



R-spondin2 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路的机制及其对骨骼系统的影响*

晋俊杰¹⁾ 李 晶^{1,2)} 胡广璇¹⁾ 吴若萌¹⁾ 衣雪洁^{1)**}⁽¹⁾ 沈阳体育学院运动健康学院, 沈阳 110102; ⁽²⁾ 辽宁师范大学体育学院, 大连 116029

摘要 R-spondin2 (Rspo2) 是蛋白质家族 RSPOs 成员之一, 其可以通过富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 4/5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4/5, LGR4/5)、细胞表面跨膜 E3 泛素连接酶 ZNRF3/RNF43 (zinc and ring finger 3/ring finger protein 43)、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) 和含 GTP 酶激活蛋白 1 的 IQ 基序 (IQ motif-containing GTPase-activating protein 1, IQGAP1) 来调控 Wnt/ β -catenin 信号通路, Wnt/ β -catenin 信号通路是目前研究最广泛且与基础骨生物学直接相关的信号通路, 该通路中任何一环节出现问题都可能对骨的调控产生影响。近年来研究发现, Rspo2 可以通过 Wnt/ β -catenin 对成骨细胞 (osteoblast, OB)、破骨细胞 (osteoclast, OC) 和软骨细胞产生作用, 并参与一些骨骼疾病如脊柱后纵韧带骨化 (ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL)、骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 和类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的发生发展, 因此对 Rspo2 的研究可能会成为骨相关疾病新的治疗方向。本文结合最新研究进展, 就 Rspo2 的结构和主要功能、Rspo2 调控 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关机制及其对骨骼系统的影响作一综述, 以期对骨相关疾病的防治提供新的思路和途径。

关键词 R-spondin2, Wnt/ β -catenin 信号通路, 成骨细胞, 破骨细胞, 软骨细胞

中图分类号 R681, R34

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0100

R-spondin2 (Rspo2) 是 RSPOs 家族中的一员, 该家族是一类富含半胱氨酸的分泌蛋白^[1]。近年来, 大量研究发现, Rspo2 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、成骨细胞 (osteoblast, OB)、破骨细胞 (osteoclast, OC) 和软骨细胞等参与成体骨形成和骨骼疾病的发生发展, 对 Rspo2 的研究可能成为一些骨骼疾病新的治疗方向。本文将对 Rspo2 增强 Wnt/ β -catenin 信号通路的相关机制及其成体骨形成以及相关骨骼疾病的影响进行综述。

1 Rspo2 的发现和蛋白质结构

RSPOs 家族有 4 个成员 (Rspo1~Rspo4), Rspo2 是 2004 年在非洲爪蟾体中被 Kazanskaya 等^[2]首次发现, 它存在于所有脊椎动物及部分无

脊椎动物中^[3-4]。Rspo2 可通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路来发挥其生物学功能。

Rspo2 蛋白长度为 243 个氨基酸, 其氨基酸序列在脊椎动物中具有高度保守性。其包含 4 个主要结构域^[1]: a. 1 个 N 端富含疏水氨基酸的信号肽 (signal peptide, SP) 序列; b. 2 个相邻富含半胱氨酸的弗林蛋白酶样 (furin-like cysteine-rich, FU-CR) 的结构域; c. 1 个含有血小板反应蛋白 1 型重复 (thrombospondin type I repeat, TSR) 序列的结构域; d. 1 个 C 端带正电负电荷富含碱性氨基酸 (basic amino acid-rich, BR) 的结构域 (图 1)。每个结构域都有不同的功能, 其中, SP 用于引导 Rspo2 分

* 国家自然科学基金 (12072202) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 15940278868, E-mail: yixuejie8387@163.com

收稿日期: 2023-03-24, 接受日期: 2023-06-25

泌到胞外。FU-CR1与锌指环指蛋白3/环指蛋白43 (zinc and ring finger 3/ring finger protein 43, ZNRF3/RNF43) 相互作用, FU-CR2与富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体 (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptors, LGRs) 相互作用, 2个FU-CR都可以增强Wnt信号传导^[4], 是Rspo2蛋白结构中最保守的区域。FU-CR和TSR与Rspo2的分泌水平和结合受体能力密切相关。

TSR可能与黏结蛋白聚糖 (syndecans) 相互作用, BR可能与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) 相互作用, 二者共同发挥作用使Rspo2可以结合细胞膜表面和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)^[4], 从而很难检测到游离Rspo2蛋白。并且TSR和BR结构域影响RSPO激活的强度, 其缺乏会降低Wnt/ β -catenin信号通路传导的效率^[5]。

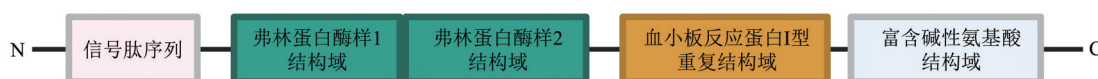


Fig. 1 The structural diagram of Rspo2 protein (created with BioRender.com)

图1 Rspo2蛋白结构图 (使用BioRender.com绘制)

2 Rspo2与经典Wnt/ β -catenin通路的关系

随着RSPOs家族受体LGR4/5/6、ZNRF3/RNF43、含GTP酶激活蛋白质1的IQ基序 (IQ motif-containing GTPase-activating protein 1, IQGAP1) 和HSPGs的发现, RSPOs通过Wnt/ β -catenin信号通路发挥其生物学功能的作用被证实。

2.1 Wnt/ β -catenin信号通路概述

Wnt信号通路在胚胎发育和组织内稳态中起重要作用, 调控许多生命过程, 包括免疫、应激、细胞癌变、细胞凋亡、细胞形态与功能的分化及维持, 是细胞生物学和分子生物学研究的一大热点。

Wnt信号通路主要包括3条途径^[6]: a. β -catenin介导的经典途径; b. JNK介导的Planer细胞极性 (PCP) 途径; c. Ca^{2+} 介导的Wnt/ Ca^{2+} 途径。其中Wnt/ β -catenin通路, 即经典Wnt信号通路研究最为深入。Wnt/ β -catenin通路的主要成分包括: 配体 (Wnt家族分子)、跨膜受体 (卷曲蛋白 (frizzled, Fzd) 家族分子和低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6 (low density lipoprotein receptor-related protein, LRP5/6))、胞浆调节蛋白 (蓬乱蛋白 (dishevelled, Dsh/Dvl)、肠腺瘤样息肉蛋白 (adenomatous polyposis coli, APC)、轴蛋白 (Axin)、糖原合成酶激酶3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β))、 β -catenin等) 以及核转录因子 (T细胞因子/淋巴增强因子 (Tcf/Lef) 家族)

等。Wnt配体与细胞膜上Fzd和LRP5/6共受体相结合形成Wnt-Fzd-LRP5/6复合体, 招募Dsh/Dvl, 使LRP5/6磷酸化并活化, 继而招募APC、Axin、GSK-3 β 与 β -catenin形成的复合体, 抑制复合体中GSK-3 β 对 β -catenin的磷酸化作用, 未磷酸化的 β -catenin在细胞质内大量聚积^[7]并转运至细胞核中, 结合Tcf/Lef因子形成转录激活复合体, 激活下游特定靶基因的转录^[8-9] (图2)。

2.2 Rspo2对Wnt/ β -catenin信号通路的调控机制

Wnt/ β -catenin通路在不同的生物学过程中起着重要作用, 例如胚胎发育、调节间充质细胞分化和骨生理学等。Hao等^[10]提出Rspo2调控Wnt/ β -catenin通路机制: RSPOs-富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体4/5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4/5, LGR4/5)-ZNRF3/RNF43信号传导单元调控Wnt/ β -catenin通路 (图3)。LGR4/5是Rspo2的高亲和受体^[11], ZNRF3/RNF43是通过泛素化和后续串联反应降解经典Wnt信号通路细胞膜上Fzd受体, 发挥经典Wnt信号通路的负反馈调节作用^[12-13]。Wnt蛋白可以与Fzd受体和LRP5/6共受体结合激活经典Wnt通路, 胞质内 β -catenin聚积后转移进入细胞核与Tcf转录因子作用, 激活ZNRF3/RNF43基因表达产生相应蛋白质并转运至细胞膜上。当没有Rspo2存在时, ZNRF3/RNF43通过Dvl识别Fzd, 诱导Fzd泛素化和降解, 从而抑制Wnt/ β -catenin通路; 而当

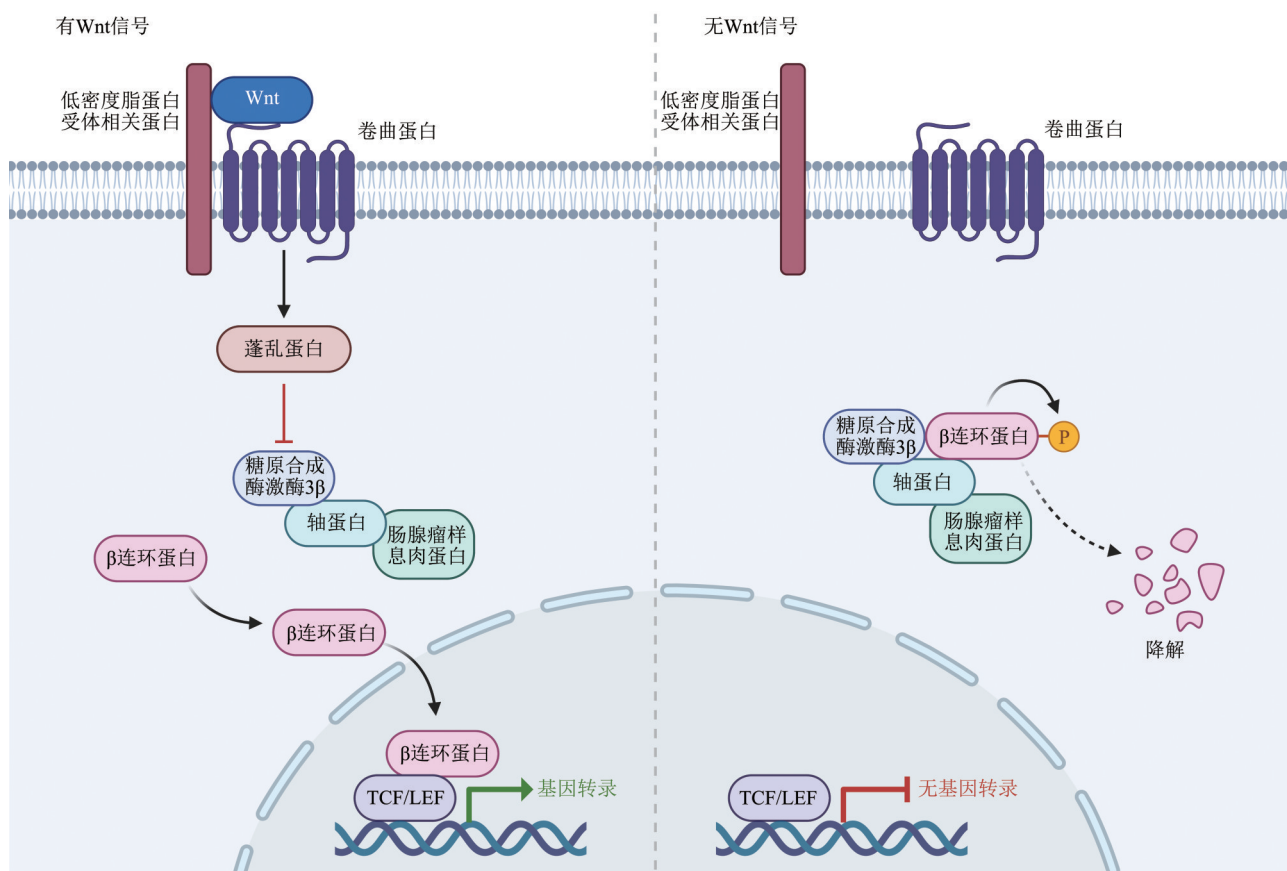


Fig. 2 Wnt/β-catenin signal pathway diagram (created with BioRender.com)

图2 Wnt/β-catenin信号通路图 (使用BioRender.com绘制)

有 Rspo2 存在时, Rspo2 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, 阻断 Fzd 受体泛素化和降解, 增强 Wnt/β-catenin 信号通路。当 ZNRF3/RNF43 发生降解时, Rspo2-LGR4 也可以通过招募 IQGAP1 诱导 LRP5/6 磷酸化增强 β-catenin 活性, 提高 Wnt/β-catenin 通路调节细胞的黏附和迁移能力^[14]。此外, 研究发现^[15], Rspo2 还可以通过与 HSPGs 和 ZNRF3/RNF43 相互作用, 诱导细胞膜表面 ZNRF3/RNF43 降解来增强 Fzd 受体积累, 增强 Wnt 信号通路。除了作为 Wnt 激动剂, 还有研究表明, Rspo2 也充当骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 拮抗剂, Rspo2 是 BMP 受体 1A 型 (BMPRI1A) /ALK3 的高亲和力配体, 它与 ZNRF3 结合以触发 BMPRI1A 的内化和降解。这表明 Rspo2

是双功能配体, 其可以通过 ZNRF3 激活 Wnt 并抑制 BMP 信号传导^[16]。

Rspo2 是一种分泌蛋白, 其通过激活并增强 Wnt 信号通路传导而发挥其生物学功能。然而有趣的是, Rspo2 不仅仅对 Wnt 信号通路有激活作用, Reis 等^[17] 对非洲爪蟾的研究中发现, Rspo2 在形态学上以及在基因靶标和途径介质的水平上都起着 Wnt 拮抗剂的作用。在此过程中, Rspo2 不影响 Dvl 磷酸化和 Fzd 活性, 也不与 RNF43/ZNRF3 和 LGR4/5 结合, 而是直接抑制 Wnt 蛋白诱导的 TCF3/TCF7L1 磷酸化, 导致靶基因不能被激活, 从而造成对 Wnt 信号通路的拮抗作用。这一发现与之前研究结果有所不同, 需要未来进一步的研究来证实。

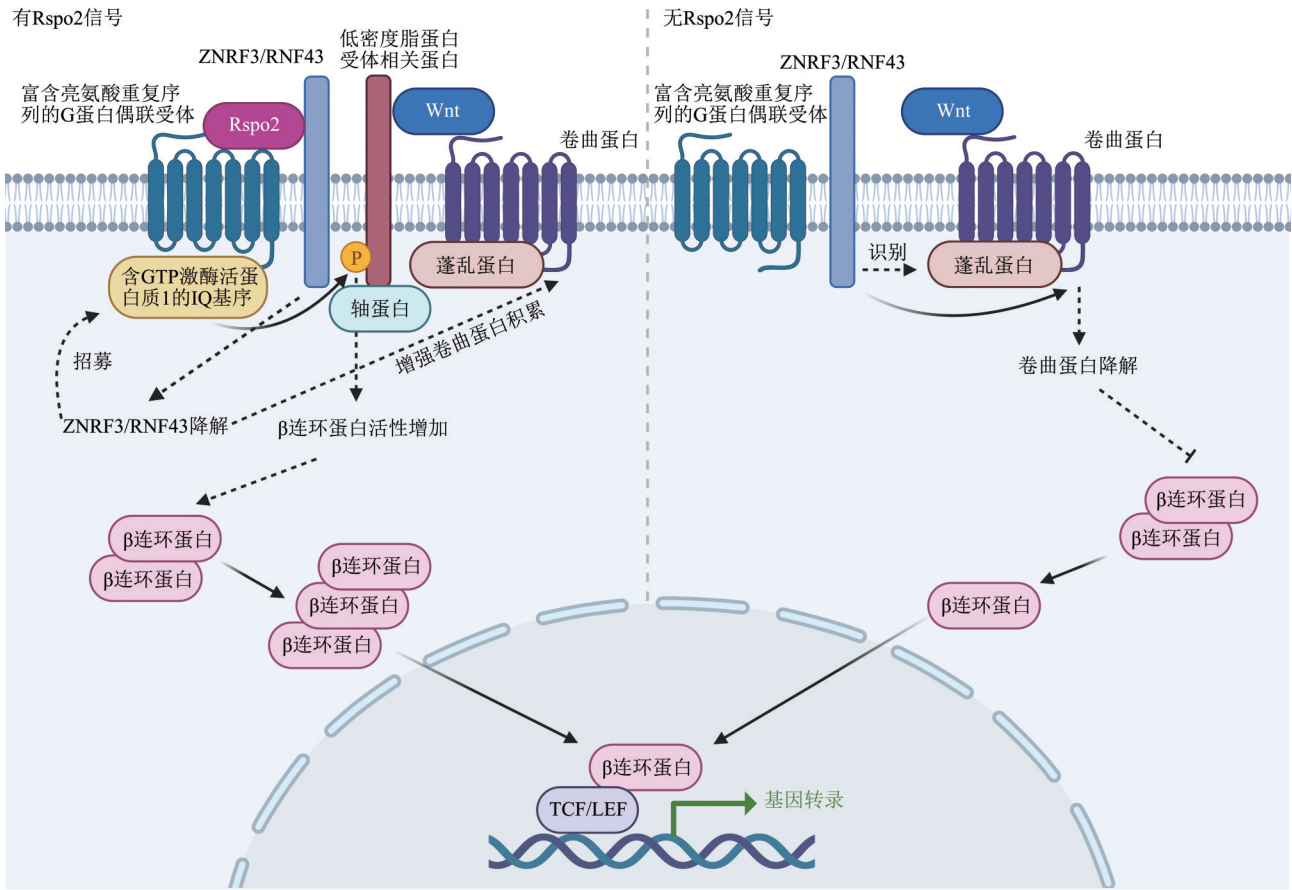


Fig. 3 Rspo2 regulates Wnt/ β -catenin signaling pathway (created with BioRender.com)
图3 Rspo2调控Wnt/ β -catenin信号通路 (使用BioRender.com绘制)

3 Rspo2通过Wnt/ β -catenin信号通路调控骨代谢

Wnt/ β -catenin 信号通路是目前研究最广泛且与基础骨生物学直接相关的信号通路, 而 Rspo2 是经典 Wnt/ β -catenin 通路的一类新激活剂, 其通过减少 Wnt 受体周转来积极调节经典 Wnt 信号传导, 从而增加 β -catenin 的稳定性来展现出对骨代谢的调控作用。Rspo2 在骨骼发育过程中突出表达^[18], 并有助于肢体形成^[19], 特别是远端手指的形成^[20]。

3.1 Rspo2与成骨细胞

骨形成是新骨发生和成熟的过程, 分为类骨质的合成、分泌和类骨质的矿化两大过程。OB 能够通过分泌 I 型胶原与羟基磷灰石形成类骨质, 类骨质逐渐成熟并形成大量钙盐和磷酸盐, 矿化形成新骨^[21-23]。OB 是存在于骨组织中, 起到接受刺激和发挥效应作用的细胞, 其来源于 BMSCs, 随着发育依次分化为前 OB 和 OB, OB 在分化的最终阶段

包埋于矿化的骨基质中成为骨细胞。在骨骼受到损伤时, 机体首先反应是 OB 增殖、成熟, 之后形成新生的骨组织。Wnt/ β -catenin 信号通路在骨骼发育及代谢平衡中发挥重要作用, 包括 BMSCs 的定向分化^[24]、OB 的谱系决定、分化和矿化, 是骨形成的关键信号通路^[25-27]。

BMSCs 定向分化的 OB 在骨形成、维持和重建中发挥着重要作用^[28]。Wnt/ β -catenin 通路可通过促进 Runt 相关转录因子 2 (Runt related transcription factor 2, Runx2) 和骨钙素的表达, 促进 BMSCs 向 OB 分化, 亦可抑制 C/EBP α 、PPAR γ 和 Sox9 基因的表达, 抑制 BMSCs 向软骨细胞和脂肪细胞的分化, 还能通过调控 Myc、cyclin D、c-Jun 和 Fra-1 的表达, 来促进 OB 的增殖^[29]。

Wnt 蛋白是一类富含半胱氨酸的分泌型糖蛋白家族, 到目前为止在哺乳动物染色体中已鉴定出 19 种 Wnt 蛋白家族成员, 其中 Wnt/ β -catenin 信号通路涉及到的主要有 Wnt1、Wnt3a、Wnt5a 和

Wnt10b等^[30]。Wnt1可通过Wnt/ β -catenin途径提高成骨相关转录因子Runx2、碱性磷酸酶、I型胶原骨桥蛋白和骨钙素的水平来促进成骨作用^[31]。Wnt3a在体内可以激活 β -catenin，在体外Wnt3a蛋白可以抑制OB的凋亡^[32]。Wnt6、Wnt10a和Wnt10b通过Wnt/ β -catenin途径促进间充质干细胞成骨分化并抑制其向脂肪细胞的分化^[33]。过表达Wnt10a可提高 β -catenin的相对表达量，进而抑制3T3-L1前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化并诱导其向成骨分化^[33]。BMP能诱导BMSCs向OB分化，Wnt/ β -catenin信号通过TCF/LEF直接诱导OB中BMP-2的表达，增强BMP-2的转录活性，并且 β -catenin能够增强BMSCs对BMP-2的反应，诱导其向OB分化，促进成骨^[34]。Bennett等^[35]培育骨钙素启动子Wnt10b过表达的转基因小鼠，发现股骨骨密度、骨体积分数和骨小梁数较野生型小鼠显著增高，而其是由OB数量增多引起的。

Rspo2可以通过Wnt/ β -catenin信号通路来调控骨形成。Knight等^[20]从1个月大的WT和Ocn-Cre+Rspo2^{ff}小鼠中分离BMSCs，通过茜素红染色发现来自Ocn-Cre+Rspo2^{ff}小鼠的BMSCs显示矿化减少，而且小鼠的整体体型和骨量减小，基因表达分析和免疫组织化学分析显示Ocn-Cre+Rspo2^{ff}中的 β -catenin信号传导减少，以上说明Rspo2经过Wnt/ β -catenin信号通路可调控OB生成和矿化，从而控制骨量。Rspo2缺乏导致矿物质沉积和骨形成率降低，从而导致小梁越来越少，总骨量减少，骨强度降低。除此之外，Rspo2还在牙周韧带组织和牙髓干细胞中发挥作用。Gong等^[36]发现，Rspo2通过调节Wnt/ β -catenin信号传导诱导牙髓干/祖细胞的牙源分化。Arima等^[37]通过对未成熟牙周韧带组织和细胞施加机械拉伸负荷发现Rspo2表达上调，之后再分别用Rspo2和Dickkopf相关蛋白1(DKK1)处理，发现细胞经Rspo2处理后增强了 β -catenin的核易位、活化以及OB的矿化结节，所以受机械负荷的牙周韧带组织的矿化可以通过Rspo2和DKK1进行精细控制，以防止牙周韧带组织过度矿化。在MC3T3E1前体OB中，Wnt11显著增加OB相关蛋白牙本质基质蛋白1(dental matrix protein 1, Dmp1)、磷酸调节内肽酶同系物(phosphate-regulating endopeptidase homolog, Phex)、骨唾液蛋白(bone sialoprotein, Bsp)和Rspo2的表达，Wnt11过表达增加 β -catenin积累并促进BMP诱导的碱性磷酸酶(alkaline

phosphatase, ALP)表达和矿化，而Rspo2的敲低抑制Wnt11介导的OB成熟，这些研究表明，Wnt11通过 β -catenin发出信号激活Rspo2表达是OB成熟所必需的^[38]。Rspo2在Wnt刺激的前OB中高表达，并且其过表达诱导相同细胞中的OB分化，支持了其作为OB生成的正向调节剂的假定作用。之后Zhu等^[39]进一步研究发现，体外实验中Rspo2通过激活MC3T3-E1细胞中的Wnt信号通路来促进成骨，而随着LGR4的功能破坏，Rspo2的这种作用在细胞中消失了。值得注意的是，在体实验发现给予外源性Rspo2挽救了卵巢切除(ovariectomy, OVX)小鼠的骨质流失并改善了骨微结构，以上结果表明，在Rspo2激活Wnt/ β -catenin信号传导来调节骨代谢的过程中，LGR4是作为Rspo2促进成骨的关键受体^[39]。

3.2 Rspo2与破骨细胞

OC来源于单核-巨噬细胞系，是一种多核巨噬细胞，通过单核前体细胞融合形成，是唯一的骨吸收细胞，与骨代谢及骨重建密切相关。

Wnt/ β -catenin通路主要通过OPG/RANK/RANKL通路间接参与骨吸收的生理和病理过程^[40]。OPG/RANK/RANKL通路是调节OC功能的关键信号通路，RANKL与OC表面或OC前体细胞上的RANK结合诱导OC的分化和激活，而OPG竞争性阻断RANKL与RANK结合，抑制OC进一步分化成熟^[41]。Wnt/ β -catenin信号能够刺激OB上调OPG表达，增加OPG/RANKL的比例，抑制OC分化和活性，从而抑制骨吸收^[42]。对骨溶解大鼠模型使用GSK-3 β 抑制剂以激活Wnt/ β -catenin通路，发现OPG表达增强，OB数量显著减少，骨量增加^[43]。在OB发育后期，Wnt3b和 β -catenin的表达增高，RANKL的活性被抑制，OC的数量和活性均降低。Wnt16能通过Wnt/ β -catenin通路和Wnt/c-JNK通路抑制OC前体细胞分化并间接作用于OB，导致OB分泌OPG增加^[44]。 β -catenin对OC形成起着关键的双相和剂量依赖性调节作用。Sui等^[45]构建了OC中 β -catenin过表达的小鼠模型，通过CT断层扫描和组织形态学分析观察到小鼠生长迟缓和骨量降低，表明OC中 β -catenin的激活促进了OC形成，导致骨质流失。由此，推断Wnt蛋白在OC不同阶段可能都具有调控功能。

Zhu等^[39]用Rspo2处理共培养的OB和OC，发现上清液中OPG水平升高，RANKL/OPG的比率降低，而破坏LGR4后该比率则显著升高，几乎

完全阻断了Rspo2对RANKL/OPG的负面影响。用抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色也表明在添加有Rspo2的共培养体系中OC细胞数量显著减少,之后用BMSCs与LGR4敲除细胞共培养时发现Rspo2不影响OC的数量。在没有OB情况下,Rspo2对OC分化没有直接抑制作用。这些结果表明,LGR4功能正常的OB在Rspo2介导的OC生成抑制中起着关键作用。

3.3 Rspo2与软骨细胞

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OB取代。增殖软骨区域的软骨细胞表达转录因子Sox9,分泌II型胶原(collagen type II, CII)和蛋白聚糖(aggrecan, Acan)等基质蛋白^[46],成熟/肥大区域的软骨细胞则表达另一个转录因子Runx2^[47]。Takegami等^[48]发现,Rspo2基因敲除的小鼠模型中软骨细胞的 β -catenin的含量减少,而Sox9和CII的含量增加。通过对ATDC5软骨细胞系Rspo2的过表达和敲除对比研究,发现Rspo2激活Wnt/ β -catenin信号通路抑制增殖软骨细胞Col2a1、Sox9、Acan表达但不抑制成熟/肥大软骨细胞Runx2表达。上述结果支持Rspo2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。

4 Rspo2在骨相关疾病中的作用

4.1 脊柱后纵韧带骨化

脊柱后纵韧带骨化(ossification of the posterior longitudinal ligament, OPLL)是一种常见的脊柱疾病,由后纵韧带异位骨化(heterotopic ossification, HO)引起。韧带的HO是一种动态病理过程,包括创伤/损伤、炎症、间充质基质细胞(mesenchymal stromal cells, MSC)募集和软骨分化,最后是骨化^[49]。值得注意的是,HO的常见过程是软骨内骨化^[49],而有文献^[48]报道Rspo2与软骨内骨化的调节有关,Rspo2可以激活经典Wnt途径来促使增殖性软骨细胞分化为肥厚软骨细胞,而不是OB。有趣的是,最近有文献报道,炎症和重复性的机械过载会导致韧带的微损伤、退化和随后的HO^[50],这与人韧带细胞中炎症因子和机械载荷会诱导Rspo2产生的报道相一致^[51]。最初Nakajima等^[52]研究发现,Rspo2是OPLL的易感基因,之后Chen等^[53]发现,BMSC来源的细胞外囊

泡(BMSC-derived extracellular vesicles, BMSC-EVs)含有miR-497-5p,BMSC-EVs可以将miR-497-5p带到韧带成纤维细胞中,通过抑制Rspo2表达来加速韧带成纤维细胞的成骨分化,从而加速OPLL。而最近Tachibana等^[51]观察到OPLL患者中的Rspo2表达降低,Rspo2可以抑制人韧带细胞的软骨分化,深入研究发现Rspo2是由炎症因子或机械载荷通过Rac1-NF- κ B途径诱导产生,但机械载荷和NF- κ B在Rspo2的表达和调控中的意义还需要进一步研究来揭示。

4.2 骨关节炎

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是导致软骨退化、滑膜炎症、软骨下骨重塑和骨赘形成的慢性疾病。OA的病因非常复杂,包括关节损伤、肥胖、衰老和遗传因素等^[54]。OA患者的Rspo2 mRNA和蛋白质表达降低。Rspo2 siRNA降低了正常患者的OB矿化,而重组Rspo2能够增加骨关节炎患者的OB矿化,OA患者细胞中 β -catenin稳定性也降低,重组Rspo2能够将这种稳定性恢复到正常水平^[55]。Zhang等^[56]用Rspo2或抗Rspo2对CIOA(关节内注射胶原酶诱导的OA)小鼠进行处理并观察关节滑膜组织中的巨噬细胞,发现滑膜巨噬细胞M1可以通过Rspo2发生极化从而加重CIOA;Okura等^[57]发现,Mianserin(一种四环类抗抑郁药)通过抑制软骨细胞中Rspo2与其受体LGR5的结合,抑制Wnt/ β -catenin信号传导,并减少OA大鼠模型中的关节病变;Li等^[58]发现,抑制丙酮酸激酶M2(PKM2)表达导致Rspo2表达明显下降,随后阻断Wnt/ β -catenin信号传导,在白介素-1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β)刺激的大鼠软骨细胞中防止内质网(ER)应激介导的细胞凋亡和炎症损伤,并且可能代表OA的新治疗靶点;Knights等^[59]发现,滑膜成纤维细胞可以分泌Rspo2并对创伤后OA产生一定作用。由于在OA中软骨和软骨下骨都会受到损伤,于是Lee等^[60]将原代软骨细胞和人OB系SaOS-2放在分化培养基中进行培养,并对RSPO、LGRs以及软骨生成和成骨特异性标志物的表达进行了分析,发现晚期OA组织样本显示靠近软骨下骨的区域中Rspo1和LGR6的表达增加,而Rspo2和LGR5的表达在关节软骨的深层区域重叠,从第7天到第14天,分化中的软骨细胞显示Rspo2和LGR5的表达增加,而从第2天到第14天,经历分化的OB显示Rspo1和LGR6的表达增加。在肿瘤坏死因子 α (TNF- α)刺激条件下,Rspo2和

Rspo1 分别恢复了炎症、软骨和成骨标志物的抑制表达,并且在这两种情况下, β -catenin 的稳定性也有所恢复。以上结果表明,RSPOs 软骨细胞和 OB 之间的相互作用可能为治疗炎症性疾病提供新思路。此外,Wnt 和 BMP 信号串扰的机制是目前研究的焦点,在人间充质基质细胞中起重要作用,miR-181a 是参与调节软骨和软骨内分化之间平衡的关键 microRNA,研究发现^[61],在人 MSCmiR-181a 中激活的 BMP 信号传导表现为 Sox9 蛋白的积累和 SMAD1/5/9 的磷酸化增加,以及伴随 miR-181a 模拟物诱导的经典 Wnt 信号减少,符合 RSPO2 丢失的预期效应,从而表明 miR-181a 靶向 MSC 中的 Rspo2 mRNA,并且观察到健康人软骨组织中 miR-181a 和 miR-218 表达水平之间的紧密相关性在 OA 中被破坏,这突出了 Wnt-BMP 信号交互作用对预防 OA 的重要性。

4.3 类风湿性关节炎

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种全身性的自身免疫性疾病^[62],以周身小关节受累为主要特征,具有侵蚀性、多发性、慢性及系统性等^[63],其主要病理表现为,关节滑膜慢性炎症、血管翳形成,以及进行性、持续性的炎症破坏关节软骨、韧带及肌腱,导致关节畸形及功能丧失^[64]。目前 RA 的具体病因及发病机制尚不明确,随着对 RA 研究的深入,其发病机制的有关研究主要集中在滑膜细胞异常的信号转导方面。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocyte, FLS) 是 RA 最重要的病理特征,FLS 产生炎症因子,促进细胞质降解,导致软骨和骨的持续性破坏^[62]。Wnt/ β -catenin 信号通路参与 RA 慢性炎症过程。最初 Xiao 等^[65]发现,RA 患者 FLS 中 β -catenin 表达会因经典 Wnt 通路的激活提高,而 β -catenin 可反过来继续激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而有助于 RA 患者中 FLS 的稳定激活。之后 Du 等^[66]观察到,Wnt/ β -catenin 通路的激活将会增强 IL-1 β 、TNF- α 的表达,促进基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 生成,继而导致 ECM 降解并引起关节软骨破坏。值得注意的是,Rspo2 作为经典 Wnt 通路的激动剂,是否可以通过 Wnt 通路对 FLS 中的炎症因子以及 RA 发挥调控作用尚未见报道。众所周知,女性 RA 症状比男性更严重,并且占 RA 总患者的大多数 (约 75%)。Kudryavtseva 等^[67]发现,RA 中存在的性别差异,可能与参与软骨降解 (Adamts12) 以及经典与非

经典 Wnt 通路 (Cthrc1、Rspo2 和 Sdc2) 的基因有关。综上所述,关于 Rspo2 与 RA 之间关系的研究文献较少,二者之间的具体分子机制还需进一步研究来证明。

5 结论与展望

Rspo2 是一种基质细胞蛋白,能与基质蛋白及多种细胞受体 (Lgr4/5/6、ZNRF3/RNF43、HSPGs 和 IQGAP1 等) 相互作用来发挥生物学效应。Rspo2 与人类四肢骨骼发育畸形和缺陷密切相关,能够通过 Wnt/ β -catenin 信号通路对骨骼系统产生调控作用,并参与一些骨骼相关疾病如 OPLL、OA 和 RA 的发生发展。

值得注意的是,最新研究发现,Rspo2 可以通过未知受体直接作用于 TCF3,TCF3 不与 β -catenin 结合,通过抑制 TCF3 磷酸化来阻断 Wnt 靶标活化,最终对 Wnt 起拮抗作用。这与之前的研究结论有所不同,也为 Rspo2 在骨骼中与 Wnt/ β -catenin 信号通路的相互作用提供了新的研究思路。除此之外,有关 Rspo2 与骨之间的研究仍存在许多空白点,需要未来进一步研究探讨,例如:a. Rspo2 在人韧带细胞中受 NF- κ B 诱导产生,而受 NF- κ B 调控的炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 等是否可以调控 Rspo2 尚未报道;b. RSPOs 家族成员之一 Rspo1 是一种 BMSCs 分泌的力学敏感蛋白,可以通过经典 Wnt 通路参与机械应力调控 OB 分化和骨形成,而 Rspo2 与机械力之间是否也在存在该机制尚未见确切报道。运动是改善骨骼疾病的一种常规手段,Rspo2 参与调节多种骨骼疾病的发生发展过程,那么运动是否可以通过 Rspo2 相关分子机制来调控骨并改善骨骼疾病尚未见报道,未来可以进一步深入研究来了解 Rspo2 在骨骼发育中的分子机制。

参 考 文 献

- [1] He Z M, Zhang J L, Ma J Z, *et al.* R-spondin family biology and emerging linkages to cancer. *Ann Med*, 2023, **55**(1): 428-446
- [2] Kazanskaya O, Glinka A, Del Barco Barrantes I, *et al.* R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell*, 2004, **7**(4): 525-534
- [3] Kim K A, Zhao J, Andarmani S, *et al.* R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle*, 2006, **5**(1): 23-26
- [4] Yoon J K, Lee J S. Cellular signaling and biological functions of R-spondins. *Cell Signal*, 2012, **24**(2): 369-377
- [5] Schuijers J, Junker J P, Mokry M, *et al.* Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell*, 2015, **16**(2): 158-170

- [6] Vuong L T, Mlodzik M. Different strategies by distinct Wnt-signaling pathways in activating a nuclear transcriptional response. *Curr Top Dev Biol*, 2022, **149**: 59-89
- [7] He J, Zhang N H, Zhang J W, *et al.* Migration critically mediates osteoblastic differentiation of bone mesenchymal stem cells through activating canonical Wnt signal pathway. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018, **171**: 205-213
- [8] Wang B, Rong X Z, Zhou Y M, *et al.* Eukaryotic initiation factor 4A3 inhibits Wnt/ β -catenin signaling and regulates axis formation in zebrafish embryos. *Development*, 2021, **148**(9): dev198101
- [9] Puzik K, Tonnier V, Oppel I, *et al.* Lef1 regulates caveolin expression and caveolin dependent endocytosis, a process necessary for Wnt5a/Ror2 signaling during *Xenopus* gastrulation. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 15645
- [10] Hao H X, Jiang X M, Feng C. Control of Wnt receptor turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 signaling module and its dysregulation in cancer. *Cancers*, 2016, **8**(6):54
- [11] De Lau W, Barker N, Low T Y, *et al.* Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 2011, **476**(7360): 293-297
- [12] Hao H X, Xie Y, Zhang Y, *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, 2012, **485**(7397): 195-200
- [13] Koo B K, Spit M, Jordens I, *et al.* Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*, 2012, **488**(7413): 665-669
- [14] Carmon K S, Gong X, Yi J, *et al.* RSPO-LGR4 functions via IQGAP1 to potentiate Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(13): E1221-1229
- [15] Lebensohn A M, Rohatgi R. R-spondins can potentiate WNT signaling without LGRs. *Elife*, 2018, **7**: e33126
- [16] Lee H, Seidl C, Sun R, *et al.* R-spondins are BMP receptor antagonists in *Xenopus* early embryonic development. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5570
- [17] Reis A H, Sokol S Y. Rspo2 inhibits TCF3 phosphorylation to antagonize Wnt signaling during vertebrate anteroposterior axis specification. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 13433
- [18] Knight M N, Hankenson K D. R-spondins: novel extracellular regulators of the skeleton. *Matrix Biol*, 2014, **37**: 157-161
- [19] Szenker-Ravi E, Altunoglu U, Leushacke M, *et al.* RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6. *Nature*, 2018, **557**(7706): 564-569
- [20] Knight M N, Karuppaiah K, Lowe M, *et al.* R-spondin-2 is a Wnt agonist that regulates osteoblast activity and bone mass. *Bone Res*, 2018, **6**: 24
- [21] Martínez-Gil N, Ugartondo N, Grinberg D, *et al.* Wnt pathway extracellular components and their essential roles in bone homeostasis. *Genes*, 2022, **13**(1): 138
- [22] Kim J M, Lin C J, Stavre Z, *et al.* Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells*, 2020, **9**(9): 2073
- [23] Jiao H L, Xiao E, Graves D T. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Curr Osteoporosis Rep*, 2015, **13**(5): 327-335
- [24] Visweswaran M, Pohl S, Arfuso F, *et al.* Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells-To Wnt, or not Wnt. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, **68**: 139-147
- [25] Moorer M C, Riddle R C. Regulation of osteoblast metabolism by Wnt signaling. *Endocrinol Metab*, 2018, **33**(3): 318-330
- [26] Karner C M, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci*, 2017, **74**(9): 1649-1657
- [27] Du J H, Lin S X, Wu X L, *et al.* The function of Wnt ligands on osteocyte and bone remodeling. *J Dent Res*, 2019, **98**(8): 930-938
- [28] Bateman M E, Strong A L, McLachlan J A, *et al.* The effects of endocrine disruptors on adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells: a review. *Front Endocrinol*, 2016, **7**: 171
- [29] 李俊峰, 郭庆山, 傅捷辉, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在调控骨量的作用. *重庆医学*, 2017, **46**(3): 401-403
- [30] Li J F, Guo Q S, Fu J H, *et al.* *Chongqing Medicine*, 2017, **46**(3): 401-403
- [31] Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: a comprehensive review. *Cell Biol Int*, 2022, **46**(6):863-877
- [32] Kook S H, Heo J S, Lee J C. Crucial roles of canonical Runx2-dependent pathway on Wnt1-induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 2015, **402**(1-2): 213-223
- [33] Almeida M, Li H, Bellido T, *et al.* Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem*, 2005, **280**(50): 41342-41351
- [34] Cawthorn W P, Bree A J, Yao Y, *et al.* Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism. *Bone*, 2012, **50**(2): 477-489
- [35] Zhang R R, Oyajobi B O, Harris S E, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone*, 2013, **52**(1): 145-156
- [36] Bennett C N, Ouyang H J, Ma Y F, *et al.* Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*, 2007, **22**(12): 1924-1932
- [37] Gong Y P, Yuan S, Sun J J, *et al.* R-Spondin 2 induces odontogenic differentiation of dental pulp stem/progenitor cells via regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Front Physiol*, 2020, **11**: 918
- [38] Arima M, Hasegawa D, Yoshida S, *et al.* R-spondin 2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J Periodontol Res*, 2019, **54**(2): 143-153
- [39] Friedman M S, Oyserman S M, Hankenson K D. Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem*, 2009, **284**(21): 14117-14125
- [40] Zhu C, Zheng X F, Yang Y H, *et al.* LGR4 acts as a key receptor for R-spondin 2 to promote osteogenesis through Wnt signaling pathway. *Cell Signal*, 2016, **28**(8): 989-1000
- [41] Yang B, Li S F, Chen Z, *et al.* Amyloid β peptide promotes bone formation by regulating Wnt/ β -catenin signaling and the OPG/RANKL/RANK system. *FASEB J*, 2020, **34**(3): 3583-3593

- [41] Amin N, Boccardi V, Taghizadeh M, *et al.* Probiotics and bone disorders: the role of RANKL/RANK/OPG pathway. *Aging Clin Exp Res*, 2020, **32**(3): 363-371
- [42] Albers J, Keller J, Baranowsky A, *et al.* Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *J Cell Biol*, 2013, **200**(4): 537-549
- [43] Amirhosseini M, Madsen R V, Escott K J, *et al.* GSK-3 β inhibition suppresses instability-induced osteolysis by a dual action on osteoblast and osteoclast differentiation. *J Cell Physiol*, 2018, **233**(3): 2398-2408
- [44] Gori F, Lerner U, Ohlsson C, *et al.* A new WNT on the bone: WNT16, cortical bone thickness, porosity and fractures. *Bonekey Rep*, 2015, **4**: 669
- [45] Sui X, Deng S J, Liu M M, *et al.* Constitutive activation of β -catenin in differentiated osteoclasts induces bone loss in mice. *Cell Physiol Biochem*, 2018, **48**(5): 2091-2102
- [46] Akiyama H, Chaboissier M C, Martin J F, *et al.* The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, 2002, **16**(21): 2813-2828
- [47] Du G Q, Xiang C, Sang X W, *et al.* Histone deacetylase 4 deletion results in abnormal chondrocyte hypertrophy and premature ossification from collagen type 2 α 1-expressing cells. *Mol Med Rep*, 2020, **22**(5): 4031-4040
- [48] 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **473**(1): 255-264
- [49] Zhang Q, Zhou D, Wang H T, *et al.* Heterotopic ossification of tendon and ligament. *J Cell Mol Med*, 2020, **24**(10): 5428-5437
- [50] Nakamichi R, Asahara H. Regulation of tendon and ligament differentiation. *Bone*, 2021, **143**: 115609
- [51] Tachibana N, Chijimatsu R, Okada H, *et al.* Rspo2 defines a distinct undifferentiated progenitor in the tendon/ligament and suppresses ectopic ossification. *Sci Adv*, 2022, **8**(33): eabn2138
- [52] Nakajima M, Kou I, Ohashi H, *et al.* Identification and functional characterization of Rspo2 as a susceptibility gene for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Am J Hum Genet*, 2016, **99**(1): 202-207
- [53] Chen X H, Wang S X, Cui Z, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles containing miR-497-5p inhibit Rspo2 and accelerate OPLL. *Life Sci*, 2021, **279**: 119481
- [54] Hunter D J, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *Lancet*, 2019, **393**(10182): 1745-1759
- [55] Abed É, Chan T F, Delalandre A, *et al.* R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis Rheum*, 2011, **63**(12): 3865-3875
- [56] Zhang H Y, Lin C X, Zeng C, *et al.* Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. *Ann Rheum Dis*, 2018, **77**(10): 1524-1534
- [57] 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. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 2808
- [58] Li Z Z, Wang F, Liu S, *et al.* Ablation of PKM2 ameliorated ER stress-induced apoptosis and associated inflammation response in IL-1 β -treated chondrocytes via blocking Rspo2-mediated Wnt/ β -catenin signaling. *J Cell Biochem*, 2020, **121**(10): 4204-4213
- [59] Knights A J, Farrell E C, Ellis O M, *et al.* Synovial fibroblasts assume distinct functional identities and secrete R-spondin 2 in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 2023, **82**(2): 272-282
- [60] Lee Y H, Sharma A R, Jagga S, *et al.* Differential expression patterns of R-spondin family and leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptors in chondrocytes and osteoblasts. *Cell J*, 2021, **22**(4): 437-449
- [61] Melnik S, Hofmann N, Gabler J, *et al.* MiR-181a targets Rspo2 and regulates bone morphogenetic protein-Wnt signaling crosstalk during chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 747057
- [62] 刘国栋, 伍镒. Wnt 基因与类风湿性关节炎相关性的研究进展. *世界最新医学信息文摘*, 2018, **18**(72): 118-119+122
- [62] Liu G D, Wu D. World Latest Medicine Information, 2018, **18**(72): 118-119+122
- [63] 马欣蕾, 照日格图. 中西医关于类风湿关节炎发病机制研究新进展. *新疆中医药*, 2019, **37**(1): 117-120
- [63] Ma X L, Zhaorigetu. *Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, **37**(1): 117-120
- [64] 房铁生. 中医药治疗类风湿关节炎的研究进展. *内蒙古中医药*, 2016, **35**(2): 153-154
- [64] Fang T S. *Inner Mongolia Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, **35**(2): 153-154
- [65] Xiao C Y, Pan Y F, Guo X H, *et al.* Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol*, 2011, **40**(1): 26-33
- [66] Du G Q, Song Y, Wei L, *et al.* Osthole inhibits proliferation and induces catabolism in rat chondrocytes and cartilage tissue. *Cell Physiol Biochem*, 2015, **36**(6): 2480-2493
- [67] Kudryavtseva E, Forde T S, Pucker A D, *et al.* Wnt signaling genes of murine chromosome 15 are involved in sex-affected pathways of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 2012, **64**(4): 1057-1068

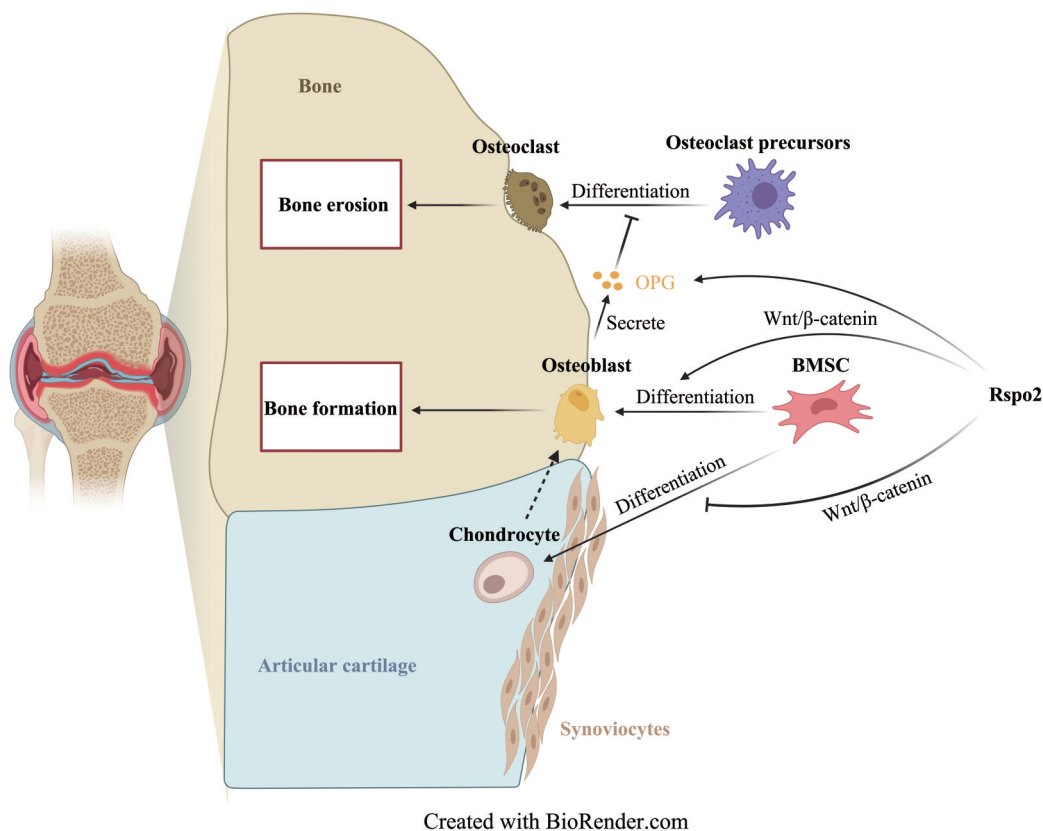
Mechanism of R-spondin2 Regulating Wnt/ β -catenin Signaling Pathway and Its Influence on Skeletal System *

JIN Jun-Jie¹⁾, LI Jing^{1,2)}, HU Guang-Xuan¹⁾, WU Ruo-Meng¹⁾, YI Xue-Jie^{1)**}

¹⁾College of Sports Health Shenyang Sport University, Shenyang110102, China;

²⁾College of Physical Education, Liaoning Normal University, Dalian116029, China)

Graphical abstract



Abstract R-spondin2 (Rspo2) is a member of protein family RSPOs, which can be coupled to receptor 4/5 (leucine-rich repeat-containing g protein-coupled receptor 4/5, LGR4/5), cell surface transmembrane E3 ubiquitin ligase ZNRF3/RNF43 (zinc and ring finger 3/ring finger protein 43), heparan sulfate proteoglycan (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) and the IQ motif (IQ gap 1) containing GTP enzyme activating protein 1, regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is the most widely studied signaling pathway and directly

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (12072202).

** Corresponding author.

Tel: 86-15940278868, E-mail: yixuejie8387@163.com

Received: March 24, 2023 Accepted: June 25, 2023

related to basic bone biology. Any problem in this pathway may have an impact on bone regulation. In recent years, it has been found that Rspo2 can act on osteoblast, osteoclast and chondrocytes through Wnt/ β -catenin, and take part in occurrence and development of some bone diseases such as ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL), osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA), so the study of Rspo2 may become a new therapeutic direction for bone-related diseases. Based on the latest research progress, this paper reviews the structure and main functions of Rspo2, the mechanism of Rspo2 regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and its influence on skeletal system, in order to provide new ideas and ways for the prevention and treatment of bone-related diseases.

Key words R-spondin2, Wnt/ β -catenin signaling pathway, osteoblast, osteoclast, chondrocyte

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0100