

· 综述 ·

R-spondins 调控 WNT/ β -catenin 信号通路的机制及其对骨骼系统的影响陈明洲¹ 李朝旭^{2*} 贵鹏² 刘继鸿¹ 王龙¹ 徐渠¹

1. 桂林医学院研究生学院, 广西 桂林 541004

2. 广西壮族自治区南溪山医院创伤手外科, 广西 桂林 541002

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 02-0298-05

摘要: R-spondins 是包含凝血酶敏感蛋白 1 型重复序列 [thrombospondin type 1 repeat (TSR-1)-containing proteins] 的结构域家族, 由四种分泌糖蛋白 R-spondin 1-4 组成。R-spondins 通过富含亮氨酸的 G 蛋白偶联受体 4/5/6 (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5/6, LGR4/5/6)、细胞表面跨膜 E3 泛素连接酶 ZNRF3 [(zinc and ring finger 3)/RNF43 (ring finger protein 43)]、硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)、包含 GTPase 激活蛋白 1 (IQ motif containing GTPase-activating protein 1, IQGAP1) 来增强 WNT/ β -catenin 信号通路, 进而在人类胚胎发育、组织和器官稳定、干细胞自我更新等方面发挥作用。近年来研究发现 R-spondins 参与胚胎骨发育、成体骨形成和骨关节炎疾病的发生发展, 对 R-spondins 的研究可能成为骨代谢疾病新的治疗方向。本文将对 R-spondins 增强 WNT/ β -catenin 信号通路的相关机制及其对胚胎骨发育、成体骨形成、骨质疏松和骨关节炎相关疾病的影响做一综述。

关键词: WNT/ β -catenin 信号通路; R-spondins; 骨骼发育; 成体骨代谢

The mechanism of R-spondins regulating WNT/ β -catenin signaling pathway and its effect on the skeletal systemCHEN Mingzhou¹, LI Zhaoxu^{2*}, GUI Peng², LIU Jihong¹, WANG Long¹, XU Qu¹

1. Graduate School of Guilin Medical College, Guilin 541004

2. Department of Orthopedics, Nanxishan Hospital, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002

* Corresponding author: LI Zhaoxu, Email: lizhaoxu@glmc.edu.cn

Abstract: R-spondins are a family of domains containing thrombospondin type 1 repeat (TSR-1)-containing proteins, which are composed of four secreted glycoproteins R-spondin 1-4. R-spondins pass through leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 4/5/6 (LGR4/5/6), cell surface transmembrane E3 ubiquitin ligase Zinc and Ring Finger 3 (ZNRF3) / Ring finger protein 43 (RNF43), heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), IQ motif containing GTPase-activating protein 1 (IQGAP1) and play a role in human embryo development, tissue and organ stability, and stem cell self-renewal. In recent years, it has been found that R-spondins are involved in embryonic bone development, adult bone formation and the occurrence and development of bone and joint diseases. The research on R-spondins may become a new treatment direction of bone metabolic diseases. In this paper, the mechanism of R-spondins enhancing WNT/ β -catenin signaling pathway and its effects on embryonic bone development, adult bone formation, osteoporosis and osteoarthritis related diseases were reviewed.

Key words: WNT/ β -catenin signaling pathway; R-spondins; skeletal development; adult bone metabolism

R-spondins 由 2002 年发现于 10~12 d 小鼠胚胎顶板和神经上皮表达的 R-spondin 1 及之后发现 R-spondin 2、R-spondin 3、R-spondin 4 组成, 对 R-

spondin 家族的作用一直存在着争议。随着 R-spondin 家族受体 LGR 4/5/6、ZNRF3/RNF43、HSPGs 和 IQGAP1 的发现, R-spondins 增强 WNT/ β -catenin 信号通路在胚胎发育、器官稳定、干细胞自我更新中的作用被予以证实。近来研究发现 R-spondins 通过 WNT/ β -catenin 信号通路调控骨髓间

基金项目: 国家自然科学基金 (81360400)

* 通信作者: 李朝旭, Email: lizhaoxu@glmc.edu.cn

充质干细胞、成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞参与胚胎骨发育、成体骨形成和骨关节疾病的发生发展,对 R-spondins 的研究可能成为骨代谢疾病新的治疗方向。本文将对 R-spondins 增强 WNT/ β -catenin 信号通路的相关机制及其对胚胎骨发育、成体骨形成、骨质疏松和骨关节炎的影响做一综述。

1 WNT/ β -catenin 信号通路

WNT 信号通路是指富含半胱氨酸的分泌糖蛋白 WNTs 家族与受体结合进而激活一系列细胞内级联反应的重要细胞通路^[1]。WNT 信号通路能协调多细胞生物胚胎发育、维持成体组织器官稳定,而异常的 WNT 信号通路与多种遗传性疾病、代谢性疾病、肿瘤等疾病密切相关^[2-3]。WNT 信号通路分为依赖 β -catenin 的 WNT/ β -catenin 信号通路(又称经典 WNT 通路)和不依赖 β -catenin 的非经典 WNT 通路。相比于 WNT/ β -catenin 信号通路,非经典通路更加复杂。主要包括 WNT/PCP (planar cell polarity) 通路、WNT/Ca²⁺ 通路和其他非 β -catenin/TCF 依赖的通路^[4-5]。

在 WNT/ β -catenin 信号通路中,对 β -catenin 的调控处于中心地位。腺瘤样结肠息肉蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC)、骨架蛋白 (axin)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 GSK3 (glycogen synthase kinase 3) 和 CK1 (casein kinase 1)、低密度脂蛋白 5/6 (low density lipoprotein receptor-related proteins 5/6, LRP5/6)、T 细胞因子 (T-cell factor, TCF) 转录因子均是 WNT/ β -catenin 信号通路的重要成员。

当无 WNTs 刺激时,胞质内的“破坏复合物”(由 APC/axin/GSK3 和 CK1 组成)中的 GSK3 和 CK1 会磷酸化 β -catenin,磷酸化的 β -catenin 会被蛋白酶体降解,WNT/ β -catenin 信号通路随之关闭。当存在 WNTs 刺激时,WNTs 与细胞膜上七次跨膜 Frizzled 受体和 LRP5/6 共受体同时结合,导致了“破坏复合物”解体,从而抑制 β -catenin 的降解,胞质内 β -catenin 增加,进而转移进入细胞核内与 TCF 转录因子结合,激活 WNT/ β -catenin 信号通路^[1-2]。

2 WNT/ β -catenin 信号通路调控蛋白 R-spondins

2.1 R-spondins 组成及结构特点

R-spondins 是包含 TSR-1 结构域的超家族成员,包括 R-spondin1、R-spondin 2、R-spondin 3 和 R-

spondin 4 四种分泌糖蛋白成员。这些蛋白的分子量大约为 35 kDa,它们 60 % 的氨基酸序列和保守结构区域是相同的,四种 R-spondin 都含有三个相似的特殊保守结构域:氨基末端的两个富含半胱氨酸的 Furin 结构域、TSR-1 结构域、羧基末端富含碱性氨基酸的结构域^[6]。TSR-1 结构域可能与蛋白多糖结合有关,两个 Furin 结构域则可分别与 ZNRF3/RNF43、LGR4/5/6 结合从而介导调控 WNT/ β -catenin 信号通路^[7]。

2.2 R-spondins 增强 WNT/ β -catenin 信号通路的相关机制

研究^[8]发现 LGR4/5/6 是 R-spondins 的高亲和受体。ZNRF3/RNF43 通过泛素化和后续的串联反应可降解 WNT 信号通路细胞表面 Frizzled 受体,发挥 WNT 信号通路的负反馈调节作用^[9-10]。

Hao 等^[11]提出了 R-spondins-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 信号传导单元调控 WNT/ β -catenin 信号通路的机制。WNTs 与 LRP4/5/6 受体和 Frizzled 共受体同时结合通过 WNT/ β -catenin 信号通路,使胞质内 β -catenin 增加,进而转移进入细胞核内与 TCF 转录因子作用,激活 ZNRF3/RNF43 基因表达 ZNRF3/RNF43 并转运至细胞膜上。当没有 R-spondins 存在时,细胞膜上的 ZNRF3/RNF43 通过胞质内的接头蛋白 (dishevelled, DVL) 识别 Frizzled 受体,诱导 Frizzled 受体泛素化和降解,从而抑制 WNT/ β -catenin 信号通路。当 R-spondins 存在时,R-spondins 与其受体 LGR4/5 和细胞膜 ZNRF3/RNF43 同时结合,诱导 ZNRF3/RNF43 泛素化和降解,进而阻断 Frizzled 受体泛素化和降解,增强 WNT/ β -catenin 信号通路^[8-11]。R-spondins-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 信号传导单元保证了 WNT/ β -catenin 信号通路稳定,参与维持消化道干细胞的自我更新和分化,促进消化上皮损伤修复和腺体再生^[12-14]。此外,在 ZNRF3/RNF43 降解的基础上,R-spondins-LGR4 还可以通过招募 IQGAP1 来诱导 LRP5/6 磷酸化增强 β -catenin 活性,提高 WNT/ β -catenin 信号通路调节细胞的黏附和迁移能力^[15]。

目前已经有相关报道^[16]发现 R-spondin1-4 在增强 WNT/ β -catenin 信号中对 LGRs 有不同的需求,特别是 R-spondin 2 和 R-spondin 3 在没有 LGRs 的情况下也能够增强 WNT/ β -catenin 信号通路。R-spondin 2/3 可通过与 HSPGs 和 ZNRF3/RNF43 相互作用,诱导细胞膜表面 ZNRF3/RNF43 降解来增加 Frizzled 受体积聚,增强 WNT 信号通路^[17]。在敲

除 LGRs 的体细胞中 R-spondin 2 和 R-spondin 3 仍可以增强 WNT 信号通路。在小鼠和爪蟾胚胎发生过程中,伴随着 LGR4、LGR5 和 LGR6 受体的丢失并不表现为 R-spondin 2 或 R-spondin 3 相关表型的丢失^[18]。以上报道各自独立而又相互证明了 R-spondin 2 和 R-spondin 3 或许不需要 LGR4/5/6 参与,发挥抑制 RNF43/ZNRF3 增强 WNT 信号通路的分子机制。在病理情况下,由于 R-spondins 基因融合突变、转录因子异常激活,R-spondins 通过上述机制中 LGR 4/ 5/6、ZNRF3/RNF43、HSPGs、IQGAP1 相关因子参与乳腺癌、结直肠癌、胃癌、肺癌、骨髓瘤等多种肿瘤的进程^[19-23]。

3 R-spondins 在骨骼发育和骨相关疾病中的作用

3.1 R-spondins 对胚胎骨发育的影响

R-spondins 广泛表达于小鼠颅面骨、四肢骨和躯干骨胚胎发育的各个时期^[7],R-spondin 2 基因敲除小鼠观察到其下肢远端趾骨和腓骨、上肢远节指骨和桡骨丢失同时伴有腭裂和颅面畸形,有趣的是相似的骨骼发育缺陷也出现在干扰 WNT/ β -catenin 信号通路的小鼠模型中,尽管 R-spondin 3 基因敲除小鼠无明显的骨骼异常,但在 R-spondin 2 和 R-spondin 3 双基因敲除的小鼠中检测到更严重的骨骼畸形,表明 R-spondin 2 和 R-spondin 3 在功能上有一定程度的重叠^[24]。Szenker-Ravi 等^[18]通过对 5 组人类家庭的 11 个肢体畸形胎儿的研究发现,R-spondin 2 基因突变的 4 个胎儿表现为桡骨、胫骨缺失伴或不伴肱骨、股骨发育不良,以及胚胎前轴侧手指缺失,其他 7 个胎儿表现为部分 Tetra-amelia 综合征(四肢完全缺失、肺发育不全、唇腭裂和唇腭沟发育不全),这与敲除小鼠 R-spondin 2 基因畸形相似。另外人类手掌、足跖部分区域皮肤角化过度异常增厚与 R-spondin1 基因的突变相关,R-spondin 4 基因错位与人类常染色体隐性疾病四肢指甲缺失高度相关^[6],这些过程最有可能通过激活 WNT/ β -catenin 信号通路实现。

3.2 R-spondins 对成体骨发育的影响

成骨细胞的成骨同破骨细胞的骨吸收之间保持平衡对成体骨的维持和重建至关重要,研究证实 WNT/ β -catenin 信号通路影响成骨细胞和破骨细胞的生物学行为,在骨合成代谢方面具有重要作用^[25]。Sharma 等^[26]发现在人类原代成骨细胞和人类成骨祖细胞系 FOB 1.19 细胞的分化过程中,R-

spondin1 表达增加。在 FOB 1.19 细胞中,敲除 R-spondin 1 导致碱性磷酸酶活性降低而转染 R-spondin1,通过激活 WNT/ β -catenin 信号通路促进成骨细胞分化,提高碱性磷酸酶活性。相似的结果在小鼠成骨细胞模型 MC3T3-E1 细胞(成骨前细胞系)中也得到证实。这些结果证明 R-spondin1 可能通过自分泌的形式促进体外成骨细胞的成骨活性。

Zhu 等^[27]发现 R-spondin 2-LGR4 通过激活 WNT/ β -catenin 信号通路,促进 MC3T3-E1 细胞(成骨前细胞系)的分化、成骨并能抑制破骨细胞的生成,而在小鼠 OVX 模型(雌激素缺乏导致进行性骨质疏松小鼠模型)体内试验中,外源性 R-spondin 2 改善了 OVX 小鼠胫骨近端的骨丢失和骨小梁结构,同时促进小鼠骨形成,增加骨质量。Knight 等^[28]则通过对 R-spondin 2 基因敲除导致肢体发育缺陷的小鼠模型以及构建完全敲除 R-spondin 2 基因的小鼠模型研究,发现 R-spondin 2 调节成骨细胞的生成和矿化,破坏 R-spondin 2 表达干扰骨骼矿物质沉积、骨骼形成,导致骨量减少和骨强度下降。另外破坏 R-spondin 2 小鼠特殊骨骼表型与干扰 LGR5/6 的 WNT/ β -catenin 信号通路表型相似,对敲除 R-spondin 2 小鼠的分析也发现了 WNT/ β -catenin 信号通路的抑制。

软骨细胞在软骨骨化过程中按静止软骨区域、增殖软骨细胞区域、软骨细胞成熟/肥大区域顺序分化,然后被成骨细胞取代。在增殖软骨区域的软骨细胞表达转录因子 Sox 9,分泌 II 型胶原(collagen type II,CII)和蛋白聚糖(aggrecan,Acan)等基质蛋白^[29],成熟/肥大区域的软骨细胞则表达另一个转录因子 Runx 2^[30]。Takegami 等^[31]发现 R-spondin 2 基因敲除的小鼠模型中软骨细胞的 β -catenin 的含量减少,而 Sox 9 和 CII 的含量增加。通过对 ATDC 5 软骨细胞系 R-spondin 2 的过表达和敲除对比研究,发现 R-spondin 2 激活 WNT/ β -catenin 信号通路抑制增殖软骨细胞 Col2a1、Sox 9、Acan 表达但不抑制成熟/肥大软骨细胞 Runx 2 表达。支持 R-spondin 2 激活软骨细胞 WNT/ β -catenin 信号通路促进软骨内成骨过程中增殖软骨细胞向肥大软骨细胞分化。体内外试验均表明 R-spondin 2 是一种有效的骨代谢正向调控因子。

Moayyeri 等^[32]通过对人类足跟骨定量超声和足跟骨平片全基因组相关研究的荟萃分析发现,R-spondin 3 基因与人类骨密度和骨折风险存在显著关联性,暗示 R-spondin 3 可能参与骨代谢。

3.3 R-spondins 对骨代谢疾病的影响

废用性骨质疏松症是由于骨骼缺少机械刺激而导致骨量减少,普遍存在于骨折固定、神经肌肉疾病或脊髓损伤等长期患肢制动的患者中^[33]。Shi 等^[34]发现 R-spondin 1 在骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的过程中动态表达,R-spondin1-LGR4 通过激活 WNT/ β -catenin 信号通路增强骨髓间充质干细胞成骨分化和骨形成。在体外连续循环机械拉伸(continuous cyclic mechanical stretch, CMS)机械刺激下,R-spondin 1 在小鼠骨髓间充质干细胞中表达增加,而在后肢悬吊(tail suspension, TS)机械刺激去除小鼠模型中 R-spondin 1 的表达下降。过表达 R-spondin 1 可显著改善 TS 小鼠的骨量丢失。R-spondin 1 是一种机械刺激敏感蛋白,R-spondin 1-LGR4 是潜在的防治废用性骨质疏松症的靶点。

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是以关节软骨的退行性变和关节周围继发性骨质增生为特征的慢性关节疾病,疼痛、功能障碍和畸形是其主要临床表现^[35]。Okura 等^[36]发现 OA 患者关节滑膜液中 R-spondin 2 含量随着 OA 的严重程度逐渐增加,米安色林可以通过抑制软骨细胞中 R-spondin 2 诱导的 WNT/ β -catenin 信号通路,改善和预防内侧半月板失稳膝关节 OA 小鼠模型关节软骨的降解。巨噬细胞是单核细胞进入外周组织后分化而来重要免疫细胞,不同局部微环境刺激巨噬细胞可分化成为具有不同功能的表型(即极化),包括 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞,它们在机体病原微生物与衰老细胞的清除、促进和抑制炎症反应、诱发适应性免疫反应及损伤组织的修复与重构都发挥重要作用^[37]。Zhang 等^[38]发现在 OA 患者和胶原酶诱导的骨关节炎(collagenase-induced osteoarthritis, CIOA)小鼠模型关节滑膜组织中,mTORC1 信号的激活增强了 M1 型巨噬细胞极化同时减弱 M2 型巨噬细胞极化,进一步研究发现 M1 巨噬细胞通过分泌 R-spondin 2,促进了关节软骨的退化、降解和骨赘生物的形成。诱导的 OA 在小鼠中的发展,证实 M1 巨噬细胞和 R-spondin 2 是 OA 治疗的潜在靶点。

4 结论与展望

随着 LGR4/5/6、ZNR3/RNF43、HSPGs、IQGAP1 的发现,R-spondins 增强 WNT/ β -catenin 信号通路的机制逐渐清晰。在骨骼系统中 R-spondins 在胚胎骨骼发育的各个阶段广泛表达,R-spondins

不但与人类四肢骨骼发育畸形和缺失密切相关,而且能够通过增强 WNT/ β -catenin 信号通路,促进增殖软骨细胞和成骨细胞分化、抑制破骨细胞的生成,有助于成体骨形成和维持骨密度,有力的证明了 R-spondin 家族是一种骨代谢正向调控因子。另外 R-spondin 1、R-spondin 2 参与废用性骨质疏松症、骨关节炎骨代谢疾病的发展,同时米安色林通过抑制 R-spondin 2 改善骨关节炎的进展,也显示出靶向 R-spondins 治疗骨丢失和骨关节炎等相关骨代谢疾病的潜力。

虽然 R-spondins 在骨组织中仍然有许多问题等待解决,包括 R-spondin 家族成员种类多样、功能影响复杂,对 R-spondins 调控 WNT/ β -catenin 信号通路的机制和相关因子仍需做进一步研究。但是对于 R-spondins 应用于骨合成代谢相关疾病治疗的前景依然值得期待。

【参考文献】

- [1] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.
- [2] Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease [J]. Cell, 2006, 127(3): 469-480.
- [3] Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1): 11-26.
- [4] Tocci JM, Felcher CM, Garcia Sola ME, et al. R-spondin-mediated WNT signaling potentiation in mammary and breast cancer development [J]. IUBMB Life, 2020, 72(8): 1546-1559.
- [5] Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(12): 767-779.
- [6] de Lau WB, Snel B, Clevers HC. The R-spondin protein family [J]. Genome Biol, 2012, 13(3): 242.
- [7] Knight MN, Hankenson KD. R-spondins: novel extracellular regulators of the skeleton [J]. Matrix Biol, 2014, 37: 157-161.
- [8] de Lau W, Barker N, Low TY, et al. Lgr 5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling [J]. Nature, 2011, 476(7360): 293-297.
- [9] Hao HX, Xie Y, Zhang Y, et al. ZNR3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner [J]. Nature, 2012, 485(7397): 195-200.
- [10] Koo BK, Spit M, Jordens I, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors [J]. Nature, 2012, 488(7413): 665-669.
- [11] Hao HX, Jiang X, Cong F. Control of Wnt receptor turnover by R-spondin-ZNR3/RNF43 signaling module and its dysregulation in cancer [J]. Cancers (Basel), 2016, 8(6): 54.
- [12] Yan KS, Janda CY, Chang J, et al. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem-cell self-renewal [J]. Nature, 2017, 545(7653): 238-242.

- [13] Harnack C, Berger H, Antanaviciute A, et al. R-spondin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4368.
- [14] Sigal M, Logan CY, Kapalczynska M, et al. Stromal R-spondin orchestrates gastric epithelial stem cells and gland homeostasis[J]. *Nature*, 2017, 548(7668):451-455.
- [15] Carmon KS, Gong X, Yi J, et al. RSPO-LGR4 functions via IQGAP1 to potentiate Wnt signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(13):E1221-1229.
- [16] Park S, Cui J, Yu W, et al. Differential activities and mechanisms of the four R-spondins in potentiating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(25):9759-9769.
- [17] Lebensohn AM, Rohatgi R. R-spondins can potentiate WNT signaling without LGRs [J]. *Elife*, 2018, 7:e33126.
- [18] Szenker-Ravi E, Altunoglu U, Leushacke M, et al. RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6 [J]. *Nature*, 2018, 557(7706):564-569.
- [19] Coussy F, Lallemand F, Vacher S, et al. Clinical value of R-spondins in triple-negative and metaplastic breast cancers [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(12):1595-1603.
- [20] Berger MD, Ning Y, Stintzing S, et al. A polymorphism within the R-spondin 2 gene predicts outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with FOLFIRI/bevacizumab: data from FIRE-3 and TRIBE trials[J]. *Eur J Cancer*, 2020, 131:89-97.
- [21] Zhang H, Han X, Wei B, et al. RSPO2 enhances cell invasion and migration via the WNT/ β -catenin pathway in human gastric cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4):5813-5824.
- [22] Wu L, Zhang W, Qian J, et al. R-spondin family members as novel biomarkers and prognostic factors in lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(4):4008-4015.
- [23] Ren Z, van Andel H, de lau W, et al. Syndecan-1 promotes Wnt/ β -catenin signaling in multiple myeloma by presenting Wnts and R-spondins[J]. *Blood*, 2018, 131(9):982-994.
- [24] Neufeld S, Rosin JM, Ambasta A, et al. A conditional allele of Rspo3 reveals redundant function of R-spondins during mouse limb development[J]. *Genesis*, 2012, 50(10):741-749.
- [25] Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, et al. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease[J]. *Gene*, 2012, 492(1):1-18.
- [26] Sharma AR, Choi BS, Park JM, et al. Rspo 1 promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway[J]. *Indian J Biochem Biophys*, 2013, 50(1):19-25.
- [27] Zhu C, Zheng XF, Yang YH, et al. LGR4 acts as a key receptor for R-spondin 2 to promote osteogenesis through Wnt signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(8):989-1000.
- [28] Knight MN, Karuppaiah K, Lowe M, et al. R-spondin-2 is a Wnt agonist that regulates osteoblast activity and bone mass[J]. *Bone Res*, 2018, 6:24.
- [29] Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox 9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox 5 and Sox 6[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(21):2813-2828.
- [30] Chen H, Ghorri-Javed FY, Rashid H, et al. Runx 2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(12):2653-2665.
- [31] Takegami Y, Ohkawara B, Ito M, et al. R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/ β -catenin signaling in endochondral ossification[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(1):255-264.
- [32] Moayyer A, Hsu YH, Karasik D, et al. Genetic determinants of heel bone properties: genome-wide association meta-analysis and replication in the GEFOS/GENOMOS consortium[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(11):3054-3068.
- [33] 陈阳, 马信龙, 马剑雄. 废用性骨质疏松症的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2013, 19(12):1286-1290.
- [34] Shi GH, Zheng XF, Zhu C, et al. Evidence of the role of R-Spondin 1 and its receptor Lgr4 in the transmission of mechanical stimuli to biological signals for bone formation[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):564.
- [35] 谢晚晴, 郑洪新. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路的中医药干预骨关节炎的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2018, 24(5):664-670.
- [36] Okura T, Ohkawara B, Takegami Y, et al. Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):2808.
- [37] Bashir S, Sharma Y, Elahi A, et al. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases[J]. *Inflamm Res*, 2016, 65(1):1-11.
- [38] Zhang H, Liu C, Zeng C, et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin 2[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(10):1524-1534.

(收稿日期: 2020-08-04;修回日期: 2020-09-07)