

促红细胞生成肝细胞激酶及其受体相互作用蛋白 双向传导信号在骨稳态中的作用

张祎¹综述 于维先² 胡敏¹审校

(1. 吉林大学口腔医院正畸科; 2. 吉林大学口腔医学院牙发育及
颌骨重塑与再生省重点实验室 长春 130021)

[摘要] 破骨细胞介导的骨吸收活动与成骨细胞介导的成骨活动是一个重要且复杂的生命过程, 其中常伴有多种偶联及信号传导, 以维持骨稳态。目前, 越来越多的学者关注促红细胞生成肝细胞激酶(Eph)与促红细胞生成肝细胞激酶受体相互作用蛋白(ehprn)介导的双向信号传导在骨稳态中的作用。本文就Eph-ehprn家族, Eph-ehprn家族在骨稳态中的作用等研究进展作一综述。

[关键词] 促红细胞生成肝细胞激酶; 促红细胞生成肝细胞激酶受体相互作用蛋白; 双向信号传导; 骨稳态
[中图分类号] Q 51 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2013.02.026

The effect of erythropoietin producing hepatocyte kinases-erythropoietin producing hepatocyte kinases receptor interacting protein bidirectional signal transduction on bone homeostasis Zhang Yi¹, Yu Weixian², Hu Min¹. (1. Dept. of Orthodontics, Hospital of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Laboratory of Mechanism of Tooth Development and Jaw Bone Remodeling and Regeneration, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] Bone homeostasis, including bone resorption and bone formation, is a delicate and important process with various molecules coordinating osteoclast function with that of osteoblasts. Nowadays more and more researchers focus on the effects of bidirectional signal transduction between erythropoietin producing hepatocyte kinases (Eph) and erythropoietin producing hepatocyte kinases receptor interacting protein (ehprn) ligands in bone homeostasis. Our article illustrates the bidirectional signal transduction of Eph/ehprn in different stages in bone remodeling.

[Key words] erythropoietin producing hepatocyte kinases; erythropoietin producing hepatocyte kinases receptor interacting protein; bidirectional signal transduction; bone homeostasis

骨的吸收与重建是一种持续终生且复杂的生命过程, 由成骨细胞和破骨细胞共同完成, 吸收与重建这种骨稳态平衡的维持对于骨的正常功能至关重要, 其中包括骨生长、骨损伤修复和陈旧骨替换等, 需要成骨细胞与破骨细胞之间的诸多偶联作用参与以维持骨稳态^[1-3]。参与骨稳态的因子有很多, 譬如促红细胞生成肝细胞激酶(erythropoietin producing hepatocyte kinases, Eph)和促红细胞生成肝细胞激酶受体相互作用蛋白(erythropoietin producing hepatocyte kinases receptor interacting protein, ehprn)等。

1 Eph-ehprn

Eph是酪氨酸蛋白激酶受体家族中最大的亚家族, ehprn是Eph的配体, 两者共同组成一个重要的细胞通信系统, 其研究可追溯到在酪氨酸激酶相关肿瘤中发现的EphA1过表达^[4]; 而后, 第一个Eph的相关配体ehprnA1也在癌细胞中被发现^[5-6]。

1.1 Eph和ehprn的亚类

在人类基因组中有9种EphA和5种EphB。除了EphA4和ehprnA (EphA4和ehprnB) 以及EphB2和ehprnA5之外, EphA主要与糖基磷酸化的ehprnA1~A5结合, 而EphB则主要与ehprnB1~B3结合^[7-8]。此外, EphB4仅能与ehprnB2结合, 然而一些细胞表面所分泌的可溶性ehprnA也可以激活EphA^[9]。

[收稿日期] 2012-03-01; **[修回日期]** 2012-10-29

[作者简介] 张祎(1986—), 女, 黑龙江人, 博士

[通讯作者] 于维先, Tel: 0431-88796000

1.2 Eph-ephrin信号传导模式

Eph与ephrin接触时会产生双向信号传导作用,其信号传导既可激活受体表达细胞,也可激活配体表达细胞^[10],故激活Eph受体表达细胞的信号传导称为正向信号传导,而激活ephrin配体表达细胞的信号传导称为反向信号传导^[11-12]。Eph-ephrin两者之间这种独特的接触后所产生的生物学功能,由Eph-ephrin复合体的多聚性和双向传导性决定^[13]。

2 Eph-ephrin在骨稳态中的作用

Eph与ephrin结合产生双向信号传导并影响诸多的生物学进程,包括血管生成、细胞迁移、干细胞分化和癌症^[14-19]等。研究^[20-21]显示,Eph-ephrin双向信号传导在正常骨稳态中也起着重要的作用。

2.1 EphA2-ephrinA2

在骨重建的初始阶段,EphA2-ephrinA2间的相互作用促进骨吸收,抑制成骨细胞的形成。这与骨重建过渡阶段中EphB4-ephrinB2相互接触抑制破骨细胞的形成,从而促进骨形成不同。Irie等^[22]发现,破骨细胞上的ephrinA2与成骨细胞和破骨细胞上的EphA2结合,调节成骨细胞和破骨细胞的分化。在该研究中,ephrinA2 mRNA在原癌基因c-Fos上调核因子- κ B受体活化因子配体(Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)后也被迅速诱导,且在24 h后达到峰值。此过程中的ephrinA2的早期诱导是c-Fos依赖性的,而非活化的T细胞核因子 c_1 (nuclear factor of activated T cell c_1 , NFAT c_1)依赖性的。因ephrin-B2诱导的信号通路是在破骨细胞分化晚期c-Fos和NFAT c_1 共同依赖性的^[11],故c-Fos-NFAT c_1 转录差异调节了ephrinA2和ephrinB2的表达。Irie等^[22]进一步用荧光素酶发现,ephrinA2基因片段的1.6 kb上游区域可被c-Fos-c-Jun激活。虽然在这个区域有少量的c-Fos和激活蛋白(activator protein, AP)-1的绑定位点,但c-Fos是否直接与ephrinA2结合尚不得而知,需要进一步地分析在破骨细胞分化过程中ephrinA2与c-Fos和AP-1的结合位点。

EphA2与EphA4都是ephrinA2的受体,EphA4表达于成熟的破骨细胞,而EphA2在RANKL增加之前即可在前破骨细胞上表达;因此,EphA2可能是ephrinA2在前体破骨细胞分化早期阶段的受体。一旦ephrinA2分化完成,成熟的破骨细胞上的EphA4受体可能与ephrinA结合。Irie等^[22]以定量

反转录聚合酶链反应分析发现,当ephrinA表达增加时,EphA的表达反而减少。由此他们推测,这是由破骨细胞分化之间不同步所造成的。EphA2-ephrinA2的接触可能发生于破骨细胞分化的多个阶段,例如前体破骨细胞上和成熟的破骨细胞上,致早期前体破骨细胞的分化加速细胞间的融合和功能的活化。与ephrinA和EphA在运动神经元中的拮抗作用相反,ephrinA2的反向信号传导和EphA的正向信号传导均能促进破骨细胞的分化。Irie等^[22]还发现,ephrinA2作用在破骨细胞上的反向信号传导可上调磷脂酶C(phospholipase C, PLC)- γ 2和磷酸化PLC- γ 2的表达,因此,ephrinA2信号通过PLC- γ 2调节细胞内钙信号和NFAT c_1 的激活;但是,ephrinA2信号是否影响细胞内钙离子的传导,目前尚不清楚^[23]。

研究显示,EphA2-ephrinA2之间的信号传导发生在骨重建的初始阶段,两者的相互作用可促进骨吸收,随之而来的就是抑制成骨细胞的形成。

2.2 EphA4

EphA4是一种存在于软骨细胞HCS-2和8上的酪氨酸激酶受体基因,特异性地存在于生长板的肥大层;此外,也可在骨松质邻近的生长板成骨细胞和破骨细胞上观察到明显的免疫反应^[24]。这些研究结果显示,EphA4在软骨内骨化后期的特异性作用与肥大软骨细胞和成骨细胞有关。在健康小鼠生长软骨(mouse growth cartilage, MCG)细胞融合的早期阶段,EphA4的表达非常低,但在早期肥大软骨细胞标志基因钙结合蛋白(Calponin, Cnn)-2的表达达到峰值后,EphA4的表达突然大幅度增长^[24]。在以实时反转录聚合酶链反应和蛋白质印迹技术分析人类成骨细胞系SaOS-2以及HCS-2和8软骨细胞时发现,SaOS-2细胞系有较高的EphA4 mRNA表达,即成骨细胞特异性表达的EphA4参与了骨形成过程^[24]。针对EphA4的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)评价EphA4在保持成骨细胞表型的功能时发现,引入两种合成的siRNA双链,可造成EphA4 mRNA的表达明显下降,特别是siRNA-14,但是可检测到成骨细胞标志基因的表达^[24]。以实时反转录聚合酶链反应分析这些细胞RNA反转录的互补DNA,结果显示Cnn-2表达下降^[24]。碱性磷酸酶的活性检测显示:通过siRNA-14移除EphA4的SaOS-2细胞系,其碱性磷酸酶活性较低;而以低效率的siRNA-17移除EphA4的SaOS-2细胞系,其碱性磷酸酶活性

变化则不明显^[24]。这些结果均表明, SaOS-2细胞系在表达成骨细胞表型时, EphA4是必不可少的。此外, EphA4分子分布于细胞膜和细胞质甚至是细胞核中, 且在细胞核内的EphA4聚集在细胞核内的特定区域^[24]。这就表明, EphA4及其亚碎片能进入成骨细胞的细胞核中, 且对成骨细胞有促进作用。

Ting等^[25]发现, 不论是在大鼠还是人类中, 扭曲(*twist*)-1蛋白功能丧失均可导致冠状缝骨性愈合。以往的研究显示, 伴有神经嵴中胚层缺陷的大鼠的冠状缝常常存在*ephrinA2*、*ephrinA4*和*EphA4*的减少。他们还发现: 人类*ephrinA4*基因突变可导致非综合征性的冠状骨性愈合; 应用早期成骨细胞标志物, 即碱性磷酸酶检测第14.5天的*EphA4*^{-/-}胚胎, 其碱性磷酸酶表达的细胞层与*twist-1*^{-/-}突变相同, 故推测EphA4在冠状缝中是*twist-1*的下游效应子。

上述研究均表明, EphA4在骨形成的过程中有着重要的作用, 特别是在骨形成的末期, 对成骨细胞和肥大软骨细胞均有重要的作用。

2.3 EphrinB1

Compagni等^[26]应用Cre-lox技术发现: 敲除*EphrinB1*基因的小鼠可能导致其围生期危机、免疫缺陷和骨骼异常等; 而其产生的骨骼异常有四肢骨骼异常和轴向骨骼异常, 包括腭裂、短头骨、肋骨不对称、胸骨融合和多指等。另外, Xing等^[27]发现: *EphrinB1*基因缺失可导致严重的颅骨损伤, 包括骨大小、骨密度和骨小梁均有减少; 条件性阻断*EphrinB1*基因的发育中小鼠的成骨细胞分化和骨形成受损, 可导致小鼠成骨细胞特异性转录因子表达降低; *EphrinB1*基因反转录信号的激活可刺激转录激活因子Taz(*tafazzin*)去磷酸化、核反转和转活以及*Taz*目标基因的转录。

2.4 EphB4和ephrinB2

Zhao等^[12]发现: *ephrinB2*是NFATc₁的目标基因, 而NFATc₁在破骨细胞分化时有上调作用, 此时人们才认识到*ephrinB2*在骨中的潜在作用; *ephrinB2*既可在破骨细胞分化时被诱导, 也可在多核破骨细胞和分化中的单核破骨细胞中检测出来; 虽然在破骨细胞上并未发现EphB的表达, 但是却在成骨细胞上可同时表达Eph和ephrin, 可以通过破骨细胞*ephrinB2*的反向转录信号抑制破骨细胞的形成。就这种反向传导信号而言, *ephrinB2*的细胞内区域至关重要, 这种抑制信号依赖于

与突触后密集区-95/盘大蛋白/密闭小带(*postsynaptic density-95/disc large protein/zonula occludens*, PDZ)结构域的接触, 从而抑制c-Fos和NFATc₁的转录。此途径是酪氨酸磷酸化非依赖性信号传导通路。

体外研究显示, *ephrinB2*可抑制破骨细胞, 但是在巨噬细胞和破骨细胞中缺乏*ephrinB2*的小鼠并无明显的骨骼异常, 原因可能在于*ephrinB1*有一定的代偿作用。*ephrinB2*能与所有的EphB结合, 但仅与EphB4接触后才能产生反向信号传导。另外, *ephrinB2*可能是通过介导RhoA的活性激活正向传导信号, 促进成骨细胞分化的。Zhao等^[12]通过*EphB4*转基因小鼠证明, *EphB4*过表达可以通过I型胶原 α_1 链蛋白引物定位到成骨细胞系上, 而这些转基因小鼠表现为骨量、骨密质和骨形成率的增加。除此之外, 破骨细胞数也有减少, 提示*EphB4*过表达可以抑制破骨细胞的功能。此时, RANKL与骨保护蛋白均未被检测到。综上所述, 在体内研究中, *EphB4*在成骨细胞上过表达可增强骨形成和抑制骨吸收。

Allan等^[28]发现, 表达于成骨细胞上的*ephrinB2*对成骨细胞的分化与骨形成也有诱导作用。甲状旁腺素(*parathyroid hormone*, PTH)和PTH相关蛋白(*parathyroid hormone related protein*, PTHrP)可使*ephrinB2*在小鼠骨髓基质干细胞上的表达增加, 小鼠肱骨中成骨细胞上的表达增加。同时, 应用*ephrinB2*和*EphB4*的特异性肽酶抑制剂来证明*ephrinB2*和*EphB4*在成骨细胞上的互动作用, 可以得出其明显地抑制矿化的结论。这些结果证明, 自分泌或旁分泌可能影响成骨细胞上的*ephrinB2*和破骨细胞上的*EphB4*, 这些影响可能有助于PTH或PTHrP的合成作用。抑制成骨细胞中的胰岛素样生长因子-IR可增加*ephrinB2*的表达和防止*ephrinB2*的PTH依赖性增加, 提示胰岛素样生长因子-IR可调节PTH对*ephrinB2*和*ephrinB4*的作用^[29]。

上述研究表明, 表达于成骨细胞的*EphB4*通过其正向信号传导可促进骨形成并同时抑制骨吸收, 其相关的*ephrinB2*对成骨细胞的分化与骨形成也有诱导作用。*EphB4-ephrinB2*的双向信号传导作用可维持骨重建的稳定。

3 结束语

Eph-ephrin介导的双向信号传导已在众多领域得到了证实, 越来越多的研究将其转移到骨髓

态中的作用。不同的Eph-ehprin家族介导的信号传导在骨改建的不同阶段发挥着作用，这也从新的立足点对骨改建中的一些关键问题进行了诠释，但其还有许多机制尚不清楚，需要进一步的探讨。

4 参考文献

- [1] Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2):201-209.
- [2] Cao X. Targeting osteoclast-osteoblast communication[J]. Nat Med, 2011, 17(11):1344-1346.
- [3] 赵熠, 蔡育, 王贻宁. 破骨细胞前体细胞的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2011, 38(6):670-673.
- [4] Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, et al. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene[J]. Science, 1987, 238(4834):1717-1720.
- [5] Bartley TD, Hunt RW, Welcher AA, et al. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase[J]. Nature, 1994, 368(6471):558-560.
- [6] Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease[J]. Cell, 2008, 133(1):38-52.
- [7] Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(7):475-486.
- [8] Palmer A, Klein R. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function[J]. Genes Dev, 2003, 17(12):1429-1450.
- [9] Alford SC, Bazowski J, Lorimer H, et al. Tissue transglutaminase clusters soluble A-type ephrins into functionally active high molecular weight oligomers[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(20):4170-4179.
- [10] Pasquale EB. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(6):462-475.
- [11] Egea J, Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance[J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(5):230-238.
- [12] Zhao C, Irie N, Takada Y, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis[J]. Cell Metab, 2006, 4(2):111-121.
- [13] Stein E, Lane AA, Cerretti DP, et al. Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses[J]. Genes Dev, 1998, 12(5):667-678.
- [14] Davy A, Soriano P. Ephrin signaling *in vivo*: Look both ways[J]. Dev Dyn, 2005, 232(1):1-10.
- [15] 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.
- [16] Wang Z, Cohen K, Shao Y, et al. Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes, and blood vessels[J]. Blood, 2004, 103(1):100-109.
- [17] Rohani N, Canty L, Luu O, et al. EphrinB/EphB signaling controls embryonic germ layer separation by contact-induced cell detachment[J]. PLoS Biol, 2011, 9(3):e-1000597.
- [18] Yu G, Luo H, Wu Y, et al. Ephrin B2 induces T cell costimulation[J]. J Immunol, 2003, 171(1):106-114.
- [19] Yang NY, Fernandez C, Richter M, et al. Crosstalk of the EphA2 receptor with a serine/threonine phosphatase suppresses the Akt-mTORC1 pathway in cancer cells[J]. Cell Signal, 2011, 23(1):201-212.
- [20] Davy A, Aubin J, Soriano P. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development[J]. Genes Dev, 2004, 18(5):572-583.
- [21] Matsuo K. Eph and ephrin interactions in bone[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 658:95-103.
- [22] Irie N, Takada Y, Watanabe Y, et al. Bidirectional signaling through ephrinA2-EphA2 enhances osteoclastogenesis and suppresses osteoblastogenesis[J]. J Biol Chem, 2009, 284(21):14637-14644.
- [23] Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T, et al. Osteoblasts induce Ca²⁺ oscillation-independent NFATc₁ activation during osteoclastogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(25):8643-8648.
- [24] Kuroda C, Kubota S, Kawata K, et al. Distribution, gene expression, and functional role of EphA4 during ossification[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(1):22-27.
- [25] Ting MC, Wu NL, Roybal PG, et al. EphA4 as an effector of Twist1 in the guidance of osteogenic precursor cells during calvarial bone growth and in craniosynostosis[J]. Development, 2009, 136(5):855-864.
- [26] Compagni A, Logan M, Klein R, et al. Control of skeletal patterning by ephrinB1-EphB interactions[J]. Dev Cell, 2003, 5(2):217-230.
- [27] Xing W, Kim J, Wergedal J, et al. Ephrin B1 regulates bone marrow stromal cell differentiation and bone formation by influencing TAZ transactivation via complex formation with NHERF1[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(3):711-721.
- [28] Allan EH, Hausler KD, Wei T, et al. EphrinB2 regulation by PTH and PTHrP revealed by molecular profiling in differentiating osteoblasts[J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(8):1170-1181.
- [29] Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone[J]. J Bone Miner Res, 2007, 22(9):1329-1337.