

OPG/RANKL/RANK 系统与骨破坏性疾病

刘继中¹ 纪宗玲² 陈苏民^{2*}

(第四军医大学¹ 西京医院全军骨科研究所;² 生物化学与分子生物学教研室 西安 710032)

摘 要 近年来发现的 OPG/RANKL/RANK 系统在破骨细胞生成中起着至关重要的作用,是骨骼生理研究领域的重大进展。成骨细胞、骨髓基质细胞、激活的 T 淋巴细胞表达 RANKL,与破骨细胞前体细胞或成熟破骨细胞表面上的 RANK 结合后,促进破骨细胞的分化及骨吸收活性。成骨细胞及骨髓基质细胞分泌表达 OPG 可与 RANKL 竞争性结合,从而阻断 RANKL 与 RANK 之间的相互作用。体内多种激素或因子通过影响骨髓微环境内的 OPG/RANKL 比率来调节骨代谢。此外,乳腺上皮细胞表达有 RANK,孕期在性激素的诱导下可表达 RANKL,OPG/RANKL/RANK 系统在孕期乳腺发育以及母体向胎儿的钙转运过程中发挥重要作用。阻断 RANKL/RANK 通路有望给骨质疏松、类风湿关节炎及癌症骨转移等骨破坏性疾病的治疗开辟新的途径。进一步研究应了解 OPG/RANKL/RANK 系统与其它信号传导途径的关系,重视骨骼、免疫及内分泌系统之间的相互作用。目前,开发与 OPG 功能相似或促进其表达的合成药物有可能成为具有良好经济效益和社会效益的产业。

关键词 骨保护素,破骨细胞生成,T 细胞,骨吸收

中图分类号 Q71 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2003)06-0655-06

OPG/RANKL/RANK 系统是近年来发现的在破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路,包括:RANKL(Ligand of receptor activator of NF- κ B),或称为破骨细胞分化因子(Osteoclast differentiation factor,ODF);其受体是位于破骨细胞细胞膜上的 RANK(Receptor activator of NF- κ B);RANKL 的假性受体骨保护素(Osteoprotegerin,OPG)。主要内容是:成骨细胞及骨髓基质细胞表达 RANKL,与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面上的 RANK 结合后,促进破骨细胞的分化及骨吸收活性。成骨细胞及骨髓基质细胞分泌表达 OPG 与 RANKL 竞争性结合,阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合。体内诸多激素和因子通过影响 OPG 或 RANKL 的表达来影响骨代谢。激活的 T 淋巴细胞、孕期乳腺上皮细胞可表达 RANKL,并在类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的骨质丢失、孕期乳腺及胎儿的发育等发挥重要作用。OPG/RANKL/RANK 系统将骨代谢、免疫系统和内分泌系统紧密地联系起来,并为骨质疏松、类风湿关节炎及癌症骨转移等骨破坏性疾病的治疗开辟了新的途径。

1 骨保护素—OPG

1997 年,美国 Amgen 公司研究小组^[1]在系统研究大鼠小肠 cDNA 文库时发现了一种新的细胞因子,根据其具有抑制破骨细胞分化和增加骨密度的功能而命名为骨保护素,Yasuda H 等^[2]从人胚胎肺纤维母细胞 IMR-90 的条件培养基中

纯化了一种能特异性抑制破骨细胞分化生成的糖蛋白,命名为破骨细胞生成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)。OPG 和 OCIF 与较早发现的 TNFR 相关分子-1(TNF related molecule-1, TR-1)^[3,4]及囊泡树突状细胞受体-1(Follicular dendritic cell receptor-1, FDCR-1)^[7]为同一物质。目前常用缩写名称 OPG。

OPG 属于 TNF 受体(Tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族,无疏水跨膜区,是含有 401 个氨基酸残基的肝素结合分泌型糖蛋白^[1,6],含 7 个结构域(D1~D7),有 21 个氨基酸的信号肽和 380 个氨基酸的成熟肽。人与大鼠 OPG 的蛋白结构有 85%同源。其 N-端 D1~D4 区(1 至 185 位的半胱氨酸)富含半胱氨酸,结构与 TNFR-2 和 CD40 有高度的保守性,为发挥生理功能所必需,此区编码的蛋白即具有抑制破骨细胞分化和骨吸收活性的功能。C-端的 D5、D6 区为两个紧密相连的死亡域,结构与 TNFR-1 和 Fas 的相似,与 Fas 的跨膜区融合表达后可直接介导细胞毒作用^[6]。D7 区含有肝素结合位点,与二聚体形成有关。OPG 蛋白有单体和二聚体两种形式,主要以二聚体形式存在于细胞外基质中。单体分子量 55~62kD,二聚体分子量约 110~120kD。单体和二聚体具有相似的热、酸稳定性和抑制破骨细胞生成的功能。在体内,OPG 单体具有更长的半衰期,而二聚体具有更强的肝素结合和降低血钙的能力^[7]。

OPG mRNA 广泛存在于肺、心、肾、胎盘、肝、胃、皮肤、

脑、脊髓、甲状腺和骨骼等组织,骨髓基质细胞、成骨细胞、成纤维细胞、主动脉平滑肌细胞、骨肉瘤 MG63 细胞、乳腺癌细胞 MCF-7,以及单核细胞、树突状细胞(Dendritic cell, DC)及 B 淋巴细胞中。OPG 广泛分布于多种组织细胞内,但局限在骨骼系统内部发挥作用,其机理不明。

OPG 的主要功能是抑制破骨细胞的分化,抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性并诱导其凋亡。在体外,1~40 ng/mL ($ED_{50} = 4 \sim 6$ ng)的 OPG 可抑制破骨细胞生成,在超过 11 d 的细胞培养时间中,有效作用时间范围是第 5~11 天^[8],而抑制成熟破骨细胞的骨吸收能力需要 50~1000 ng/mL。在体内,卵巢切除骨质疏松小鼠以每天 5 mg/kg 体重的剂量连续注射 OPG 2 周后,骨量明显上升,破骨细胞数量减少。OPG 转基因小鼠有全身性的骨质硬化,除有脾脏增大外,其它组织器官无异常。破骨细胞数量显著减少,但造血细胞和单核巨噬细胞系统正常^[1],说明 OPG 作用于破骨细胞分化的较为终末的阶段。OPG 基因敲除小鼠破骨细胞数量增多和严重的骨质疏松,约 60% 的动物伴有主动脉钙化^[9],近来发现 OPG 是内皮细胞存活的重要因子^[10],联想到骨质疏松妇女的动脉粥样硬化、中风等疾病的发生率明显升高,提示 OPG 可能在血管钙化的病理生理中发挥重要作用。

2 OPG 的结合蛋白—RANKL

应用 OPG 做探针筛选出 OPG 的结合蛋白,不同的研究小组分别命名为 OPLG(OPG ligand)^[11]和 ODF(Osteoclast differentiation factor)^[12],与先前发现的 TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine)^[13]和 RANKL^[14]为同一物质。常用缩写名称 RANKL。

RANKL 含有 317 个氨基酸,人与鼠 RANKL 有 83%~87% 同源。RANKL 有两种存在形式:一种是分子量为 40~45 kD 的跨膜结合蛋白,另一种是分子量为 31 kD 的游离型多肽,系从 140 或 145 位氨基酸残基上割裂下来的膜外区部分。膜结合型 RANKL 较游离型的生理功能强^[11,12]。RANKL 基因的启动子上具有 Cbfa-1(Core binding factor 1)的结合位点,Cbfa-1 基因敲除小鼠无 RANKL 的 mRNA 表达,说明 RANKL 的表达依赖于 Cbfa-1 活性,提示骨生成和骨吸收过程紧密相连^[15]。RANKL 在淋巴组织(淋巴结、胸腺、脾、胎肝)及骨组织(骨骼、骨髓)中含量高,而在心、胎盘、骨骼肌、胃和甲状腺等非淋巴样组织中仅有低度表达^[11,12]。成骨细胞、骨髓基质细胞、软骨基质周围的原始间充质细胞和肥大型软骨细胞以及激活的 T 淋巴细胞均表达 RANKL。

RANKL 可促进破骨细胞分化,增强成熟破骨细胞的活力,阻止破骨细胞凋亡^[11]。RANKL 与 M-CSF 是破骨细胞生成前体分化为成熟破骨细胞的必需因子。在小鼠全骨髓细胞培养系统中,RANKL 可促进破骨细胞的生成($ED_{50} = 1$ ng/mL),1~10 ng/mL 的 RANKL 能促进成熟破骨细胞的骨吸收功能,并具有剂量依赖性。正常小鼠静脉注射 RANKL 后 1 d 有明显的血钙升高,注射 3 d 后即有显著的骨量丢失。RANKL 还可阻止树突状细胞的凋亡,激活 T 细胞的 c-Jun N-

terminal kinase(JNK)促进 T 细胞增殖^[13]。上述作用均可被 OPG 阻断。RANKL 基因敲除小鼠有严重的骨质硬化,体内缺少成熟的破骨细胞,出牙受阻,骨骼变短变扁,关节生长板内的软骨细胞排列紊乱,并伴有免疫系统异常,包括缺乏成熟的 T 细胞和 B 细胞,甲状腺和淋巴结发育不良等。而注射外源性的 RANKL 后,骨骼畸形减轻,并有破骨细胞形成,说明 RANKL 基因敲除小鼠体内有破骨细胞前体细胞存在,提示 RANKL 作用于由前体细胞向成熟破骨细胞分化成熟的阶段。值得注意的是,RANKL 存在于在许多组织,但破骨细胞只有在骨骼微环境内才能分化成熟,说明可能存在着某种“组织特异性因子”并对 RANKL/RANK 系统的功能起调节规范作用。

3 RANKL 的受体—RANK

RANK 属于 TNFR 超家族^[16],是 616 个氨基酸的跨膜蛋白,人与鼠的 RANK 有 70% 同源。破骨细胞的前体细胞、成熟破骨细胞、软骨细胞及乳腺上皮细胞内均有 RANK 表达。RANK 基因敲除的小鼠因缺乏破骨细胞而表现为严重的骨质硬化,将转染有 RANK cDNA 的破骨细胞前体细胞注射入 RANK 基因敲除小鼠体内后,可启动破骨细胞生成及骨吸收。与 RANKL 基因敲除相似,RANK 基因敲除的小鼠缺乏周围淋巴结和成熟的 T、B 淋巴细胞,但胸腺发育正常,说明 RANK 是参与破骨细胞分化、成熟及发挥功能的重要因子。

RANKL 与破骨细胞表面的 RANK 结合后,激活的 RANK 将信号传入细胞内^[16]。RANK 膜内区有 3 个结合位点,与 TNFR 相关因子(TNF receptor-associated factors, TRAFs)中的 TRAF1、2、3、5 及 6 结合后,可激活转录因子 NF- κ B 和蛋白激酶 JNK,从而促进破骨细胞的增殖、分化、成熟及骨吸收活性。其中 TRAF6 起着关键的作用。TRAF6 基因敲除小鼠的骨骼系统表型与 RANKL 或 RANK 基因敲除的小鼠相似,并完全阻断了 NF- κ B 信号通路,而 JNK 信号通路只被部分阻断,提示还可能有的分子起到与 TRAF6 相似的作用。

RANKL/RANK/NF- κ B 被认为是介导破骨细胞分化成熟的最重要的信号通路,但并不是唯一的。在某些炎症性疾病中,白细胞介素-1(IL-1)和 TNF α 可分别与各自在破骨细胞表面的受体(IL-1R 及 TNFR1、TNFR2)结合,启动 NF- κ B 和 JNK 信号通路,促进破骨细胞生成及其骨吸收活性^[17,18]。在体外实验中,加入 IL-1R 的抗体或 TNFR1、TNFR2 的抗体可分别阻断破骨细胞的分化成熟,而加入 OPG 却无此作用。此外,在 RANK 基因敲除的小鼠中,注射入 IL-1 后无抗酒石酸酸性磷酸酯(TRAP)阳性细胞生成,而注射 TNF α 后,在注射部位周围有少量 TRAP 阳性细胞生成,说明 TNF α 可不依赖 RANKL/RANK 信号通路,而 IL-1 则依赖于 RANK 的表达。但少量的 RANKL 可以显著促进 TNF α 介导的破骨细胞生成作用,提示 TNF α 和 RANKL 的靶细胞相同,两者联系紧密。

因此,破骨细胞增殖、分化、成熟的信号传导有两个途径:主要途径是 RANKL/RANK/NF- κ B 或 JNK 通路;次要途径是 IL-1、TNF α 等炎症因子的非 RANKL/RANK 依赖通路。两个

通路之间有着密切的联系。

4 OPG/RANKL 的表达调控

人体骨骼是动态的不断变化的组织,每年约有 10% 的骨骼被更新,循环重复着骨吸收-骨重建,开始于破骨细胞的分化、成熟、迁移、附着于骨表面并完成骨吸收,随后是成骨细胞形成新骨。这个过程受着成骨细胞的调控:成骨细胞/骨髓基质细胞表达 RANKL,促进破骨细胞的分化及骨吸收;同时分泌 OPG,以防止骨吸收过度。在由骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中,成骨细胞分泌 RANKL 和 OPG 的比率不同^[19]。未成熟的成骨细胞/骨髓基质细胞分泌更多的 RANKL,而成熟的成骨细胞分泌更多 OPG,以确保骨吸收和骨形成两个过程紧密相连并达到平衡。妇女绝经、衰老、某些疾病(如类风湿性关节炎、Paget's 病、癌症骨转移等)或长期过量服用某种药物(如糖皮质激素等)等多种情况下,骨吸收超过了骨形成作用,导致骨质破坏或骨质疏松。破骨细胞数量增多、骨吸收能力增强是这些疾病的重要特征。进一步的研究发现,体内调控破骨细胞的多种因子和激素几乎都是通过影响 OPG 和 RANKL 的分泌,使 OPG/RANKL 比率失衡。例如,成骨细胞系在抑制骨吸收和促进骨形成的细胞因子,如 TGF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-18、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 及 BMP-2 的刺激下,OPG 的 mRNA 和蛋白表达量明显升高,相反,在促进骨吸收和抑制骨形成的细胞因子和药物(如 PGE $_2$ 、糖皮质激素以及雌激素受体拮抗物 ICI182,180)的作用下,OPG 的 mRNA 和蛋白表达量降低^[20 21 22 23 24]。可见,在体内骨吸收和骨形成的平衡关系中,OPG/RANKL 比率是一个重要的杠杆。

TGF- β 超家族(包括 TGF- β 、BMPs)对 OPG/RANKL 的调节是双向的。骨骼是 TGF- β 超家族成员的主要储存器官,骨骼在吸收过程中会释放大量的 TGF- β 和 BMPs。在 RANKL 和 M-CSF 的存在下,TGF- β 和 BMP-2 可以促进破骨细胞的分化及骨吸收功能^[32]。加入可溶性 TGF- β 受体-2 后,破骨细胞的形成过程完全被阻断,加入 BMP 受体 1A 也有类似作用。BMP 受体 1A 存在于破骨细胞前体及成熟破骨细胞表面,在 RANKL 的存在下,BMP-2 显著增加纯化的破骨细胞的成活时间^[33]。另一方面,BMP-2 促进 Smad 1 合成,后者与 OPG 启动子上的两个 Hox 位点结合,促进成骨细胞系 OPG 的分泌^[32]。因此,TGF- β 超家族的 Smad 信号传导通路可能与 OPG/RANKL/RANK 系统有密切的联系。两者之间作用的机制将更有助于明确成骨细胞和破骨细胞,以及骨形成与骨吸收过程之间的关系。

雌激素缺乏是绝经后骨质疏松的主要病因,雌激素促进 OPG 的表达,抑制 M-CSF 的分泌^[25]。由于 M-CSF 是破骨细胞增殖的重要因子,因此雌激素缺乏后破骨细胞的数量增多,骨吸收功能增强。注射重组 OPG^[1]或携带 OPG 编码区基因的重组腺病毒液^[26]后 2 周,卵巢切除骨质疏松小鼠的骨量明显增加,其他组织器官无异常。绝经后骨质疏松患者单次静脉注射 OPG(3mg/kg 体重)后可显著降低骨吸收^[27]。但是绝经后骨质疏松妇女血清 OPG 水平高于正常对照组^[30],随

着年龄的增加,骨髓基质细胞数量减少,但血清 OPG 水平却呈上升趋势^[31]。显然 OPG 水平升高不是病因,很可能是机体的自我保护机制。

癌症骨转移引起的骨破坏缘于肿瘤细胞介导下的破骨细胞骨吸收作用^[34]。肿瘤细胞分泌的 PTHrP、M-CSF、IL-1、IL-6、TNF- α 等因子可以促进破骨细胞的分化成熟并增强其骨吸收活性。乳腺癌细胞分泌表达高水平的 PTHrP,PTHrP 促进 RANKL 表达,抑制 OPG 分泌^[35]。小鼠乳腺癌细胞分泌的 PGE $_2$ 不但可以促进成骨细胞/骨髓基质细胞表达 RANKL,还可以增强 RANKL 对破骨细胞的作用^[36]。另一方面,骨组织内蕴藏着丰富的 TGF- β 、FGF、IGF、PDGF 和 BMPs,骨质破坏后这些因子释放出来又可以促进肿瘤细胞的生长^[34]。研究表明,注射重组 OPG 蛋白可以预防全身注射肿瘤细胞引起的骨转移,并能抑制已有的骨转移病灶的发展,降低因骨转移引起的高钙血症,但对肿瘤细胞的生长和 PTHrP 的表达无影响^[37]。

5 OPG/RANKL/RANK 系统与免疫系统的联系及“Osteoimmunology”

类风湿性关节炎、白血病、哮喘、红斑狼疮等疾病都伴有全身性或局部的骨质疏松或软骨塌陷,那么骨代谢与机体免疫之间是否有着某种联系呢?RANKL 可阻止树突状细胞凋亡、促进 T 细胞增殖^[13],这些作用可被 OPG 阻断,而激活的 T 细胞表达的 RANKL 可直接促进破骨细胞生成,提示 OPG/RANKL/RANK 系统可能是联系骨代谢与免疫系统之间的桥梁,RANKL 和激活的 T 细胞是这个桥梁的两个重要支点,有学者据此提出了“骨免疫学”(Osteoimmunology)的概念^[33]。

在免疫过程中,树突状细胞(Dendritic cell,DC)将抗原提呈给 T 细胞后很快被 TNF 家族分子如 TRAIL、FasL 和 TNF α 等清除,避免过度免疫反应的关键,DC 数量增多、生存期延长可能是自身免疫性疾病的主要原因。激活的 T 细胞表达 RANKL,作用于成熟 DC 表面的 TRAF6,启动 NF- κ B、Akt/PKB 及 ERK 通路,通过阻止细胞凋亡的机制延长了 DC 的存活时间^[38]。在体外,激活的 T 细胞通过表达 RANKL 可直接启动破骨细胞生成。在体内,全身性的 T 细胞激活可导致 RANKL 依赖性的破骨细胞生成作用增强以及骨量丢失,而这些作用均可被 OPG 阻断^[39]。DC 本身也可以分泌 OPG 参与调节。T 细胞促进骨质吸收有两个途径,直接途径是 RANKL/RANK 通路,间接途径是分泌 TNF α 、IL-1 等引起炎症的细胞因子。另一方面,激活的 T 细胞分泌的 IFN- γ 可以快速降解 TRAF6,阻断 RANKL/RANK 介导的 NF- κ B 和 JNK 通路,从而抑制了破骨细胞生成^[40]。说明 TNF 与 INF 家族之间通过 IFN- γ 介导的抑制 T 细胞活性和骨吸收的作用而有着某种“交谈”(Crosstalk)。所有这些都表明,T 细胞和 RANKL 是联系骨骼系统和免疫系统之间最重要的两个因素,因此推论 RANKL 是类风湿性关节炎等疾病的治疗靶点。

类风湿性关节炎的骨关节病变包括滑膜炎、骨质破坏和软骨侵蚀。滑膜内有两种细胞可表达 RANKL,一是滑膜成纤维细胞,滑膜内的巨噬细胞在滑膜成纤维细胞或 M-CSF

和 RANKL 的存在下可分化为破骨细胞,而正常的滑膜组织内无 RANKL 表达^[41]。从类风湿性关节炎患者关节滑液中分离的炎症细胞均可表达 RANKL,但不表达 OPG^[39]。第二个来源是滑膜内激活的 T 细胞,其表达的 RANKL 可以促进破骨细胞生成^[42]。应用 OPG 治疗不但可增加干骺段骨量,还能保护软骨关节面免受侵蚀^[39]。联想到软骨细胞能够表达 RANKL 和 RANK, RANKL 基因敲除小鼠关节生长板内的软骨细胞排列紊乱,提示 RANKL/RANK 在软骨发育中起着重要的作用。说明 RANKL 的表达与骨关节病变之间有必然的联系,应用 OPG 阻断 RANKL/RANK 通路给类风湿性关节炎的治疗提供了一个新的途径。但联系 OPG/RANKL/RANK 系统与炎症反应的分子机制尚需进一步研究。

6 展 望

近年来 OPG/RANKL/RANK 系统的相关研究受到广泛关注,部分原因是人们认识到阻断 RANKL/RANK 通路可以给骨吸收过度或骨破坏性疾病的治疗开辟新的途径。OPG 的发现已有 5 年,但到目前为止仅有一篇文献提及应用 OPG 蛋白进行绝经后骨质疏松的临床试验性治疗研究^[27]。进一步的应用研究需关注以下问题:

第一,如何获得有生理活性的 OPG 蛋白。从克隆基因到表达出有功能的蛋白有不同的途径,大肠杆菌表达系统操作简单、成本低、遗传背景清楚,现有多种系统可供选择,缺点是如真核细胞那样进行较好的翻译后修饰,如在半胱氨酸间形成二硫键和糖基化。OPG 是糖蛋白,含有太多的半胱氨酸,似乎先天决定了原核表达难以得到有功能的 OPG 蛋白。我们曾经尝试使用了谷胱甘肽转硫酶(GST)融合表达载体 pGEX-4T-1、麦芽糖结合蛋白(MBP)融合表达载体 pMAL、N 端融合 6 个组氨酸的融合表达载体 pRSET 等,均得到 OPG 融合蛋白的表达。然而,所得到的蛋白多以包涵体的形式存在,可溶性差,生理活性极低。应用大肠杆菌表达有生理活性的 OPG 蛋白还需要深入地研究和尝试。现在国外研究中所用的 OPG 多是在动物细胞中表达出来的,价格昂贵,原因是真核表达水平低,动物细胞培养条件要求高,从细胞上清中分离纯化目的蛋白极为困难。从目前的情况来看,通过尝试其他表达系统(如酵母表达系统),类似 BMP-2 的情况,OPG 蛋白的制造有可能成为具有良好经济效益和社会效益的产业。

第二,是否将 OPG 蛋白直接用到体内。从目前动物实验结果来看,全身应用 OPG 是安全的,但目前还没有大宗的临床试验结果。而且 OPG 蛋白分子量大,性质不稳定。和其他重组细胞因子类似,应用到人体后有蛋白在体内的半衰期短暂、可能引起免疫排斥反应或对其他脏器产生副作用等缺点。进一步的研究方向,一是采用噬菌体肽库筛选等技术找到与 OPG 功能相似的小分子量物质,如十几个氨基酸的多肽。或是制造与 OPG 功能相近或促进 OPG 蛋白表达的合成药物。从长远来看,小分子物质或合成药物更适合于临床实用。二是改变药物的介入方式。如采用基因治疗的方式

可以使目的基因在体内有较为恒定的表达。携带 OPG 编码区基因的重组腺病毒经静脉注射入卵巢切除后的骨质疏松小鼠体内,注射后 4 周小鼠的脊椎骨、四肢长骨内破骨细胞的数量明显减少,骨量较对照组显著增多,血中可检测到的 OPG 水平可保持 18 个月^[43]。

第三,如何在抑制骨吸收的同时促进骨形成。目前在骨质疏松等疾病的临床治疗中,更多是通过抑制破骨细胞的分化和活性来抑制骨质吸收,促进骨质生成的治疗措施还未得到广泛应用。由于通过抑制骨吸收而保留的骨质不能弥补骨质吸收或破坏过程中的骨量丢失,因此,人们开始重视在抑制骨吸收作用的同时促进骨形成。OPG/RANKL/RANK 系统使人们对骨吸收与骨形成之间的联系和相互作用机制有了更深入的了解。临床研究发现每天一次注射 20 μ g 或 40 μ g 甲状旁腺素(Parathyroid hormone,PTH)可显著增加骨质疏松患者脊椎、股骨颈等部位的骨密度,降低骨折发生率,但更高的剂量可能会导致高钙血症等副作用^[44]。动物实验表明联合应用 PTH 和 OPG,发挥 PTH 的骨形成和 OPG 的抑制骨吸收所用,效果显著好于单用 PTH 或 OPG 治疗组^[45]。联合应用骨吸收抑制剂和骨生成促进剂为骨破坏性疾病的治疗提供了一个新的途径。

第四,重视骨骼、免疫和内分泌等多系统之间的联系。除激活的 T 细胞可表达 RANKL 外,乳腺上皮细胞表达有 RANK,孕期在性激素的诱导下可表达 RANKL。RANKL 或 RANK 基因敲除的小鼠哺乳期乳腺不能发育,从母体骨骼内释放出的钙不能转运给胎鼠,最终导致新生小鼠的死亡,提示 OPG/RANKL/RANK 系统同样在哺乳动物的繁殖、子代存活方面发挥着重要作用。在孕期母体需要调整钙代谢和免疫系统功能来适应胎儿的发育,例如母亲不会排斥掉相当于同种异体的胎儿,但同时却能排斥同种异体的皮肤移植^[33,46]。骨骼代谢、怀孕与哺乳等均受性激素的调节,成骨细胞/骨髓基质细胞和破骨细胞、乳腺上皮细胞、T 细胞核和树突状细胞等分别表达有 RANKL 或 RANK 或是 OPG,这些现象能让我们更好的理解骨骼、免疫和内分泌系统之间存在有联系,并给进一步的研究提供某些启示。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, **89**(2): 309-319
- [2] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 1998, **139**(3): 1329-1337
- [3] Tan K B, Harrop J, Reddy M *et al.* Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*, 1997, **204**: 35-46

- tumor necrosis factor receptor family ,induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB* , 1998 , **12** : 845 – 854
- [5] Yun T J , Chaudhary P M , Shu G L *et al* . OPG/FDCR-1 , a TNF receptor family member , is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *Journal of Immunology* . 1998 , **161** : 6113 – 6121
 - [6] Yamaguchi K , Kinosaki M , Goto M *et al* . Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* , 1998 , **273** (9) : 5117 – 5123
 - [7] Tomoyasu A , Goto M , Fujise N *et al* . Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factors. *Biochem Biophys Res Commun* , 1998 , **245** : 382 – 387
 - [8] Tsuda E , Goto M , Mochizuki S I *et al* . Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 1997 , **234** : 137 – 142
 - [9] Bucay N , Sarosi I , Dunstan C R *et al* . Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* , 1998 , **12** : 1260 – 1268
 - [10] Malyankar U M , Scatena M , Suchland K L *et al* . Osteoprotegerin is an $\alpha\beta 3$ -induced , NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* , 2000 , **275** : 20959 – 20962
 - [11] Lacey D L , Timms E , Tan H-L *et al* . Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* , 1998 , **93** : 165 – 176
 - [12] Yasuda H , Shima N , Nakagawa N *et al* . Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci* , 1998 , **95** : 3597 – 3602
 - [13] Wong B R , Rho J , Arron J *et al* . TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* , 1997 , **272** : 25190 – 25194
 - [14] Anderson M A , Maraskovsky E , Billingsley W L *et al* . A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* , 1997 , **390** : 175 – 179
 - [15] Gao Y H , Shinki T , Yuase T *et al* . Potential role of cbfa1 , an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation , in osteoclastogenesis : Regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 1998 , **252** : 697 – 702
 - [16] Katagiri T , Takahashi N . Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Disease* , 2002 , **8** : 147 – 159
 - [17] Zhang Y H , Heulsmann A , Tondravi M M *et al* . Tumor necrosis factor- α stimulates osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* , 2001 , **276** : 563 – 568
 - [18] Azuma Y , Kaji K , Katogi R *et al* . Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclast. *J Biol Chem* , 2001 , **275** : 4858 – 4864
 - [19] Gori F , Hofbauer L C , Dunstan C R *et al* . The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast by stromal osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* , 2000 , **141** (12) : 4768 – 4776
 - [20] Vidal O N , Sjogren K , Eriksson *et al* . Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 α in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* , 1998 , **248** (3) : 696 – 700
 - [21] Vidal O N , Brandstorm H , Jonsson K B *et al* . Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells : down-regulation by glucocorticoids , *J Endocrinol* , 1998 , **159** (1) : 191 – 195
 - [22] Brandstorm H , Jonsson K B , Vidal O *et al* . Tumor necrosis factor- α and- β upregulate the levels of osteoprotegerin mRNA in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biochem Biophys Res Commun* , 1998 , **248** (3) : 454 – 457
 - [23] Brandstorm H , Jonsson K B , Ohlsson C *et al* . Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun* , 1998 , **247** (2) : 338 – 341
 - [24] Hofbauer L C , Dunstan C R , Spelsberg T C *et al* . Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by Vitamin D , Bone Morphogenetic Protein-2 and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* , 1998 , **250** (3) : 776 – 781
 - [25] Hofbauer L C , Khosla S , Dunstan C R *et al* . Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* , 1999 , **140** : 4367 – 4370
 - [26] Brad B , Christopher C , Mark D *et al* . Adenoviral delivery of osteoprotegerin ameliorates bone resorption in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Molecular therapy* , 2001 , **3** (2) : 197 – 205
 - [27] Bekker P J , Holloway D , Nakanishi A *et al* . The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* , 2001 , **16** : 348 – 360
 - [28] Yano K , Tsuda N , Kobayashi F *et al* . Immunological Characterization of Circulating Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor : increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* , 1999 , **14** : 518 – 527
 - [29] Makhlef H A , Mueller S M , Mizuno S *et al* . Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun* , 2000 , **268** : 669 – 672
 - [30] Fuller K , Lean J M , Bayley K E *et al* . A role for TGF- β in osteoclast differentiation and survival. *J Cell Science* , 2000 , **113** : 2445 – 2453
 - [31] Itoh K , Udagawa N , Katagiri T *et al* . Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. *Endocrinology* , 2001 , **142** : 3656 – 3662
 - [32] Mei Wan , Xingming Shi , Xu Feng *et al* . Transcriptional Mechanisms of Bone Morphogenetic Protein-induced Osteoprotegerin Gene Expression. *J Biol Chem* , 2001 , **276** (13) : 10119 – 10125
 - [33] Theill LE , Boyle WJ , Penninger JM . RANK-L. RANK : T cells , bone loss , and mammalian evolution. *Annual Reviews Immunology* , 2002 , **20** : 795 – 823
 - [34] Roodman GD . Biology of osteoclast activation in cancer. *Journal of Clinical Oncology* , 2001 , **19** (15) : 3562 – 3571

- [35] Chikatsu N , Takeuchi Y , Tamura *et al.* Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* , 2000 , **267** :632 – 637
- [36] Wani M R , Fuller K , Kim N S *et al.* Prostaglandin E2 cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors : synergistic activation of differentiation , cell spreading , and fusion. *Endocrinology* , 1999 , **140** :1927 – 1935
- [37] Morony S , Capparelli C , Kostenuik P J *et al.* Osteoprotegerin prevents osteolytic bone destruction in both athymic and syngeneic models of experimental tumor metastasis to bone. *J Bone Miner Res* , 1999 , **14** (Suppl) :1124 – 1128
- [38] Wong B R , Besser D , Kim N *et al.* TRANCE , a TNF family member , activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* , 1999 , **4** :1041 – 1049
- [39] Kong Y Y , Feige U , Sarosi I *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* , 1999 , **402** :304 – 309
- [40] Takayanagi H , Ogasawara K , Hida S *et al.* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* , 2000 , **408** :600 – 605
- [41] Takayanagi H , Iizuka H , Nakagawa T *et al.* Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synovial cell in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* , 1999 , **43** :259 – 265
- [42] Horwood N J , Kartsogiannis V , Quinn J M *et al.* Activated T cells support osteoclast formation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* , 1999 , **265** :144 – 150
- [43] Bolon B , Carter C , Daris M *et al.* Adenoviral delivery of osteoprotegerin ameliorates bone resorption in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Mol Ther* , 2001 , **3** (2) :197 – 205
- [44] Neer R M , Arnaud C D , Zanchetta J R *et al.* Effect of parathyroid hormone (1 – 34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* , 2001 , **344** :1434 – 1441
- [45] Kostenuik P J , Capparelli C , Morony S *et al.* OPG and PTH(1-34) have additive effects on bone density and mechanical strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* , 2001 , **142** :4295 – 4304
- [46] Fantl V , Edwards P A , Steel J H *et al.* Impaired mammary gland development in Cylk^{-/-} mice during pregnancy and lactation is epithelial cell autonomous. *Dev Biol* , 1999 , **212** :1 – 11

The OPG/RANKL/RANK System and Bone Resorptive Disease

LIU Ji-Zhong¹ JI Zong-Ling² CHEN Su-Min^{2*}

(The Forth Military Medical University , ¹ Institute of Orthopaedics , ² Department of Biochemistry and Molecular Biology , Xi ' an 710032 , China)

Abstract The OPG/RANKL/RANK system plays an important role in osteoclastogenesis and represents a great progress in bone biology. RANKL, which expresses on the surface of osteoblast/stromal cells and activated T cells, binds to RANK on the osteoclastic precursors or mature osteoclasts, and promotes osteoclastogenesis and bone resorption. While osteoprotegerin (OPG), which is expressed by osteoblasts/stromal cells, strongly inhibits bone resorption by binding to its ligand RANKL and thereby blocks the interaction between RANKL and RANK. A number of cytokines and hormones exert their effects on bone metabolism by regulating the OPG/RANKL ratio in the bone marrow microenvironment. RANK is also expressed on mammary epithelial cells and RANKL expression in these cells is induced by pregnancy hormones, RANKL and RANK are essential for the formation of the lactating mammary gland and the transmission of maternal calcium to neonates in mammalian species. Modulation of these systems provides a unique opportunity to develop novel therapeutics to inhibit bone loss in osteoporosis, rheumatoid arthritis, and bone metastasis of cancer. Further research should be focused on the cooperation of OPG/RANKL/RANK system with other signal pathways and the interactions among bone remodeling, immune system and endocrinology system. Currently, the development of OPG analogues or compounds which may stimulate OPG expression is becoming an attractive industry which may be profitable to both patients and manufacturers.

Key words osteoprotegerin, osteoclastogenesis, T lymphocyte, bone resorption