

Nel 样 1 型分子对成骨细胞分化的分子调控机制

周海华¹综述 李祖兵²审校

(1. 口腔基础医学省部共建国家重点实验室培育基地和口腔生物医学教育部重点实验室, 武汉大学口腔医学院; 2. 武汉大学口腔医院口腔颌面外科 湖北 武汉 430079)

[摘要] Nel 样 1 型分子(Nel-1)是一种新的重要的生长因子, 其基因主要在成骨细胞的分化和程序性死亡阶段发挥重要的作用。下面着重就 nell-1 基因与转化生长因子和成纤维细胞生长因子, nell-1 基因在介导成骨细胞分化过程中的作用和相关分子信号途径, Nel-1 蛋白对成骨细胞和成软骨细胞胞外基质蛋白的调控作用等作一综述。

[关键词] Nel 样 1 型分子; 成骨细胞; 细胞分化; 调控机制

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.02.012

Molecular regulation mechanism of Nel-like type 1 molecule to the osteoblast differentiation ZHOU Hai-hua¹, LI Zu-bing². (1. The State Key Laboratory Breeding Base of Basic Science of Stomatology(Hubei-MOST) & Key Laboratory of Oral Biomedicine Ministry of Education, School & Hospital of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China)

[Abstract] Nel-like type 1 molecule(Nel-1) is one of the novel growth factors with important biological function on the differentiation and apoptosis of osteoblasts. This review emphasized on the gene expression cascades between nell-1 and transforming growth factor or fibroblast growth factor, the signal regulation mechanisms and associated molecular signal pathways of nell-1 regulating the differentiation of osteoblasts. The effect of Nel-1 regulating the extracellular matrix(ECM) proteins that are necessary in osteogenesis and chondrogenesis has also been discussed.

[Key words] Nel-like type 1 molecule; osteoblast; cell differentiation; regulation mechanism

在正常情况下, 成骨细胞主要是合成和向细胞外分泌各种细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 促进这些 ECM 沉积并最终形成致密的骨组织结构。成骨细胞的分化和程序性死亡等骨形成过程受到成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等外界多种信号的调控。Nel 样 1 型分子(Nel-like type 1 molecule, Nel-1)对成骨细胞的分化和程序性死亡进行着精细地调控, 对骨发育尤其是颅颌面骨发育有着明显的影响, 下面就 Nel-1 蛋白影响成骨细胞分化的研究进展

作一综述。

1 nell-1 基因与 FGF-2 和 TGF- β_1

由于 nell-1 基因与 TGF- β 、FGF 在成骨细胞发育过程中的表达具有时空特异性, 因此揭示其在成骨细胞发育信号通路上的相互作用机制具有重要的意义。由于 FGF-2、TGF- β_1 和 BMP 直接调控核心结合因子(core binding factor- α_1 , Cbf- α_1)的表达, 而 Nel-1 蛋白则受 Cbf- α_1 的直接调控^[1-3], 因此 nell-1 也应当是 FGF-2、TGF- β_1 和 BMP 的下游基因^[4]。后经研究发现, 除 BMP-2 对 nell-1 基因不起作用外, FGF-2 和 TGF- β_1 可以使 nell-1 基因的表达上调, 从而初步证实 nell-1 基因是 FGF-2 和 TGF- β_1 的下游信号分子。Zhang 等^[5]在以 nell-1 基因重组腺病毒载体(AdNel-1)转染 MC3T3-E₁ 成骨细胞的过程中发现, FGF-2、TGF- β_1 和 Cbf- α_1 及其受体家族的表达均无明显

[收稿日期] 2009-05-18; [修回日期] 2009-10-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30872892); 武汉大学 2008 年博士研究生(含 1+4)自主科研基金资助项目(70)

[作者简介] 周海华(1981—), 男, 广西人, 博士

[通讯作者] 李祖兵, Tel: 027-87686125

变化,即再次说明 *nell-1* 基因是 FGF-2、TGF- β_1 和 Cbf- α_1 的下游信号分子。这样 *nell-1* 基因与 FGF-2 和 TGF- β_1 在细胞中表达的时空关系得以揭示,说明 *nell-1* 基因通过调控其他下游候选基因或信号通路介导成骨细胞分化。

2 *nell-1* 基因在介导成骨细胞分化过程中的作用和相关分子信号途径

2.1 *Nell-1* 蛋白介导成骨细胞分化的相关标志物

在体外实验中,维生素 C 和 β -甘油磷酸钠对成骨细胞的分化和骨矿化形成至关重要。在成骨细胞分化过程中,会产生骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙蛋白(osteocalcin, OC)和骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)等骨基质蛋白标志物,这对于研究其相关基因调控机制有重要的作用。在正常培养条件下,*nell-1* 基因过表达能加速颅成骨细胞的分化和矿化;反之 *nell-1* 基因表达下调,则抑制成骨细胞的分化^[5]。

为寻找 *Nell-1* 蛋白促进成骨细胞分化的证据,Aghaloo 等^[4]在以 Ad*Nell-1* 转染成骨细胞 MC3T3-E₁ 以分析骨形成标志物时发现,在成骨细胞分化的早期,其标志物碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)显著下降;在中期,标志物 OPN 显著上调;在晚期,标志物 OC 显著上调并逐渐达到顶峰。成骨细胞特异性转录因子(osteorix, OSX)在 Ad*Nell-1* 作用前期显著下降,而在 *Nell-1* 蛋白明显下降后开始稳步上升。以上结果说明,*Nell-1* 蛋白在成骨细胞分化的晚期起作用,同时 *Nell-1* 蛋白还会抑制 OSX 的表达。Aghaloo 等^[4]在以聚乳酸聚乙醇酸共聚物支架携带 *Nell-1* 蛋白修复大鼠颅骨缺损的实验中发现,OSX 下降,BSP、OC 和 BMP-7 上调。其中,BSP 为羟磷灰石的晶核,能够调控矿化;BSP 在结合胶原纤维时表现出较强的亲和力,可介导细胞的连接;BSP 还能促使未分化的间充质细胞向成骨细胞分化。另外,BMP-7 能刺激成骨细胞分化。以上结果表明,成骨细胞在 *Nell-1* 蛋白作用下加速分化并进入矿化阶段,成骨细胞最终实现向骨细胞的转化。

2.2 *Nell-1* 和 Cbf- α_1 在成骨细胞分化过程中的相互作用

Cbf- α_1 是 runt-domain 基因家族的骨特异性转录调节因子,在成骨细胞分化过程中起着关键的调节作用。在小鼠中选择性地敲除 *cbf- α_1* 基

因,结果其基因表达在骨发育中必不可少。基因敲除的纯合子(*cbf- α_1 ^{-/-}*)小鼠,因无肋骨致不能呼吸而在出生后立即死亡。此类小鼠软骨内成骨和膜内成骨完全丧失,体内没有成熟的成骨细胞形成。基因敲除的杂合子(*cbf- α_1 ^{+/-}*)小鼠,锁骨发育不全和颅骨发育迟缓,异常的骨骼与人锁骨颅骨发育不全综合征症状相似。Cbf- α_1 可促进成骨细胞下游转录因子如 型胶原、BSP、OPN 和 OC 的表达,而且 *cbf- α_1* 基因通过结合这些基因启动子区域上的成骨细胞特异性顺式作用元件(osteoblast-specific cis-acting element, OSE)-2 后促使其相关基因表达^[6]。

Truong 等^[7]应用生物信息学方法对人类 *nell-1* 基因 5' 末端侧翼序列启动子进行分析,在转录起始位点上游 2.2 kb 范围内的 767、972 和 1 600 bp 位置上,共识别到 3 个 OSE-2;而 *cbf- α_1* 基因则通过直接与这 3 个 OSE-2 结合后再激活人类 *nell-1* 启动子,从而使 *nell-1* 基因的表达上调。以上结果表明,*nell-1* 是 *cbf- α_1* 的靶基因,*Nell-1* 蛋白是 Cbf- α_1 介导成骨细胞分化的下游调控因子。进一步的研究显示,*cbf- α_1* 与 *nell-1* 启动子上的所有 OSE-2 都结合以后,才能使 *nell-1* 基因表达最大化。可以说 *cbf- α_1* 基因在成骨细胞分化中起着主开关作用。

2.3 促丝裂原激活蛋白激酶信号通路在 *Nell-1* 介导成骨细胞分化中的作用

促丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)属丝氨酸/苏氨酸双重磷酸化能力的蛋白质激酶。MAPK 信号转导途径是细胞外信号引起细胞核内反应的通道之一,参与细胞的形成、运动、分化和生长繁殖等多种生理过程。其基本的信号转导通路为:细胞外信号→受体→募集鸟核苷酸交换因子→鸟苷三磷酸与鸟苷二磷酸交换→启动 MAPK 链→MAPK 转入核内→核内事件→生物效应。目前,在真核细胞中已确定的 MAPK 信号转导通路包括:细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-jun 氨基末端激酶(c-Jun NH₂-terminal kinase, JNK)和 P38 激酶等通路。研究显示,ERK、JNK 和 P38 激酶通路皆参与了成骨细胞分化增殖的信号转导,并且在应急、程序性细胞死亡、骨质代谢和炎症中发挥重要作用。

在已知 *Nell-1* 是一种细胞外蛋白并能介导成

骨细胞分化和骨形成的基础上,为探索 Nell-1 蛋白激活细胞内信号级联反应的机制, Bokui 等^[8]采用高纯度重组人 Nell-1-VH 蛋白处理未经血清培养的大鼠胚胎颅盖骨细胞 10~20 min, 结果显示: 经人 Nell-1-VH 蛋白处理后磷酸化的 ERK₁₋₂ 和 JNK₁₋₃ 密度大约是对照组的 22 倍, 而 P38_{α,β,γ} 的磷酸化则较弱, 仅为对照组的 5 倍。根据以往的研究结果, 加入 FGF-2、胰岛素样生长因子-1 或 ECM 刺激成骨细胞分化时, 转录因子 Cbf-α₁ 经 ERK₁₋₂ 磷酸化后实现其调控成骨细胞分化的作用^[9-12]。而在该实验中经 Nell-1 蛋白处理后, Cbf-α₁ 蛋白明显被磷酸化。故推测在该实验中, Cbf-α₁ 蛋白的磷酸化也是由 ERK₁₋₂ 介导的。

整联蛋白是一类重要的细胞表面受体^[13], 层粘连蛋白-5、纤连蛋白、玻连蛋白和血小板反应蛋白(thrombospondin, TSP)-1、2 等 ECM 蛋白能够与整联蛋白家族相互作用^[14], 通过活化黏着斑激酶后间接激活 Ras-MAPK 级联反应, 再通过 Cbf-α₁ 蛋白实现成骨细胞的分化。无独有偶的是, 人类 Nell-1 蛋白的 N 末端区域与 ECM 上的层粘连蛋白-G 结合区高度相似, 与人类 TSP-1 相对应区域的相似性高达 22% 以上。即人类 Nell-1 蛋白也有可能充当 ECM 蛋白的角色: 与成骨细胞上的整联蛋白受体结合后激活或抑制酪氨酸激酶, 在短时间内激活 MAPK 信号级联反应并介导 Cbf-α₁ 蛋白的磷酸化, 促进酪氨酸磷酸化蛋白在细胞内迅速聚集, 最终导致成骨细胞分化。

3 Nell-1 对成骨细胞和成软骨 ECM 蛋白的调控作用

ECM 蛋白不仅具有连接、支持、保水、抗压和保护等物理学作用, 而且在细胞的基本生命活动中发挥着全方位的生物学作用: 影响细胞的存活与死亡、决定细胞的形状、调节细胞的增殖、控制细胞的分化和影响细胞的迁移等。Desai 等^[15]通过乙酰基亚硝基脲诱导新生小鼠 nell-1 基因点突变, 将其交配繁殖后获得 nell-1^{6R}(17R^{6R}) 突变小鼠, 再对其相关基因进行筛选检测。结果大部分基因编码的 ECM, 如特型胶原、凝血酶敏感蛋白和腱糖蛋白等明显下降, 而这些蛋白对促进成骨、成软骨细胞间的黏附和细胞间通讯以及维持组织结构强度和弹性起着不可替代的作用。因此不难理解, nell-1 基因突变纯合子新生小鼠所表现出的颅顶骨、脊椎和肋支架的缺损畸形。由此

可见在骨发育过程中, Nell-1 蛋白对 ECM 蛋白具有不可替代的重要的调控作用。

4 结束语

综上所述, Nell-1 蛋白既对成骨细胞分化具有特异而重要的调控作用, 也对 ECM 的产生具有明显地调控作用, 对胚胎以及后天骨的发育造成了较大影响。由于 Nell-1 蛋白来源于神经嵴细胞, 在颅颌面骨发育组织中特异性表达, 同时 Nell-1 蛋白对成骨细胞的特异性作用取决于成骨细胞是否处于分化期, 因此, Nell-1 蛋白的调控作用具有细胞周期特异性。相对于其他的诱导成骨生长因子, Nell-1 蛋白的异位成骨效应最低, 而且 Nell-1 蛋白过高表达也不会产生明显的细胞毒性作用; 因此, Nell-1 蛋白的生物安全性较高, 在骨组织工程和临床治疗中具有较大的应用价值^[4, 16]。另外, Nell-1 与 BMP 的联合应用在促进骨再生方面相得益彰^[17]。但是, 由于 nell-1 基因及其蛋白被发现的时间不长, 其作用机制尚不明, 因此, 尚有较大的研究潜能。随着细胞分子生物的研究日渐深入, 生物信息技术逐步改进, 则 nell-1 基因及其蛋白影响骨发育的相关研究将会不断取得新的突破。

5 参考文献

- [1] Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx-2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein[J]. *Oncogene*, 2002, 21(47): 7156-7163.
- [2] Cowan CM, Soo C, Ting K, et al. Evolving concepts in bone tissue engineering[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 66: 239-285.
- [3] Fromigué O, Modrowski D, Marie PJ. Growth factors and bone formation in osteoporosis: Roles for fibroblast growth factor and transforming growth factor beta[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(21): 2593-2603.
- [4] Aghaloo T, Cowan CM, Chou YF, et al. Nell-1-induced bone regeneration in calvarial defects[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(3): 903-915.
- [5] Zhang X, Kuroda S, Carpenter D, et al. Craniosynostosis in transgenic mice overexpressing Nell-1[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(6): 861-870.
- [6] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, et al. A Cbf-α₁ dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(8): 1025-1036.
- [7] Truong T, Zhang X, Pathmanathan D, et al. Craniosynostosis

- tosis-associated gene *nell-1* is regulated by *runx-2*[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(1) :7-18.
- [8] Bokui N, Otani T, Igarashi K, et al. Involvement of MAPK signaling molecules and *Runx-2* in the *NELL1*-induced osteoblastic differentiation[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(2) : 365-371.
- [9] Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, et al. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, *Cbfa-1/Runx-2*[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(39) :36181-36187.
- [10] Qiao M, Shapiro P, Kumar R, et al. Insulin-like growth factor-1 regulates endogenous *RUNX-2* activity in endothelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/ERK-dependent and Akt-independent signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41) :42709-42718.
- [11] Xiao G, Jiang D, Thomas P, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, *Cbfa-1*[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(6) :4453-4459.
- [12] Klees RF, Salasnyk RM, Kingsley K, et al. Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(2) :881-890.
- [13] Shyy JY, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress[J]. *Circ Res*, 2002, 91(9) :769-775.
- [14] Calzada MJ, Sipes JM, Krutzsch HC, et al. Recognition of the N-terminal modules of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 by alpha6 beta1 integrin[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42) :40679-40687.
- [15] Desai J, Shannon ME, Johnson MD, et al. *Nell-1*-deficient mice have reduced expression of extracellular matrix proteins causing cranial and vertebral defects[J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(8) :1329-1341.
- [16] Lu SS, Zhang X, Soo C, et al. The osteoinductive properties of *Nell-1* in a rat spinal fusion model[J]. *Spine J*, 2007, 7(1) :50-60.
- [17] Cowan CM, Jiang X, Hsu T, et al. Synergistic effects of *Nell-1* and *BMP-2* on the osteogenic differentiation of myoblasts[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(6) :918-930.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第162页)

了很大的困难。小儿痛阈低，对疼痛敏感性高，大脑控制能力差，对疼痛的反应强烈^[1]，所以术中稳定的血流动力学指标，术后苏醒迅速以及能提供足够的镇痛是提高此类手术麻醉安全性的基本要求。但小儿中枢神经系统发育不成熟，脑血流量占心排血量的比例较成人高，故脂溶性的药物对其起效更快、效能更强、消失更慢。小儿呼吸中枢发育不完善，术后易发生呼吸系统的并发症，这些特点使患儿对吸入麻醉药或强效阿片类药的敏感性增加，容易出现呼吸抑制、苏醒延迟和术后躁动等不良反应。关于雷米芬太尼血流动力学的研究表明，其在各年龄组中都有被快速清除的特性且不依赖于心输出量和肝肾的功能，可被组织和血液中非特异性酯酶在肝外持续水解，还能有效地抑制术中伤害性刺激引起的血流动力学反应，使患者术中血压和心率相对稳定，且其起效迅速、消除快、不受持续输注时间的影响，停药后血浆浓度消除的半衰期为 3~5 min^[2]，是一种理想的麻醉性镇痛药。丙泊酚是一种快速、短效的静脉全麻药，而且具有长效的镇吐作用，与雷米芬太尼联合应用可产生协同作用^[3]，既满足手术需要又可预防患儿术后的呕吐，本次研究中也未出现有呕吐的病例。采用微量泵持续静脉注射雷米芬太尼 0.05~0.10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 和复合丙泊

酚 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 对小儿呼吸的影响不大，可以保留其自主呼吸。R 组的患儿血流动力学指标稳定，全部在停药后 5~8 min 内清醒。苏醒时间为(5.0±3.8) min、拔管时间为(5.2±3.5) min、出室时间为(10.0±4.8) min，明显缩短了患儿术后苏醒时间、拔管时间和出室的时间，患儿术后苏醒快^[4]且质量高，提高了麻醉的安全性。

总之，雷米芬太尼复合丙泊酚静脉麻醉用于小儿唇裂修复术，具有易控、安全、苏醒快和并发症少等优点，是一种较为理想的麻醉方法。

4 参考文献

- [1] 倪家骥. 小儿疼痛治疗[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2001, 7(3) :40-42.
- [2] 魏灵欣, 邓晓明, 刘建华, 等. 小儿丙泊酚、雷米芬太尼全凭静脉麻醉与丙泊酚、芬太尼和氧化亚氮复合麻醉的比较[J]. *临床麻醉学杂志*, 2006, 22(2) :111-112.
- [3] Fechner J, Hering W, Ihmsen H, et al. Modelling the pharmacodynamic interaction between remifentanyl and propofol by EEG-controlled dosing[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2003, 20(5) :373-379.
- [4] Reves JG. Educational considerations for the clinical introduction and use of remifentanyl[J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(4 Suppl) :4-6.

(本文编辑 王 晴)