

破骨细胞形成抑制因子研究进展

何志勇^{1,2)} 李明峰²⁾* 张惟杰¹⁾ 吴祥甫²⁾**

(¹⁾上海交通大学生命科学与技术学院, 上海 200240; (²⁾中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 破骨细胞形成抑制因子 (OPG/OCIF) 是最近发现的一种参与调节骨密度的糖蛋白, 是一个肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族的新成员, 其氨基酸序列中具有 TNF 受体结构类似区。成熟的 OPG/OCIF 具有 7 个结构域, 可分为三个功能区, 即: TNF 受体结构区、致死结构区和肝素结合区。OPG/OCIF 基因定位在 8q23~24 上, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 其表达受到与骨的形成和破坏有关因子的调控: 如 TGF- β 1、1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ 、TNF- α 等等。OPG/OCIF 抑制骨的破坏和吸收机制主要是抑制破骨细胞的存活, 引起破骨细胞凋亡和抑制破骨细胞形成。

关键词 破骨细胞形成抑制因子, 肿瘤坏死因子受体超家族, 细胞凋亡

学科分类号 Q71

骨组织是一个包括细胞、基质和无机物的复杂组织, 其中存在着形成和破坏吸收的动态平衡。骨的形成由成骨细胞 (osteoblast) 来完成, 而骨的破坏和吸收则是破骨细胞 (osteoclast) 的功能。成骨细胞主要由骨髓干细胞分化而来, 破骨细胞则是从生血前体细胞分化形成。骨组织的动态平衡以及破骨细胞、成骨细胞的形成都受到整体激素和骨局部因子的严格调控。骨组织动态平衡的破坏则会引起骨质疏松症或骨质增生。

破骨细胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF 或称 osteoprotegerin, OPG)

是最近发现的一种可以调节骨密度的糖蛋白^[1,2]。

1 OPG/OCIF 是 TNF 受体超家族成员

OPG/OCIF 是最近发现的一种可以抑制破骨细胞形成的分泌型糖蛋白。用全长 cDNA 进行 RNA 印迹 (Northern blot) 分析表明, 在成人和胚胎中除了外周血淋巴 (PBL) 外, 都有 OPG/OCIF mRNA。在甲状腺、肾、心、脾和前列腺、肺、胎盘中表达较高。根据氨基酸序列同源性分析, OPG/OCIF 中存在着肿瘤坏死因子 (TNF) 受体结构类似区, 该区域富含半胱氨酸 (图 1)。

```

ETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPGTYLKQHCTAKWKTVCAPCPDHYTDSWHTSDECLYCSPIV
CKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLKHRSCPPGFGVVQAGTPERNVCKRCPDGFSS
NETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNATHDNICSGNSESTQKCGIDVTLCCEAFFRFAVPTKFT
(1)                                     ↑                                     (2)

PNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERIKWQHSSQEQTFLKLWKHQNKDQDIVKKIQQIDIDLCENSV
QWHIGHANLTFEQLRSLMESLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRKNGDQDTLKGML
HALKHSKTYHFPKTVTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL
↑                                     (3)
  
```

图 1 OPG/OCIF 的氨基酸序列

划线部分为 TNF 受体结构类似区。(1) OPG/OCIF N 端部分, 包括结构域 1~4, TNF 受体结构区;(2) OPG/OCIF C 端部分, 包括 2 个致死结构域 (结构域 5, 6); (3) 结构域 7 具有肝素结合功能, 其中 Cys400 与 OPG 形成同源二聚体有关。

OPG/OCIF 与其他 TNF 受体样分子的最大区别是, OPG/OCIF 不具有跨膜的疏水区域。大鼠和小鼠、大鼠和人的 OPG/OCIF 氨基酸序列同源性分别为 85% 和 94%, 说明 OPG 基因在进化过程是十分保守的, 这三者具有交叉活性^[1]。OPG/OCIF 蛋白具有五个潜在的糖基化位点。

成熟的 OPG/OCIF 共有 380 个氨基酸残基, 信号肽序列为 21 个氨基酸残基。经糖基化修饰后,

* 现工作单位中国人民解放军第四五五医院。

** 通讯联系人。

Tel: (021) 64374430, E-mail: xfwu@sunm.shenc.ac.cn

收稿日期: 1999-08-30, 修回日期: 2000-02-21

成熟的 OPG/OCIF 分子质量为 55~60 ku, 也可形成同源二聚体, 分子质量为 110~120 ku^[1,2]. OPG/OCIF 380 个氨基酸中, 共有 23 个 Cys, 可形成 9 对二硫键. 该蛋白质共可分为 7 个结构域^[3]. 这 7 个结构域形成三个功能区: a. TNF 受体结构区, 包括结构域 1~4, 即 4 个富含半胱氨酸的结构域. 这一结构区主要执行抑制破骨细胞形成的功能. 在切除其余几个结构域后, 该结构区仍具有抑制破骨细胞形成的功能. b. 致死结构区, 包括结构域 5 和 6, 即从 Cys195 到 Ser352, 具有致死结构域 (death domain) 结构特征. 当将 Fas 蛋白的跨膜区编码基因与致死结构区的两个结构域编码基因融合表达时, 融合蛋白具有很强的细胞毒性, 可以诱导细胞死亡, 其毒性明显比 Fas 蛋白强. 实验证明, OCIF/Fas 融合蛋白引起细胞死亡是一个凋亡过程, 也就是说, OCIF 的两个致死结构域具有潜在的诱导细胞凋亡的功能. c. 肝素结合结构区, 第 7 个结构域, 经突变研究证明这一结构域具有肝素结合功能. 肝素亲和功能与生长因子 (如基底细胞生长因子) 的功能有关. 但 OPG/OCIF 与肝素结合在体内有何生物学活性还是个未知的课题. 这个结构域中的 Cys400 与 OPG 形成同源二聚体有关. 利用基因突变去除 Cys400, 可使 OPG/

OCIF 不产生同源二聚体.

OPG/OCIF 还存在着一种变体, 其成熟肽只有 373 个氨基酸残基. 该编码基因中 Gln394 密码子 CAA 突变为 TAA 终止密码子. 缺失的 8 个氨基酸中包括了 Cys400, 经昆虫杆状病毒表达系统表达, 证明 OPG/OCIF 变体没有形成二聚体. 这一突变基因发现于中国人肝细胞株 L02 和胎盘中克隆的 cDNA, 以及加拿大 Graham 等建立的 293 细胞株 (ATCC CRL 1573) 的基因组 DNA 中^[4].

OPG/OCIF 在体内还有明显的降血钙功能. 在正常、卵巢切除以及甲状腺切除的大鼠中都具有降血钙功能^[1,5]. 这一现象可能是抑制骨的破坏和吸收所致.

2 OPG/OCIF 基因结构

OPG/OCIF 基因是具有 5 个外显子的单拷贝基因, 定位在 8 q23~24 上, 总长 29 kb. 所有的外显子和内含子边界都遵循 GT/AG 规则. 在第 5 个外显子中, 存在着终止密码子和 AATAAA poly (A) 信号. OPG/OCIF 基因具有三个不同的转录起始位点, 即 -67, -646 和 -667, 绝大多数 mRNA 都从 -67 位点开始转录^[6].

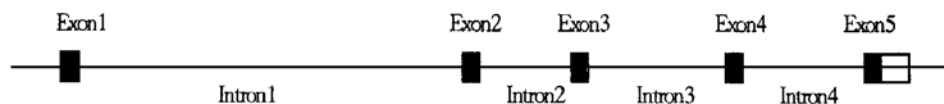


图 2 OPG/OCIF 基因结构图解

3 OPG/OCIF 的调控

3.1 转化生长因子 $\beta 1$ 对 OPG/OCIF 表达的调控

转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 是一种与抑制肿瘤细胞转移有关的蛋白, 同时也可以抑制骨的破坏和吸收. 它在骨的微环境中的这一作用是否与 OPG/OCIF 有关呢? 事实证明 TGF- $\beta 1$ 确实与 OPG/OCIF 基因表达有关, 即通过对 OPG/OCIF 基因的正调控, 促进破骨细胞的形成与活化. TGF- $\beta 1$ 对 OPG/OCIF 基因表达的调控主要有短暂性、剂量效应、无需合成新的蛋白质、增加 OPG/OCIF mRNA 的稳定性、最终分泌产物的增加等特点^[7,8].

TGF- $\beta 1$ 是由成骨细胞产生, 具有刺激骨基质蛋白的合成和分泌, 抑制基质矿质化, 并调节成骨细胞的形成和分化. 而另一方面 TGF- $\beta 1$ 抑制破骨

细胞的形成和分化, 这一功能可能 (或部分) 与刺激 OPG/OCIF 的表达有关.

3.2 1, 25-二羟基维生素 D_3 对 OPG/OCIF 的调控

1, 25-二羟基维生素 D_3 ($1, 25 (OH)_2VD_3$) 具有促进成骨细胞形成和分化的作用, 实验证明 $1, 25 (OH)_2VD_3$ 在 $10^{-11} \sim 10^{-7}$ mol/L 剂量范围内, 可促进成骨细胞的 OPG/OCIF 表达量, 但对未分化的成骨细胞前体细胞却无此效应^[9].

3.3 细胞因子对 OPG/OCIF 的调控

在检查各种白介素 (包括 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-11); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 以及骨形成蛋白 2 (BMP2) 等对成骨细胞中 OPG/OCIF 表达的调控时发现, IL-1 β (5×10^{-9} mol/L)、BMP2 (100 μ g/L) 以及 TNF- α (9×10^{-9} mol/L) 等均能促进成骨细胞的 OPG/OCIF 表达, 而 IL-4、IL-6、IL-11 等细胞因子不影响成骨细胞中 OPG/OCIF

mRNA 的量。

3.4 前列腺素 E₂ 对 OPG/OCIF 的调控

前列腺素 E₂ (PGE₂) 在多方面作用于骨的破坏和吸收, 如促进骨的吸收以及通过 cAMP 途径加快破骨细胞形成等。而且其他生长因子和细胞因子对破骨细胞分化的作用有赖于 PGE₂ 的合成。Brandstrom 等^[10]在人骨髓干细胞 (hBMSC) 的培养中, 证明了 PGE₂ 具有明显降低 OPG/OCIF 表达的作用。PGE₂ 对 hBMSC 中 OPG/OCIF mRNA 水平的作用呈时间和剂量效应。

3.5 糖皮质激素对 OPG/OCIF 的调控

糖皮质激素是促进骨的破坏和吸收的一种体内激素。在以人骨髓瘤细胞株和破骨细胞瘤细胞株为模型的研究中发现, 糖皮质激素在 10⁻⁶ mol/L 的浓度时, 2 h 内即可明显降低细胞内 OPG/OCIF mRNA 的量, 但在 24 h 后又恢复到原来的水平^[11]。

从以上调控因子我们可以看出, 一些调节骨的形成和破坏的因子, 大多数与 OPG/OCIF 的表达有关。说明 OPG/OCIF 在骨的形成和破坏的动态平衡调节中起着十分重要的作用。有可能这些体内激素和细胞因子是通过 OPG/OCIF 起作用, 即这些体内激素和细胞因子在骨的微环境中, 通过调节 OPG/OCIF 的表达量, 从而调节破骨细胞和成骨细胞的相对数量。最终影响到骨的形成和破坏、吸收。因此对骨的形成起促进作用的因子表现为对 OPG/OCIF 正调控, 如 TGF-β1。而对骨的破坏起促进作用的因子, 则表现为对 OPG/OCIF 的负调控, 如 PGE₂。

4 OPG/OCIF 的作用机理

OPG/OCIF 抑制骨的破坏和吸收的机理, 主要可从两方面来解释。

4.1 OPG/OCIF 引起破骨细胞的凋亡

OPG/OCIF 在处理大鼠时, 发现破骨细胞数量减少, 其中一方面的原因是 OPG/OCIF 抑制破骨细胞的形成, 另一方面则是由于 OPG/OCIF 能够引起破骨细胞凋亡。用 4~100 μg/L 的 OPG/OCIF 处理破骨细胞时, 就会明显减少破骨细胞数量。利用 Caspase-1 和 Caspase-3 的抑制剂处理培养在含有 OPG/OCIF 的培养基中的破骨细胞, OPG/OCIF 的作用可被 Caspase-3 的抑制剂逆转, 但不能被 Caspase-1 的抑制剂逆转, 证明了 OPG/OCIF 引起破骨细胞的死亡是一个凋亡过程^[12]。

4.2 OPG/OCIF 抑制破骨细胞形成

破骨细胞的形成和分化受到双重因子的控制, 即破骨细胞分化因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) 和破骨细胞形成抑制因子 (OPG/OCIF)^[13]。ODF 是 OPG/OCIF 的一个配体, 因此也称 OPGL。ODF 可以通过膜上受体 RANK (receptor activator of NF-κB) 引起破骨细胞前体细胞分化形成成熟的破骨细胞^[14]。ODF 也具有活化成熟破骨细胞的功能^[15]。OPG/OCIF 在细胞外与 ODF 结合, 阻止 ODF 与前体细胞膜上受体 RANK 结合, 从而阻断 ODF 的作用, 使前体细胞不再分化。

5 展 望

OPG/OCIF 作为一种新发现的蛋白质, 具有很高的研究意义和开发价值。OPG/OCIF 的很多方面的研究还有待于进一步深入, 如 OPG/OCIF 抑制破骨细胞分化的详细机制; OPG/OCIF 引导破骨细胞凋亡的信号途径; OPG/OCIF 的肝素结合功能的生物学意义; 及其在骨微环境中的具体作用等等。OPG/OCIF 也可作为一种药物, OPG/OCIF 能防止摘除卵巢的大鼠中骨质的流失, 因此对中老年妇女常见的骨质疏松症可能具有预防和治疗作用。OPG/OCIF 还具有降血钙的功能, 对高血钙症可能也有治疗作用。

参 考 文 献

- 1 Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, **89** (3): 309~319
- 2 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 1998, **139** (3): 1329~1337
- 3 Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, *et al.* Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*, 1998, **273** (9): 5117~5123
- 4 何志勇, 杨冠珍, 张惟杰, 等. 新 OPG/OCIF 变体基因的克隆及其表达. *生物化学与生物物理学报*, 1999, **31** (6): 680~684
He Z Y, Yang G Z, Zhang W J, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sinica*, 1999, **31** (6): 680~684
- 5 Yamamoto M, Murakami T, Nishikawa M, *et al.* Hypocalcemic effect of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology*, 1998, **139** (9): 4012~4015
- 6 Moronaga T, Nakagawa N, Yasuda H, *et al.* Cloning and characterization of gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *Eur J Biochem*, 1998, **254** (3): 685~691

- 7 Takai H, Kanematsu M, Yano K, *et al.* Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 1998, **273** (42): 27091~ 27096
- 8 Murakami T, Yamamoto M, Yamamoto M, *et al.* Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **252** (3): 747~ 752
- 9 Hofbauer L C, Dunstan C R, Spelsberg T C, *et al.* Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein 2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250** (3): 776 ~ 781
- 10 Brandstrom H, Jonsson K B, Ohlsson C, *et al.* Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247** (2): 338~ 341
- 11 Vidal N O, Brandstrom H, Jonsson K B, *et al.* Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol*, 1998, **159** (1): 191 ~ 195
- 12 Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, *et al.* Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **250** (2): 229~ 234
- 13 Filvaroff E, Derynck R. Bone remodelling: a signalling system for osteoclast regulation. *Curr Biol*, 1998, **8** (19): R679~ 682
- 14 Hsu H, Lacey D L, Dunstan C R, *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (7): 3540~ 3545
- 15 Burgess T L, Qian Y, Kaufman S, *et al.* The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*, 1999, **145** (3): 527~ 538

Recent Advance in Osteoclastogenesis Inhibitory Factor. HE Zhi-Yong^{1,2)}, LI Ming-Feng²⁾, ZHANG Wei-Jie¹⁾, WU Xiang-Fu²⁾ (¹⁾ College of Life Sciences and Technology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; ²⁾ Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract Osteoclastogenesis inhibitory factor or osteoprotegerin (OPG/OCIF) is a novel secreted glycoprotein involved in the regulation of bone density. It is a novel member of the TNF receptor superfamily. Mature OPG/OCIF contains 7 domains and can be divided into 3 regions (TNF receptor cysteine-rich region; death domain region and heparin binding region). The OPG/OCIF gene is a single-copy gene consisting of five exons and four introns. It is located in 8q23~ 24. The factors involved in the regulation of bone formation and resorption (eg. TGF- β 1, 1, 25 (OH) $_2$ VD $_3$ and TNF- α) regulate the expression of OPG/OCIF gene. The mechanisms by which OPG/OCIF inhibits bone resorption can be concluded that: 1) OPG/OCIF inhibits survival of osteoclasts and induces apoptosis of osteoclasts; 2) OPG/OCIF inhibits formation of osteoclasts.

Key words osteoclastogenesis inhibitory factor, TNF receptor superfamily, apoptosis

真核 mRNA 3' 非翻译区的肿瘤抑制功能和表达调控*

刘定干

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 最近几年来, 关于真核 mRNA 3' UTR 在肿瘤细胞恶性表型抑制中作用的研究, 取得了非常令人鼓舞的进展。目前已经发现, 3' UTR 参与一些已知的癌基因和抗癌基因的功能调控; 一些抗癌基因的失活来源于其 3'-UTR 的结构变化; 而且又发现了一些基因的 3' UTR 在转染恶性细胞后表现抗癌基因活性。此外, 3' UTR 在 mRNA 表达调控中的作用也已研究得更加深入。现将最近几年来在这一领域的一部分研究进展情况, 作一简单综述。

关键词 肿瘤抑制, 表达调控, 3' 非翻译区

学科分类号 Q341, Q75

* 国家 863 计划 863-102-11-03-04 项目资助。 Tel: (021) 64374430-340, E-mail: liudiga@sunm.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-09-07, 修回日期: 1999-12-24