

Rspo1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节成骨细胞分化的研究进展

彭杨茜¹ 刘庆梅² 马彦云² 王久存² 赵东宝^{1*}

1. 上海长海医院风湿免疫科, 上海 200433

2. 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室及现代人类学教育部重点实验, 上海 200433

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 04-0504-04

摘要: 在成骨细胞的分化增殖中, 经典 Wnt/ β -catenin 通路起着重要的调节作用; 此通路中的任何一个因子都能影响成骨细胞的分化增殖。近几年里, 大量研究证明 R-脊椎蛋白家族已成为 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要调节因子。本文就 Rspo1 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控影响成骨细胞分化增殖的研究进展作一综述。

关键词: Rspo1; Wnt/ β -catenin 信号通路; 成骨细胞

Research progress of Rspo1 regulation of osteoblast differentiation through the Wnt/ β -catenin pathway

PENG Yangxizi¹, LIU Qingmei², MA Yanyun², WANG Jiucun², ZHAO Dongbao¹

1. Department of Rheumatology and Immunology, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433

2. State Key Laboratory of Genetic Engineering and Ministry of Education Key Laboratory of Contemporary Anthropology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: ZHAO Dongbao, Email: dongbaozhao@163.com

Abstract: The classic Wnt/ β -catenin pathway plays a crucial role in the differentiation and proliferation of osteoblasts. Any factor in the pathway can affect the proliferation and differentiation of osteoblasts. In recent years, a large number of studies show that R-spondins (RSPOs) is an important regulating factor in Wnt/ β -catenin signaling pathway. This paper reviews the progress in Rspo1 regulation of osteoblast differentiation through Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: Rspo1; Wnt/ β -catenin pathway; Osteoblast

R-脊椎蛋白 1 (Roof plate-specific spondin, Rspo1) 是 RSPOs 家族中的一员, 该家族是一类富含半胱氨酸的分泌蛋白, 结构上含有单一的重叠凝血酶敏感蛋白 I (Thrombospondin type I repeat domain, TSRI) 结构域^[1]。近年来, Wnt/ β -catenin 信号通路机制的研究甚多, 并证明 RSPO 家族是 Wnt/ β -catenin 信号通路的重要调节因子。

1 Rspo1 的发现和蛋白结构

RSPOs 家族有 4 个成员 (Rspo1 ~ Rspo4), 而 Rspo1 并不是该家族中第一个被发现的。2004 年, Kamata^[2] 在小鼠中发现了 Rspo1 (roof plate-specific spondin), 因其在小鼠胚胎神经管的顶板表达而命

名, 通过基因特异性表达的筛选, 发现该基因在脊髓。

人类 RSPO 蛋白由 234 到 272 个氨基酸构成。该蛋白的氨基酸序列具有高度保守性, 特别是在脊椎动物类。该家族蛋白已知的 4 个不同结构域有: (1) 亲水性结构域, 为已知的分泌信号肽序列; (2) 一个富含半胱氨酸的 furin-like 结构域 (CR); (3) 重复 I 型凝血酶敏感蛋白结构域 (TSR); (4) 可变长度的富含碱性氨基酸序列 (BR)。以上结构域间的序列相似性, 尤其是 CR 和 TSR, 是高度保守的蛋白功能^[1]。在动物实验中发现, CR 对 RSPO 蛋白激活经典 Wnt 信号通路起决定作用, 此结构域的缺失可使得 RSPO 失去激活 Wnt/ β -catenin 信号通路的功能^[3]。尽管 RSPO 蛋白是一种分泌型蛋白, 但是在细胞培养液里几乎不或者很少被检测到, 可能与细

*通讯作者: 赵东宝, Email: dongbaozhao@163.com

胞外基质或者细胞表面有关^[4]。硫酸肝素蛋白多糖(HSPGs)位于细胞表面和细胞外基质,它包括了多配体聚糖和磷脂酰肌醇聚糖,其功能是调节包括WNT、FGF、BMP和SHH等不同的信号通路^[5-6]。用肝素钠或氯酸钠盐处理后的细胞,因抑制了硫酸化,可显著提高培养基中游离的RSPO蛋白水平,并且RSPO蛋白可与固定化肝素稳定结合^[4],这表明RSPO能与HSPGs结合。结构域缺失研究表明,缺失BR或缺失TSR和BR的RSPO蛋白质作为可溶性蛋白,在培养液里容易被检测到,并显著地降低了对肝素的亲和性^[4]。这表明了HSPGs可影响RSPO蛋白与细胞表面的结合;同时,RSPO蛋白的分泌与细胞表面的HSPGs相关联。

2 Rspo1 与经典 Wnt / β -catenin 通路的关系

Wnt 通路是调控细胞增殖、极性、凋亡的重要信号通路,在胚胎发育及维持组织稳态中起到重要作用^[7]。其中关键且研究最多的 Wnt 通路是经典的 Wnt 通路,它通过调节转录共激活因子 β -catenin 蛋白的数量,调控下游关键靶基因表达^[8]。Wnt/ β -catenin 通路的核心线路研究已有 20 年。当 Wnt 通路失活时,胞质的 β -连环蛋白被 Axin 蛋白复合物不断降解。Axin 支架蛋白由肿瘤抑制基因的结肠腺瘤样息肉基因产物(APC)、酪蛋白激酶 1(CK1)和糖原合成酶激酶 3(GSK3)组成。CK1 和 GSK3 可使得 β -catenin 蛋白的氨基端磷酸化,导致 β -catenin 蛋白被 β -Trop-泛素连接酶 E3 亚基识别,从而被泛素化降解^[9-10]。这样不断地消除 β -catenin 蛋白,阻止了其进入到细胞核内,因此 Wnt 靶基因被与 DNA 结合的 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)家族蛋白抑制。当 Wnt 配体与跨膜七次的活化卷曲蛋白(Fz)受体及其共受体,低密度脂蛋白受体相关蛋白 6(LRP6)或者其相近的 LRP5 相结合,Wnt/ β -catenin 信号通路被激活。Wnt-Fz-LRP6 复合体的形成加上蓬乱蛋白(Dvl)的募集,可使得 LRP6 磷酸化并活化,Axin 复合体与之结合。以上过程可抑制 Axin 介导的 β -catenin 蛋白磷酸化,从而稳定 β -catenin 蛋白并促进其入核与 TCF/LEF 结合形成复合物,进一步激活包括 C-myc、cyclinD1 等下游靶基因表达^[11]。Nam 研究发现,R-脊椎蛋白与 LRP6 具有高亲和力,但与 Fz 的结合显著减少或不良^[5]。此外,人 Rspo1(hRspo1)诱导的 LRP6 磷酸化可被 LRP6 的拮抗剂 DKK1 抑制^[3,12-13]。值得注意的是,

hRspo1 与低浓度的 Wnt3a 可协同增强 LRP6 磷酸化和 β -catenin 的稳定^[3]。而在 Rspo1 基因突变导致无功能蛋白质的产生^[14]或 Rspo1 蛋白 CR 域的缺失^[15]情况下则可严重影响 Rspo1 依赖的 Wnt 信号激活。Rspo1 基因突变患者还表现为掌跖角化过度 and 皮肤鳞状上皮细胞癌易感性^[14]。另外,Heinz 等^[16]研究证明 Rspo1 可与细胞表面 G 蛋白偶联受体(LGR4/5)结合,并通过其传递信号激活 Wnt 信号通路。以上研究说明,Rspo1 能通过与细胞表面受体结合或者与 Wnt3a 联合等方式来激活经典的 Wnt 信号通路。

3 经典 Wnt/ β -catenin 通路对成骨细胞的调节作用

经典 Wnt/ β -catenin 通路在不同的生物学过程中起着重要作用,例如胚胎发育、调节间充质细胞分化和骨生理学等^[7,17-19]。过去几年的研究表明,Wnt/ β -catenin 通路在骨质量调节中发挥着重要作用,并参与许多骨相关疾病^[20]。骨形成中最主要的是成骨细胞的分化,例如细胞外基质的合成,沉积和矿化。机制之一即 Wnt/ β -catenin 通路通过刺激成骨细胞分化增加骨形成^[20]。此外,在成骨细胞中,Wnt/ β -catenin 通路通过调控破骨细胞的分化和活性能够协调出生后骨量获取^[19,21-24]。

有研究发现,人 LRP5 基因突变导致功能缺失或者获得,分别与骨质疏松症-假神经胶质瘤综合征(OPPG)和显性遗传的骨量增多(HBM)相关^[25-27],OPPG 的患者表现为骨量减少和骨脆性增加。大规模基因组研究表明,LRP5 的多态性与骨密度和骨折率相关^[28-31]。Kato 等人^[32]构建缺失 Lrp5 的小鼠模型,再现因 Lrp5 突变丧失功能引起的人骨表型。Lrp5^{-/-}小鼠表现为低骨密度和成骨细胞增殖减少,但让人意外的是,缺乏成骨细胞特有的 Lrp5 并不会导致低骨量^[33]。Lrp5 被认为可调控骨形成,因其在十二指肠抑制了血清素合成。Lrp5 抑制了色氨酸羟化酶 1 的表达,后者是十二指肠嗜铬细胞血清素的合成限速酶。血清素以内分泌的形式,通过血清素受体和 cAMP 反应元件结合(CREB)蛋白来抑制成骨细胞增殖^[33]。以上动物实验表明 LRP5 调节成骨细胞增殖的场所是在肠道而不是骨。最近发现,LRP6 基因突变是家族性代谢综合征、骨质疏松的危险因素^[34]。Lrp5 缺失小鼠杂合 Lrp6 无效等位基因会进一步降低骨密度^[35]。Kubota 对 Lrp6 点突变小鼠和野生小鼠进行研究,前者表现为骨小梁数

目减少和骨表面侵蚀扩大,尿中脱氧吡啶酚(骨吸收标志物)升高,但血清骨钙素(骨形成指标)没有变化。核因子 κ -B 配体受体激活剂(Rankl),作为破骨细胞分化及活性的重要分子,在体内外 Lrp6 点突变成骨细胞中表达增强了。在体外 Lrp6 点突变细胞中促进了破骨细胞的形成和骨吸收的增加^[36]。

β -catenin 蛋白在成骨细胞发育的各个阶段起着不同的作用。在转基因小鼠中,缺失 β -catenin 蛋白的成熟成骨细胞会随着破骨细胞的增加导致严重的骨量丢失。在体外,缺失 β -catenin 蛋白的成骨细胞中,Rankl 的表达增加而骨保护素(OPG)则减少^[23]。DKK1 可与 LRP5 和 LRP6 结合抑制 Wnt 通路^[11]。过表达 DKK1 小鼠因成骨细胞数量和骨形成减少导致骨量减少,表明 DKK1 负向调节骨形成^[37]。Dkk2^{-/-}小鼠的骨质疏松是由骨矿化受损所致^[38]。由 SOST 基因^[39]编码的硬化蛋白可与 LRP5 和 LRP6 结合抑制 Wnt 通路,在人类该基因功能突变缺失或者低表达与硬化性狭窄和全身性骨皮质增厚相关,但过表达又会导致骨量的减少。值得注意的是,硬化蛋白由成骨细胞分泌,几乎完全表达于骨,位于骨基质内,甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)治疗法可减少硬化蛋白的表达,可能缓解了 Wnt 通路内源性抑制和增加了骨形成^[11]。以上研究都说明,经典 Wnt 信号通路在骨代谢平衡中,通过促进成骨细胞的增殖、分化和抑制破骨细胞成熟、骨吸收等发挥作用。

4 Rspo1 与成骨细胞

大量研究表明, Rspo1 是经典 Wnt/ β -catenin 通路的一类新激活剂,而 Wnt 通路参与骨代谢平衡也是已知的。在未分化间充质 C2C12 细胞中, Rspo1 与 Wnt3a 协同激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,并且在 10 ng/ml 的低浓度下也可增强与 Wnt3a 的协同作用,并诱导 C2C12 成骨细胞分化和骨保护素的表达,但以上过程可被 Wnt 通路抑制剂 DKK1 抑制^[40]。在 TNF α 转基因小鼠关节炎模型中, Rspo1 非常有效的保护骨和软骨免受炎症相关性损害,并可拮抗 DKK1 的作用;另一方面,还可抑制破骨细胞发育^[41]。Han 等人^[42]研究发现,过表达 Rpos1 可增加肌生基因 MYF5 的 mRNA 和蛋白表达;此外,在体外培养人成骨细胞(hFOB1.19)和成骨前体细胞, Rpos1 可促进其分化并增加碱性磷酸酶含量^[43],这均表明 Rpos1 与成骨细胞的分化成熟相关。

5 展望与应用

成骨细胞在骨代谢平衡中是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。目前对经典 Wnt/ β -catenin 通路的研究已深入到了基因水平,其与成骨细胞关系的研究也比较清楚,但是该通路中的细胞因子调节成骨细胞的具体机制不清楚。而且 Wnt 通路与 Notch、FGF、MAPK 等通路中的多种因子有交叉点,这些可能都会影响到成骨细胞的调节。大量的动物及体外细胞实验证明 Rpos1 可通过经典 Wnt/ β -catenin 通路促进成骨细胞分化、成熟,并且保护骨与软骨免受炎症损害,还可能在骨重建中起重要作用^[40]。此作用有望应用于临床治疗骨质疏松和骨折修复。因此,目前对于 Rspo1 通过经典 Wnt/ β -catenin 通路调节成骨细胞的具体作用机制还有待进一步深入研究和探讨。

【参考文献】

- [1] Jeong Kyo Yoon, Jin-Seon Lee. Cellular signaling and biological functions of R-spondins. Cellular Signalling, 2012, 24 (2): 369-377.
- [2] Kamata T, Katsube K, Michikawa M, et al. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. Biochim Biophys Acta, 2004, 1676(1): 51-62.
- [3] Wei Q, Yokota C, Semenov MV, et al. R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and β -catenin signaling. J Biol Chem, 2007, 282(21): 15903-15911.
- [4] Nam JS, Turcotte TJ, Smith PF, et al. Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(19): 13247-13257.
- [5] Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. Development, 2004, 131(24): 6009-6021.
- [6] Fico A, Maina F, Dono R. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(6): 923-929.
- [7] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 781-810.
- [8] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Cell, 2009, 17(1): 9-26.
- [9] Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. Rev Endocr Metab Disord, 2006, 7(1-2): 33-39.
- [10] Xia B, Xu B, Sun Y, et al. The effects of Liuwei Dihuang on canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteoporosis. J Ethnopharmacol, 2014, 153(1): 133-141.
- [11] Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone. Clin Pediatr Endocrinol, 2010, 19(3): 49-56.
- [12] Bell SM, Schreiner CM, Wert SE, et al. R-spondin 2 is required for

- normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. Development, 2008, 135(6): 1049-1058.
- [13] Mathew LK, Sengupta SS, Ladu J, et al. Crosstalk between AHR and Wnt signaling through R-spondin1 impairs tissue regeneration in zebrafish. FASEB J, 2008, 22(8): 3087-3096.
 - [14] Parma P, Radi O, Vidal V, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. Nature Genetics, 2006, 38(11): 1304-1309.
 - [15] Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, et al. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSP01) homozygous-mutation. Human Mutation, 2008, 29(2): 220-226.
 - [16] Ruffner H, Sprunger J, Charlat O, et al. R-Spondin potentiates Wnt/ β -catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5. PLoS One, 2012, 7(7): 40976.
 - [17] Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. Cell Res, 2005, 15(1): 28-32.
 - [18] Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, et al. WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. Nat Rev Genet, 2004, 5(9): 691-701.
 - [19] Glass, D. A., Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Dev Cell, 2005, 8(5): 751-764.
 - [20] Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1202-1209.
 - [21] Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, et al. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. Dev Cell, 2005, 8(5): 739-750.
 - [22] Hill TP, Später D, Taketo MM, et al. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. Dev Cell, 2005, 8(5): 727-738.
 - [23] Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, et al. Essential role of β -catenin in postnatal bone acquisition. J Biol Chem, 2005, 280(22): 21162-21168.
 - [24] Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, et al. Wnt signaling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF κ B ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 7): 1283-1296.
 - [25] Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. Cell, 2001, 107(4): 513-523.
 - [26] Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. The New England Journal of medicine, 2002, 346(20): 1513-1521.
 - [27] Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. American journal of human genetics, 2002, 70(1): 11-19.
 - [28] Balemans W, Van Hul W. The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. Endocrinology, 2007, 148(6): 2622-2629.
 - [29] Ezura Y, Nakajima T, Urano T, et al. Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. Bone, 2007, 40(4): 997-1005.
 - [30] Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, et al. Bone mineral-density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. Lancet, 2008, 371(9623): 1505-1512.
 - [31] van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, et al. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. JAMA, 2008, 299(11): 1277-1290.
 - [32] Kato M, Patel MS, Levasseur R, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. J Cell Biol, 2002, 157(2): 303-314.
 - [33] Yadav VK, Ryu JH, Suda N, et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. Cell, 2008, 135(5): 825-837.
 - [34] Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. Science, 2007, 315(5816): 1278-1282.
 - [35] Holmen SL, Giambernardi TA, Zylstra CR, et al. Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6. J Bone Miner Res, 2004, 19(12): 2033-2040.
 - [36] Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, et al. Lrp6 hypomorphic mutation affects bone mass through bone resorption in mice and impairs interaction with Mesd. J Bone Miner Res, 2008, 23(10): 1661-1671.
 - [37] Li J, Sarosi I, Cattle RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. Bone, 2006, 39(4): 754-766.
 - [38] Li X, Liu P, Liu W, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. Nat Genet, 2005, 37(9): 945-952.
 - [39] Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. Bone, 2005, 37(2): 148-158.
 - [40] Wenyan Lua, Kyung-Ah Kimb, Jianzhong Liu, et al. R-spondin1 synergizes with Wnt3A in inducing osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression. FEBS Letters, 2008, 582(5): 643-650.
 - [41] Krönke G, Uderhardt S, Kim KA, et al. R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. Arthritis & Rheumatism, 2010, 62(8): 2303-2312.
 - [42] XIANG Huahan, YONG Rijin, Marianne Seto, et al. A WNT/ β -catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. J Biol Chem, 2011, 286(12): 10649-10659.
 - [43] Ashish R Sharma, Byung-Soo Choi, Jong-Min Park, et al. Rspol promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 2013, 50(1): 19-25.