

Wnt 信号通路与骨细胞生物力刺激信号转导间的关系

李昕综述 朱智敏审校

(四川大学华西口腔医院修复科 成都 610041)

[摘要] Wnt 信号通路是体内重要的信号调节系统之一,而骨细胞作为骨组织中最主要的应力感受细胞,受载后可引起其内部 Wnt 信号通路的快速激活,最终调节其基因表达,影响骨改建。该激活过程受诸多调控因子的影响。本文就 Wnt 信号通路与骨细胞生物力刺激信号转导间的关系,以及该信号转导过程中 Wnt 信号通路的调控因子等研究进展作一综述。

[关键词] Wnt 信号通路; 骨细胞; 生物力刺激; 信号转导

[中图分类号] Q 256 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.03.013

The relationship between Wnt signaling pathway and mechanotransduction in osteocytes Li Xin, Zhu Zhimin. (Dept. of Prosthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] As one of the most important regulatory systems, Wnt signaling pathway is stimulated very quickly by biomechanical stimulation in osteocytes, which function as key mechanosensory cells in bone. The stimulating procedure is influenced by lots of factors and finally results in regulation of gene expression and bone remodeling. This review concludes the research advances concerning the relationship between Wnt signaling pathway and mechanotransduction in osteocytes, and major regulatory factors on the pathway's stimulation.

[Key words] Wnt signaling pathway; osteocyte; biomechanical stimulation; signaling transduction

生物力刺激对骨组织的生理病理过程具有重要的意义^[1-2]。目前的研究进展显示,骨在应力作用下的改建,是由应力感受细胞接收到生物力应力信号后,经翻译加工,产生一定的生物化学信号物质以“告知”生物效应细胞,引导其产生相应的生物学效应的生物力转导过程^[3]。骨细胞在成熟的骨组织内数量多且分布广泛,彼此通过间隙连接形成极高的交联度,被认为是生物力转导中最主要的应力感受细胞。

Tatsumi 等^[4]给在骨细胞表面特异性表达白喉毒素受体(diphtheria toxin receptor, DTR)的转基因小鼠注射白喉毒素,致 70%~80%的骨细胞消融,对该种小鼠进行悬尾试验,结果在骨细胞缺乏时,机体不能感受到载荷的降低,故而不会出现由此导致的骨丧失。由此证明,骨细胞对骨生物力转导具有重要的作用。生物力激活的骨细胞内的 Wnt 信号通路,在多种调控因子作用下调节相应基因的表达,影响骨的改建。

1 骨细胞与 Wnt 信号通路

Wnt 蛋白家族由 19 种高度保守的富含半胱氨酸的非可溶性分泌型糖蛋白组成。Wnt 蛋白从组织学角度分为 Wnt-1、Wnt-3a、Wnt-8 和 Wnt-10b 经典型, Wnt-4、Wnt-5a 和 Wnt-11 非经典型。经典型 Wnt 蛋白与跨膜蛋白低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)-5、6 以及卷曲蛋白(frizzled, Frz)受体结合形成复合物,使细胞质内的蓬松蛋白(dishevelled, Dsh)磷酸化并转移到细胞膜上,从而抑制糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase, GSK)-3 β 对 β -连环蛋白的磷酸化, β -连环蛋白蓄积并进入细胞核,与 T 细胞因子/淋巴细胞增强子结合并调节基因转录^[5-6],从而构成了经典的 Wnt/ β -连环蛋白信号通路;非经典型 Wnt 蛋白以不依赖于 β -连环蛋白转录功能的形式激活 Wnt 信号通路,包括非经典的 Wnt/钙离子通路、平面细胞极性通路和蛋白激酶 A 通路^[7-8]。

Wnt 信号通路参与了骨对生物力刺激的适应性反应,且在作为最主要应力感受细胞的骨细胞中存在着 Wnt 信号通路的激活^[9-10]。生物力可诱导

[收稿日期] 2011-02-15; [修回日期] 2011-12-14

[作者简介] 李昕(1986—),女,四川人,硕士

[通讯作者] 朱智敏, Tel: 028-85502141

骨细胞中 β -连环蛋白核向迁移,然而问题在于这种现象缘于生物力刺激诱导的骨细胞内功能性 Wnt 蛋白产物的形成,还是其直接作用于 β -连环蛋白的结果呢。Santos 等^[11]分析了 MLO-Y₄ 骨细胞样细胞受脉动流体作用后,其内与经典 Wnt 信号通路相关的蛋白,例如 Wnt-3a,分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related protein, sFRP)-4, LRP-5、6, β -连环蛋白等以及与非经典通路相关的蛋白 Wnt-5a 等的表达。结果除 Wnt-5a 外,其余均在 MLO-Y₄ 骨细胞中表达上调。在该试验中, MLO-Y₄ 骨细胞由流体剪切力诱导的 Wnt 经典靶基因 cd44、连接蛋白(connexin, cx)-43 和 c-jun 的表达均可被 Wnt 拮抗剂 sFRP-4 明显降低。由此证实,生物力刺激可调控骨细胞中 Wnt 信号通路蛋白的表达。

此外,LRP-5 对骨生物力转导亦具有重要的作用。lrp-5^{-/-}基因小鼠的尺骨受载后的成骨反应降低了 88%~90%,而成骨细胞的招募和激活未受影响。lrp-5 基因发生 G171V 突变的小鼠在废用状态下较野生型小鼠的骨量丧失明显减少,而因非生物力原因如卵巢摘除丧失的骨量,二者间差异无统计学意义^[12]。以上结果证实,LRP-5 影响骨生长代谢的主要方式是其对生物力信号的反应。在生物力刺激下,LRP-5 在 MLO-Y₄ 骨细胞中的表达为 MC3T3-E₁ 成骨细胞样细胞的 66 倍,即 LRP-5 可能在骨细胞 Wnt 信号通路生物力刺激信号转导中扮演着重要的角色^[11]。

2 骨细胞中 Wnt 信号通路的调控因子

Wnt 信号通路之所以能够在受载后得以快速激活,是多种调控因子在生物力作用下对其产生影响的结果。其中,备受关注的因子有一氧化氮、地诺前列素、硬化蛋白(sclerostin/SOST)、细胞外蛋白(dickkopf, DKK)-1 和雌激素受体(estrogen receptor, ER)- α 等。

2.1 一氧化氮

一氧化氮是体内已知的介导骨对生物力刺激发生合成代谢反应的早期信号分子。内皮和神经元一氧化氮合酶在骨细胞中均有表达,且二者在骨折患者的骨细胞中的表达水平均有所下降,即一氧化氮调节作用削弱以最大限度地控制骨吸收^[13]。一氧化氮的合成在分离出的骨细胞受到生物力刺激后得以快速增多。以(0.7 \pm 0.3) Pa、5 Hz 的脉动流体作用于体外培养的 MLO-Y₄ 骨细胞之

后 30 min,可维持细胞内 β -连环蛋白水平的稳定并由此引发 Wnt 信号通路的激活,且该效应可被外源性一氧化氮合酶抑制剂 N-硝基-精氨酸甲酯所抑制^[14];而脉动流体从加力后 5~60 min,可明显地提高 MLO-Y₄ 骨细胞中的一氧化氮合成;同时,N-硝基-精氨酸甲酯可阻止该细胞中 Wnt 靶基因 cd44、cx-43 和 c-jun 的表达增高^[13]。以上结果皆证实,一氧化氮的确参与了生物力刺激诱导的骨细胞早期 Wnt 信号通路的活化。

2.2 地诺前列素

地诺前列素作为局部调控因子,在骨改建过程中同样扮演着重要的角色。Kamel 等^[15]证实,外源性地诺前列素的加入可引起 MLO-Y₄ 骨细胞中 β -连环蛋白的核向迁移,各种水平的脉动流体剪切力均可以快速诱导多量的地诺前列素合成。Liu 等^[16]使用 68 kPa、0.5 Hz 的循环水压作用于 MLO-Y₄ 骨细胞,引起了时间依赖的地诺前列素合成的关键酶环加氧酶(cyclo-oxygenase, COX)-2 的 mRNA 水平增高(其在 1 h 后上调 65%,2 h 后上调作用受到抑制)。该结果可使细胞内地诺前列素合成增多并由半通道向细胞外释放,经自分泌途径最终促进成骨^[7]。

地诺前列素信号与 Wnt 信号通路间的交互作用,尚涉及骨细胞表达的地诺前列素受体和整联蛋白途径:由半通道释放的地诺前列素与骨细胞表达的地诺前列素受体结合,导致三聚体 G 蛋白和与之关联的受体激活。其中,一方面 G _{$\beta\gamma$} 亚单位激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI₃K),致蛋白激酶 B 磷酸化,最终通过 GSK-3 β 磷酸化维持细胞内 β -连环蛋白水平的稳定和 Wnt 信号通路的活化;另一方面, G _{α} 亚单位与轴抑制蛋白(axis inhibitor, Axin)结合,促进 β -连环蛋白降解复合物的解聚^[7]。PI₃K 抑制剂 LY-294002 和局部黏着斑激酶-14 抑制剂可抑制脉动流体诱导的 MLO-Y₄ 骨细胞中 β -连环蛋白的稳定和 Wnt 靶基因 cd44、cx-43、细胞周期蛋白 D₁ 及 c-fos 的表达上调^[14]。这不仅证实了 PI₃K 在以上作用机制中的地位,还为黏着斑激酶-14 介导的整联蛋白途径参与地诺前列素和生物力介导的信号通路共同诱导的经典 Wnt/ β -连环蛋白信号通路激活理论提供了有力的证据。

2.3 硬化蛋白

硬化蛋白/SOST 单克隆抗体(Scl-Ab)皮下注射右下肢制动的大鼠模型试验^[17]和基因敲除的小

鼠模型试验^[18]证实,由 *sost* 基因编码的硬化蛋白是骨形成强有力的负调控因子,其特点是分子中含有的一个胱氨酸结模体^[19],可促进成骨细胞程序性死亡,抑制成骨细胞增殖。*sost* mRNA 在许多组织尤其是在胚胎发生过程中表达,但就硬化蛋白而言,有研究认为其在不同的骨形成细胞中有差异性表达^[20];亦有研究^[21]认为其只在出生后埋于矿化基质中的终末分化细胞(如骨细胞)中表达,在成骨细胞、破骨细胞或骨表面衬里细胞中不表达。

硬化蛋白抑制由 Wnt 信号通路介导的骨形成机制尚无定论,比较清楚的是其与 LRP-5、6 分子的头两个 β -螺旋结构域结合后,拮抗由后者引起的 Wnt 信号通路的活化^[19]。因 Wnt 信号通路存在于骨细胞中,故硬化蛋白可能通过诱导骨细胞中其他下游信号活化(后者被传递至成骨细胞)而发挥抑制骨形成的作用^[7,10]。

骨细胞中硬化蛋白的表达受多种因素的调控,其中包括生物力^[20]。Robling 等^[22]以尺骨加载和鼠尾悬吊下肢减载法研究生物力对硬化蛋白表达的影响,结果在加载后的骨密质和骨小管中,硬化蛋白染色阳性的骨细胞数均明显下降,同时伴成骨率增高,且受力越大的部位,以上变化越显著;而下肢减载后,硬化蛋白染色阳性的骨细胞数无明显变化,*sost* mRNA 转录水平的变化差异亦无统计学意义。另外,*sost* 基因敲除的转基因鼠骨受载后,其经典 Wnt 信号通路不发生改变^[23]。骨细胞靶向消融的转基因小鼠,经鼠尾悬吊减载后,其 *sost* mRNA 水平不变^[4]。以上结果均证明了骨细胞分泌的硬化蛋白受生物力调控,经 Wnt 信号通路引起成骨受限的理论的合理性;然而,该结果是单纯由生物力致使 *sost* 转录受抑制所引起的,或者可同时引起蛋白水解酶基因的表达致硬化蛋白水平下调,尚需进一步的研究。

2.4 细胞外蛋白-1

MacDonald 等^[24]建立了 Dkk-1 低表达的转基因小鼠模型,用显微 CT 观察其 8 周大时的骨切片,结果显示骨小梁数目及其体积和厚度均明显增高,其程度与 Dkk-1 水平呈反比。该结果在平时受力最频繁的大腿骨尤其明显。Dkk-1 可通过与跨膜蛋白 LRP-5、6 以及穿膜蛋白(kremen)结合,使 LRP 内化并降低其与 Wnt 和 Frz 形成复合体的能力,故被认为是经典的 Wnt 信号通路的负调控因子。Dkk-1 在成人骨组织中主要由成熟的成骨细

胞和骨细胞表达^[7]。在 Robling 等^[22]的试验中,尺骨加力 24 h 可引起 *dkk-1* 基因的转录水平下调 49%,但与 *sost* 基因相比较,*dkk-1* 基因的表达水平为前者的 1/10 左右。即在生物力诱导的 Wnt 信号通路活化过程中,硬化蛋白较之 Dkk-1 占有更主导的调节地位。

2.5 雌激素受体- α

ER 属于转录因子家族成员之一,通过与其配体的结合被激活,从而调控相应基因的表达。例如,ER- α 可在骨细胞、成骨细胞和破骨细胞中表达。经典的 ER- α 途径由雌激素结合至 ER- α ,使其磷酸化二聚并易与特异性 DNA 区段结合进而调控转录;非经典的 ER- α 途径的活化则无需依赖雌激素^[25]。

ER- α 可以通过与 Wnt 信号通路的交互作用调节成骨细胞受生物力刺激后的早期基因表达。在 Liedert 等^[26]的研究中,作为激动剂的雌二醇对生物力引起的 MC3T3-E₁ 细胞的 Cox-2 的表达具有“敏感化”作用(与对照组相比 Cox-2 表达上调 7.2 倍),并显示与 ER- α 相关的“配体特异性”;该“敏感化”作用可受阻于 GSK-3 β 抑制剂,也即为 Wnt 激动剂的氯化锂。雌激素改变骨对生物力负荷的适应性反应的“阈值”的能力,缘于骨组织细胞中表达的 ER- α 的数目与功能的间接影响^[24]。然而,以上关于 ER- α 与 Wnt 信号通路交互作用的研究成果均限于成骨细胞系,其相关机制是否也存在于骨细胞中,尚需进一步的研究。

3 结束语

综上所述,骨细胞作为最主要的应力感受细胞,受载后可引起内部 Wnt 蛋白产物的表达及经典 Wnt/ β -连环蛋白通路的快速激活。该过程受诸多调控因子的影响,最终调节其基因表达。经典 Wnt 信号通路在骨细胞生物力刺激信号转导中的作用和反应机制逐渐为人们所了解,但仍有诸多课题有待深入研究。例如应力的种类、大小、频率与细胞中 Wnt 信号通路激活的量效关系,应力作用下骨细胞内 Wnt 信号通路调控基因表达的确切机制,骨细胞经 Wnt 信号通路对其他骨骼细胞的调控机制等等。另外,现有研究仍主要集中在经典 Wnt 信号通路方面,而对非经典 Wnt 信号通路在生物力引起骨细胞反应和骨改建过程中可能起到的作用仍缺乏了解。对 Wnt 信号通路的深入研究有助于认识骨组织的各种生理病理现象,了

解应力在某些骨疾病的发病机制和创伤修复过程中的作用,对相关基础研究和临床治疗实践都具有重要的意义。

4 参考文献

- [1] Wang JH, Thampatty BP. An introductory review of cell mechanobiology[J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2006, 5(1):1-16.
- [2] 郑翼, 陈国平, 周征, 等. 机械压力对成骨样细胞增殖活性及功能状态的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2002, 20(1):18-20.
- [3] Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation[J]. *Bone*, 2000, 26(5):417-422.
- [4] Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction[J]. *Cell Metab*, 2007, 5(6):464-475.
- [5] Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction[J]. *Nature*, 2000, 407(6803):530-535.
- [6] Chen Y, Whetstone HC, Youn A, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(1):526-533.
- [7] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling[J]. *Bone*, 2008, 42(4):606-615.
- [8] Frances M, Kong WN. Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 310(1/2):52-62.
- [9] Jansen JH, Eijken M, Jahr H, et al. Stretch-induced inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in mineralizing osteoblasts[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(3):390-396.
- [10] Hens JR, Wilson KM, Dann P, et al. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading *in vitro*[J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(7):1103-1113.
- [11] Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, et al. Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes[J]. *J Orthop Res*, 2009, 27(10):1280-1287.
- [12] Sawakami K, Robling AG, Ai M, et al. The Wnt coreceptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(33):23698-23711.
- [13] Caballero-Alias AM, Loveridge N, Pitsillides A, et al. Osteocytic expression of constitutive NO synthase isoforms in the femoral neck cortex: A case-control study of intra-capsular hip fracture[J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(2):268-273.
- [14] Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, et al. Early activation of the b-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):364-369.
- [15] Kamel MA, Picconi JL, Lara-Castillo N, et al. Activation of β -catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE₂: Implications for the study of mechanosensation in bone[J]. *Bone*, 2010, 47(5):872-881.
- [16] Liu C, Zhao Y, Cheung WY, et al. Effects of cyclic hydraulic pressure on osteocytes[J]. *Bone*, 2010, 46(5):1449-1456.
- [17] Tian X, Jee WS, Li X, et al. Sclerostin antibody increases bone mass by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a hindlimb-immobilization rat model[J]. *Bone*, 2011, 48(2):197-201.
- [18] Li X, Ominsky MS, Niu QT, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength[J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(6):860-869.
- [19] Weidauer SE, Schmieder P, Beerbaum M, et al. NMR structure of the Wnt modulator protein sclerostin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380(1):160-165.
- [20] Papanicolaou SE, Phipps RJ, Fyhrie DP, et al. Modulation of sclerostin expression by mechanical loading and bone morphogenetic proteins in osteogenic cells[J]. *Biorheology*, 2009, 46(5):389-399.
- [21] Moester MJ, Papapoulos SE, Löwik CW, et al. Sclerostin: Current knowledge and future perspectives[J]. *Calcif Tissue Int*, 2010, 87(2):99-107.
- [22] Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical stimulation of bone *in vivo* reduces osteocyte expression of *sost/sclerostin*[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9):5866-5875.
- [23] Lin C, Jiang X, Dai Z, et al. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading via antagonizing Wnt/beta-catenin signaling[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(10):1651-1661.
- [24] MacDonald BT, Joiner DM, Oyserman SM, et al. Bone mass is inversely proportional to Dkk₁ levels in mice[J]. *Bone*, 2007, 41(3):331-339.
- [25] Lee KC, Lanyon LE. Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor α [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2004, 32(2):64-68.
- [26] Liedert A, Wagner L, Seefried L, et al. Estrogen receptor and Wnt signaling interact to regulate early gene expression in response to mechanical strain in osteoblastic cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(3):755-759.

(本文编辑 刘世平)