

骨与关节系统发生过程中相关调控机制的研究进展

吕学敏, 邓廉夫, 杨庆铭

(上海市伤骨科研究所 上海第二医科大学附属瑞金医院骨科, 上海 200025)

摘要: 脊椎动物胚胎期骨与关节系统的发生是一种复杂生命现象, 起始于中胚层间充质细胞的定向聚集, 形成肢芽, 然后在一系列作用因子的调控下, 肢芽内细胞进一步分化, 形成具有骨骼雏形的软骨原基, 后者经软骨内骨化发育成骨。四肢骨大多是以这种方式发生的, 四肢的滑膜关节系统也随骨骼的发生而形成。详细阐述了近年来对肢体骨与关节系统发生各步骤相关调控机制方面的研究进展。

关键词: 发生; 肢芽; 间充质细胞

中图分类号: R68

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)02-0231-04

Progress on the related mechanism in the development of bone and joint

LÜ Xue-Min, DENG Lian-Fu, YANG Qing-Ming

(Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics Orthopaedic Department Ruijin Hospital Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract: The embryonic development of bone and joint involves in complicated events for vertebrate limb. It originates from determined condensation of mesenchymal cells from lateral mesoderm. These cells and the overlying ectodermal jacket form limb buds at presumptive limb levels. Then, under the control of systemic factors, mesenchymal cells aggregate and differentiate to form cartilage blastemal elements that prefigure skeletal limb components. The latter develops into skeleton through endochondral ossification. The majority of the bones of the limb form by the endochondral mechanism. The formation of synovial joint system and bone development occur simultaneously. This article reviewed the progress on the related control mechanism in the development of bone and joint recently.

Key words: development; limb bud; mesenchymal cell

脊椎动物骨与关节系统的发生是一种复杂的生命现象, 在胚胎期不同胚层的共同参与及多种系统和局部的调节因子联合作用下, 才能最终发育成形态完整功能正常的骨骼系统, 这些环节中的任一部分发生变异或功能异常, 都可能导致相关的先天性疾病和畸形。因此, 阐明骨与关节系统发生的调控机制, 有助于对一些骨骼系统先天性、遗传性疾病的防治, 同时也可为体外组织工程化骨的研制提供理论基础。目前这一领域正引起国内外发育生物学家和骨科学研究者的广泛关注。

1 概述

脊椎动物四肢骨与关节系统起源于胚胎期中胚层的侧板。胚胎发育到一定时期, 侧板中胚层的间充质细胞在将来形成肢体的位置聚集, 并不断增殖, 突起于胚体, 突起部分连同被覆的外胚层共同构成胚胎早期的肢芽(limb bud)结构。肢芽中心的间充质细胞在特定空间和分化信息的指导下聚集成团, 并向软骨细胞方向分化形成具骨骼雏形的软骨原基。软骨原基形成后通过软骨内骨化的方式生成骨组织, 即中心区的软骨细胞逐渐出现肥大、钙化、坏死等表现, 伴随新

收稿日期: 2003-02-25; 修回日期: 2003-09-05

基金项目: 上海市基础研究重点项目资助(02JC14021)[This work was supported by grants from the special Funds for Major state Basic Research Project of Shanghai]

作者简介: 吕学敏(1975-), 男, 山西人, 在读博士研究生, 专业方向: 骨与关节病损的基础和临床研究。Tel: 021-64370045-663339, E-mail: lxuemin98@yahoo.com.cn

通讯作者: 邓廉夫(1962-), 男, 山东人, 教授, 博导, 专业方向: 骨与关节病损的基础和临床研究

生血管系统侵入,成骨细胞募集于软骨基质表面,进一步分化,释放出类骨质最终取代软骨成分,然后与血管来源的破骨细胞一道维持骨组织代谢的动态平衡。四肢骨骼大多是以这种方式发生的^[1, 2]。

2 肢芽内间充质细胞位置信息的传递和介导机制

2.1 “顶嵴”(apical ectodermal ridge, AER)区传递的位置信息

在肢芽背——腹侧交界的远端存在一狭长的结构区,称为“顶嵴”。长期以来,一直认为此区内存在影响肢芽发育的信息^[3]。在胚胎发育的不同时期截除 AER 可导致不同程度的骨骼畸形,越早期截除,畸形越严重。

进一步的研究认为,AER 区的外胚层细胞通过表达成纤维细胞生长因子(FGF)家族的成员,如 FGF-2、4、8 等,作用于下方的间充质细胞,保证肢芽由近向远的生长方向^[4, 5],研究表明,FGF-2、4、8 任一种都可完全取代 AER 的作用,维持 AER 截除后肢芽的正常发育^[6, 7]。

2.2 “极化活动区”(zone of polarizing activity, ZPA)传递的位置信息

在 AER 下方,中胚层间充质的后方存在另一信息区,称为“极化活动区”,这一区域释放出的信息最终影响四肢端骨,如腕骨、指(趾)骨等的形成。将这一区域内的细胞移植到对侧肢芽中胚层的前方,可诱导产生多指畸形。畸形指的数目与移植的细胞数目有关。

目前研究认为,ZPA 区的信息是由 Hedgehog 分子家族的一种称为“Sonic hedgehog, Shh”的分子介导的^[8]。Shh 是脊椎动物胚胎发育时重要的细胞间信号传递分子,主要参与神经系统和肢体的发生^[9]。Riddle 等的实验证实,重组 Shh 植入诱导的肢体畸形和 ZPA 区细胞移植相同^[8]。

对于 Shh 分子对细胞的作用机制目前有两种观点,有人认为,Shh 通过激活次级信号分子,如 BMP-2,而在较远的范围内发挥作用。也有观点认为,Shh 是一种短距离信号分子,细胞分泌后聚集于细胞周围,通过与临近细胞膜上的跨膜蛋白 Patched(Ptc)结合发挥作用。究竟何种机制起主导作用,目前尚缺乏定论^[10-12]。

2.3 *Hox* 基因和位置信息

在对肢芽位置信息的阅读和传导过程中,间充质细胞表达的另一种基因:*Hox* 基因,也发挥着重要的中继作用。*Hox* 基因家族由多个亚家族构成,在肢芽发育的不同时期和不同部位的细胞都有表达。Nelson 发现,Shh 和 FGFs 联合可异位诱导 *Hox* 基因的表达^[13],这说明 *Hox* 基因参与介导 Shh、FGFs 等因子的信息传递。转基因或基因剔除小鼠的实验研究证实,*Hox* 基因在调节肢芽内未分化间充质细胞增殖、聚集及软骨原基的分化方面都发挥重要的作用^[14]。Randy 等认为,*Hox* 基因可能通过对转化生长因子 β (TGF- β)、FGF 及 Hedgehog 等因子的调节而对骨骼发育施加影

响^[15]。

3 软骨原基的形成及滑膜关节系统发生的调控模式

3.1 间充质细胞向软骨细胞分化的影响因素

胚胎进一步发育,肢芽中心的间充质细胞即向成软骨细胞方向分化,形成初具肢体骨骼雏形的软骨原基。目前认为以下因素在间充质细胞分化过程中发挥作用:

(1) TGF- β 超家族成员骨形态发生蛋白(BMP)和生长分化因子-5(GDF-5)的诱导作用。已证实,GDF-5 变异的小鼠表现为“短耳”畸形,这种畸形包括外耳软骨、胸骨等全身软骨的畸形、短缩^[16]。此外,BMP 家族的其他成员如 BMP-2、4 皮下注射诱导软骨、骨形成的实验更进一步支持了 BMP 诱导成软骨的功能。

GDF-5 属 BMP 家族的新成员,也称为软骨衍生形态发生蛋白 1(CDMP1)^[17],已发现人类骨骼系统的一些先天性畸形与 GDF-5 变异有关^[18]。Elaine 等通过对肢芽局部植入 GDF-5 浸泡株的研究发现其有促软骨生成能力^[19]。

(2) 力学刺激的诱导作用。Elder 等对鸡胚肢芽间充质细胞施以一定频率的压应力刺激,发现压力可明显促进其向软骨细胞分化^[20]。可以设想,在肢芽内间充质细胞向软骨细胞分化的同时,肢体肌肉、韧带等组织的原始结构也在逐步形成,这些组织细胞的收缩可能对相邻的间充质细胞产生一定的拉力或压力,促进后者向软骨细胞分化。

3.2 Wnt/链蛋白(catenin)/N-钙黏着蛋白(N-Cadherin)系统对间充质细胞分化的影响

Wnt 家族是由一些富含分泌型半胱氨酸残基的糖蛋白构成,已证实,Wnt 家族在肢体的正常发育过程中发挥着重要的作用^[21, 22]。

链蛋白是存在于细胞浆内的一种生物大分子,是构成 Wnt 信息传导通道的主要成分^[23]。当 Wnt 发挥作用时,链蛋白被激活,激活的链蛋白既可与钙黏着蛋白的胞浆内部分结合,稳定后者介导的细胞间粘附,也可进入细胞核内,在转录水平发挥作用,增强钙黏着蛋白的表达^[24]。当 Wnt 信息消失或下调时,链蛋白通过丝氨酸-苏氨酸磷酸化而发生降解,失去功能。

在软骨细胞形成过程中,密集的间充质细胞逐渐解聚,细胞间粘附分子 N-钙黏着蛋白表达水平下降,细胞间的相互连接消失,间充质细胞开始向成软骨细胞方向分化^[25]。

Cevik 等的研究表明^[26],在鸡胚肢芽内,Wnt 家族的成员 Wnt-7a 可明显抑制间充质细胞内链蛋白的降解,进而保持 N-钙黏着蛋白的高水平表达,较长时间地维持了细胞的粘附状态。通过这一途径,Wnt-7a 发挥了抑制软骨细胞生成的作用。已有研究发现,Wnt-7a 是肢芽背侧外胚层细胞表达的一种位置信息分子,它对软骨细胞生成的这种抑制作用可将间充质细胞的成软骨活动限制于适当的空间位置内,保证了骨骼的正常形态。

3.3 Wnt-14 和 GDF-5 对滑膜关节系统发育的影响

在软骨原基形成的早期,其在形态结构上是连续的,随胚胎的进一步发展,在将来形成关节的地方出现了细胞密集区,这一区域称为“间区”(interzone IZ),IZ 内的细胞变扁平,细胞外基质水平下调,逐渐失去了前成软骨细胞的特征。IZ 的结构呈“三明治”型,外边两层的细胞致密,后来发育为关节软骨,中间层细胞密度较低,以后通过细胞凋亡、坏死等过程,逐渐消失,发育为滑膜关节的关节腔^[27],IZ 周围的间充质细胞则分化形成关节囊、肌腱等结构,最终发育为完整的滑膜关节。

Elaine 等对小鼠胚胎的研究发现,外源性 GDF-5 可明显刺激胚胎早期软骨的发育,抑制关节形成,甚至可刺激相邻软骨的融合,内源性 GDF-5 是小鼠早期软骨原基发育及关节形成必不可少的调控因子,GDF-5 变异小鼠出现软骨发育不全,IZ 标志分子弥散分布,终致关节形成异常^[19]。

Christine 等则通过对鸡胚的研究发现,Wnt 家族的 Wnt-14 在滑膜关节的形成中发挥的作用更为重要:(1) 采用 Wnt-14 逆转录病毒感染肢芽非关节形成区,造成 Wnt-14 的异位表达,结果发现,Wnt-14 异位表达区阿利辛蓝染色变淡,出现跟 IZ 相似的结构和分子标志。(2) Wnt-14 病毒也可使培养中的前成软骨细胞失去向软骨细胞分化的能力,甚至阿利辛蓝染色强阳性的细胞团感染 Wnt-14 病毒后也可变得淡染。(3) 异位表达的 Wnt-14 能抑制附近内源性 Wnt-14 诱导的关节形成,但对位置较远的区域无限制能力^[28]。Wnt-14 的这些特性说明它既可启动关节的形成,同时,由于其在 IZ 周围的持续表达,将关节的形成限制于适当的空间范围内。

4 成骨细胞的迁移和募集机制

4.1 HB-GAM/N-Syndecan 途径介导的成骨细胞募集

HB-GAM (Heparin-binding Growth-associated Molecule) 也称多向性分化因子 (pleiotrophin),是一种富含赖氨酸和半胱氨酸残基的细胞外基质蛋白,进化上较保守,在人、鼠、牛、鸡之间有 95% 的同源性^[29],跟另一种肝素结合生长因子, Midkine, 有 50% 的同源性,已发现,它在神经系统发育中有重要作用^[30]。

Syndecan 是一类跨膜硫酸肝素蛋白多糖,目前已克隆出 4 种亚型,其中 Syndecan-3 最初从雪旺细胞中克隆,因此也称 N-Syndecan^[31]。N-Syndecan 与细胞外的 HB-GAM 通过硫酸肝素链结合后,引起细胞内的骨架结构重排,最终导致细胞移动,这一途径最早由 Hung 等描述,认为其在神经轴索的延伸中发挥作用^[32]。

Shinji 等的实验证实了这一途径同样也是介导成骨细胞募集的主要机制^[33]:(1) 在胚胎期,HB-GAM 在软骨基质大量表达,后者则是软骨内骨化的模板,将有大量的成骨细胞募集、黏附。(2) 迁移中的前成骨细胞、成骨细胞内 N-

Syndecan 高度表达,在 HB-GAM 高度表达的区域两种分子表达重叠,而在完全成熟的骨组织区域,成骨细胞不表达 N-Syndecan。(3) 出生后,HB-GAM 主要在形成次级骨化中心的软骨基质内密集表达,同时,在一些板层骨的骨细胞内也有选择性表达,这些区域都与成骨细胞募集有关。电镜分析发现,表达 N-Syndecan 的细胞都表现为增殖分化能力旺盛,大多是移动中的前成骨细胞。(4) HB-GAM 转基因的小鼠表现为骨皮质明显增厚,为正常的 147.4%,但骨髓腔结构正常,骨的大体形态结构也正常。

4.2 Midkine 和血小板衍生生长因子 (PDGF) 对成骨细胞募集的协同作用

Midkine (MK) 是另一类肝素结合生长因子,以前的研究认为其在神经轴突的生长及肿瘤的发病中发挥作用^[34, 35]。Maosong 等的研究证实^[36],MK 可诱导成骨细胞募集,他认为这一作用可能通过细胞内有丝分裂原激动蛋白激酶 (MAPKs) 和 PI_3 激酶介导,同时发现, MK 和 PDGF 在诱导成骨细胞募集方面有协同作用。这种情况主要见于骨折修复时,因为此时局部 MK 和 PDGF 聚集的水平都显著增高^[37]。但在骨骼发生过程中这一途径是否发挥重要作用尚有待深入研究。

参考文献 (References):

- [1] Cancedda R, Descalzi Cancedda, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*, 1995, 159: 256~358.
- [2] Adrian Erlebacher, Ellen H, Stephen E, Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 1995, 80: 371~378.
- [3] Todt W L, Fallon J F. Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol*, 1984, 80: 21~41.
- [4] Chon M J, Izpisua-Belmonte J C, Abud H, Heath J K, Tickle C. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*, 1995, 80: 739~746.
- [5] Vogel A, Rodriguez C, Izpisua-Belmonte J C. Involvement of Fgf-8 initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development*, 1996, 122: 1737~1750.
- [6] Crossley P H, Minowada G, Macarthur C A, Martin G R. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, 1996, 84: 127~136.
- [7] Fallon J F, Lopez A, Ros M A, Savage M P, Olwin B B, Simandl B K. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, 1994, 264: 104~107.
- [8] Riddle R D, Johnson R L, Laufer E, Shen L, Mohler J, McMahon J A, McMahon A P. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 1993, 75: 1401~1416.
- [9] Placzek M. The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, 5: 499~506.

- [10] Francis P H, Richardson M K, Brickell P M, Tickle C. Bone morphogenetic proteins and a signaling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*, 1994, 120:209~218.
- [11] Stone D M, Hynes M, Armanini M, Swanson T A, Gu Q, Johnson R L, Scott M P, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper J E, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, 1996, 384:129~134.
- [12] Philip W, Andrew P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 2001, 15:3059~3087.
- [13] Nelson C E, Morgan B A, Burke A C, Laufer E, DiMambro E, Murtaugh L C, Gonzales E, Tessarollo L, Parada L F, Tabin C. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development*, 1996, 122:1449~1466.
- [14] Goff D J, Tabin C J. Analysis of *HoxD-13* and *HoxD-11* misexpression in chick limb buds reveals that Hox genes affect both bone condensation and growth. *Development*, 1997, 124: 627~636.
- [15] Randy L, Clifford J. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*, 1997, 90: 979~990.
- [16] Kingsley D M. What do BMPs do in mammals? clues from the mouse short-ear mutation. *Trends Genet*, 1994, 10:16~21.
- [17] Chang S C, Hoang B, Thomas J T, Vukicevic S, Luyten F P, Ryba N J, Kozak C A, Reddi A H, Moos M Jr. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem*, 1994, 269:28227~28234.
- [18] Thomas J T, Kilpatrick M W, Lin K, Erlacher L, Lembessis P, Costa T, Tsipouras P, Luyten F P. Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat Genet*, 1997, 17:58~64.
- [19] Elaine E, David M. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol*, 1999, 209:11~27.
- [20] Elder S H, Kimura J H, Soslowsky L J, Goldstein SA. Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells. *J Ortho Res*, 2000, 18:78~86.
- [21] Cadigan K M, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 1997, 11:3286~3305.
- [22] Vicki Church, Tsutomu Nohno, Claudia Linker, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Science*, 2002, 115:4809~4818.
- [23] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14:59~88.
- [24] Bienz M. TCF: Transcriptional activator or repressor? *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10:366~372.
- [25] Langille R M. Chondrogenic differentiation in cultures of embryonic rat mesenchyme. *Microsc Res Tech*, 1994, 28:455~469.
- [26] Cevik Tufan A, Rocky S. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *FASEB J*, 2001, 15:1436~1438.
- [27] Kimura S, Shiota K. Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis. *J Morphol*, 1996, 229:337~346.
- [28] Christine Hartmann, Clifford J Tabin. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*, 2001, 104:341~351.
- [29] Li Y S, P G Milner, A K Chauhan, Watson M A, Hoffman R M, Kodner C M, Milbrandt J, Deuel T F. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science*, 1990, 250: 1690~1694.
- [30] Mitsiadis T A, M Salmirvirta, T Muramatsu, Muramatsu H, Rauvala H, Lehtonen E, Jalkanen M, Thesleff I. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine(MK) and HB-GAM (pleiotrophin), is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development*, 1995, 121:37~51.
- [31] Carey D J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, 1997, 327:1~16.
- [32] Hung C, Y Ni, T Wang, Gao Y, Haudenschild C C, Zhan X. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 1997, 271:13911~13915.
- [33] Shinji Imai, Marko Kaksonen, Erkki Raulo, Kinnunen T, Fages C, Meng X, Lakso M, Rauvala H. Osteoblast recruitment and bone formation enhanced by cell matrix-associated heparin-binding growth-associated molecule(HB-GAM). *J Cell Biol*, 1998, 143:1113~1128.
- [34] Kaneda N, Talukder A H, Nishiyama, Koizumi S, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth/differentiation factor, exhibits nerve cell adhesion and guidance activity for neurite outgrowth in vitro. *J Biochem*, 1996, 119:1150~1156.
- [35] Choudhuri R, Zhang H T, Donnini S, M Ziche, R Bicknell. An angiogenic role for the neurokinins midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res*, 1997, 57:1814~1819.
- [36] Maosong Qi, Shinya Ikematsu, Nobuaki Maeda, Ichihara-Tanaka K, Sakuma S, Noda M, Muramatsu T, Kadomatsu K. Haptotactic migration induced by midkine involvement of protein-tyrosine phosphatase, mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase *J Biol Chem*, 2001, 276: 15868~15875.
- [37] Ohta S, Muramatsu H, Senda T, Zou K, Iwata H, Muramatsu T. Midkine Is Expressed During Repair of Bone Fracture and Promotes Chondrogenesis. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1132~1144.