Cell, 2008, 133(1): 38-52.
- [18] Edwards CM, Mundy GR. Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis[J]. Int J Med Sci, 2008, 5(5): 263-272.
- [19] Arthur A, Zannettino A, Panagopoulos R, et al. EphB/ephrin-B interactions mediate human MSC attachment, migration and osteochondral differentiation [J]. Bone, 2011, 48(3): 533-542.
- [20] Tamma R, Zallone A. Osteoblast and osteoclast crosstalks: from OAF to Ephrin [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012, 11(3): 196-200.
- [21] Hatziaepostolou M, Polytaichou C. Eph/ephrin system: in the quest of novel anti-angiogenic therapies [J]. Br J Pharmacol, 2014 Apr 13. doi: 10.1111/bph.12718. [Epub ahead of print]
- [22] Ende G, Poitz DM, Strasser RH, et al. The role of the Eph/ephrin-system in atherosclerotic plaque development: a complex puzzle[J]. Cardiovasc Pathol, 2014 Mar 27. pii: S1054-8807(14)00033-7. doi: 10.1016/j.carpath.2014.03.005. [Epub ahead of print]
- [23] Singh A, Winterbottom E, Daar IO. Eph/ephrin signaling in cell-cell and cell-substrate adhesion[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2012, 17: 473-497.
- [24] Matsuo K, Otaki N. Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases [J]. Cell Adh Migr, 2012, 6(2): 148-156.
- [25] Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila [J]. Nature, 1980, 287(5785): 795-801.
- [26] Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers[J]. Science, 1991, 251(4999): 1366-1370.
- [27] Tuysuz B, Bursali A, Alp Z, et al. Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: three novel mutations in the LRP5 gene and response to bisphosphonate treatment[J]. Horm Res Paediatr, 2012, 77(2): 115-120.
- [28] Little RD, Recker RR, Johnson ML. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5 [J]. N Engl J Med,

- 2002, 347(12): 943-944; author reply 943-944.
- [29] Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5 [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(20): 1513-1521.
- [30] Hofbauer LC, Maisch B, Schaefer JR. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5 [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(12): 943-944; author reply 943-944.
- [31] 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]. *J Exp Med*, 2004, 199(6): 805-814.
- [32] Loots GG, Kneissel M, Keller H, et al. Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease [J]. *Genome Res*, 2005, 15(7): 928-935.
- [33] Balemans W, Piters E, Cleiren E, et al. The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations [J]. *Calcif Tissue Int*, 2008, 82(6): 445-453.
- [34] Ai M, Holmen SL, Van Hul W, et al. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 4946-4955.
- [35] Santiago F, Oguma J, Brown AM, et al. Noncanonical Wnt signaling promotes osteoclast differentiation and is facilitated by the human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 223-230.
- [36] Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis [J]. *Nat Med*, 2012, 18(3): 405-412.
- [37] Niemann S, Zhao C, Pascu F, et al. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(3): 558-563.
- [38] Woods CG, Stricker S, Seemann P, et al. Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(2): 402-408.
- [39] Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(1): 27-38.
- [40] Bianco P. Minireview: The stem cell next door: skeletal and hematopoietic stem cell "niches" in bone [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(8): 2957-2962.
- [41] Glass DAN, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation [J]. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 751-764.
- [42] de Lau W, Barker N, Low TY, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling [J]. *Nature*, 2011, 476(7360): 293-297.
- [43] Lu W, Kim KA, Liu J, et al. R-spondin1 synergizes with Wnt3A in inducing osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(5): 643-650.
- [44] Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation [J]. *Dev Cell*, 2007, 12(1): 113-127.
- [45] Kramer I, Halleux C, Keller H, et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(12): 3071-3085.
- [46] Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(52): 20764-20769.
- [47] Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15(2): 60-65.
- [48] Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone [J]. *Bone*, 2005, 37(2): 148-158.
- [49] Bellido T, Ali AA, Gubrij I, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4577-4583.
- [50] Wan M, Yang C, Li J, et al. Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6 [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(21): 2968-2979.
- [51] Guo J, Liu M, Yang D, et al. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(2): 161-171.
- [52] Terauchi M, Li JY, Bedi B, et al. T lymphocytes amplify the anabolic activity of parathyroid hormone through Wnt10b signaling [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(3): 229-240.
- [53] Sieber C, Kopf J, Hiepen C, et al. Recent advances in BMP receptor signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(5-6): 343-355.
- [54] Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis [J]. *Stem Cell Rev*, 2007, 3(1): 30-38.
- [55] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(12): 3491-3501.
- [56] Canalis E, Brunet LJ, Parker K, et al. Conditional inactivation of noggin in the postnatal skeleton causes osteopenia [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(4): 1616-1626.
- [57] Genetos DC, Toupadakis CA, Raheja LF, et al. Hypoxia decreases sclerostin expression and increases Wnt signaling in osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(2): 457-467.
- [58] Chen D, Li Y, Zhou Z, et al. Synergistic inhibition of Wnt pathway by HIF-1 α and osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) in osteoblasts [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52948.
- [59] Zuo C, Huang Y, Bajis R, et al. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(6): 1653-1663.
- [60] Mbalaviele G, Shin CS, Civitelli R. Cell-cell adhesion and signaling through cadherins: connecting bone cells in their microenvironment [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(12): 1821-1827.