

文章编号: 1004-0374(2011)05-0477-05

成骨细胞中经典Wnt/ β -catenin通路研究进展

许兵¹, 刘慧¹, 许应星¹, 吴岩¹, 肖鲁伟¹, 童培建^{2*}

(1 浙江中医药大学第一临床医学院, 杭州 310053; 2 浙江省中医院骨伤科, 杭州 310012)

摘要: Wnt/ β -catenin 经典通路在成骨细胞的分化增殖中起着重要作用。目前研究表明, 调节任何一个经典 Wnt/ β -catenin 信号转导通路中的因子都能影响成骨细胞的分化增殖。总结经典 Wnt/ β -catenin 通路中各个因子与成骨细胞分化增殖的关系, 以便进一步具体深入研究经典 Wnt/ β -catenin 通路对成骨细胞的影响。

关键词: 成骨细胞; Wnt/ β -catenin; 因子

中图分类号: R329.2 **文献标志码:** A

Development of the classic Wnt/ β -catenin pathway in osteoblasts

XU Bing¹, LIU Hui¹, XU Ying-Xing¹, WU Yan¹, XIAO Lu-Wei¹, TONG Pei-Jian^{2*}

(1 The First College of Clinic Medicine, Zhejiang Traditional Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2 Orthopedics, Chinese Medicine Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The classical Wnt/ β -catenin pathway plays an important role in the differentiation and proliferation of osteoblasts. Now the researches show that the regulation of any factors in classical Wnt/ β -catenin signal transduction pathway can influence the differentiation and proliferation of osteoblasts. This paper summarizes the relationship between the respective factors in the classic Wnt/ β -catenin pathway and the differentiation and proliferation of osteoblasts in order to further study the classical Wnt/ β -catenin pathway of osteoblasts.

Key words: osteoblast; Wnt/ β -catenin; factor

成骨细胞是骨代谢过程中骨形成的主要功能细胞, ER 通路、OPG/RANKL 通路、BMP-2/Smads 通路和 Wnt 信号系统等信号转导途径在整个成骨细胞分化增殖过程中起着重要的作用。近年来骨代谢方面, 以研究经典 Wnt/ β -catenin 信号通路对成骨细胞的影响较为热点。它是通过 β -catenin 作用来激活核内基因转录的 Wnt 信号通路。当成骨细胞外 Wnt 因子与膜受体卷曲蛋白 (Frizzled, Fz) 结合后, 通过一系列胞膜及胞质蛋白的相互作用形成二聚体, 使 β -catenin 在胞质内累积, 然后进入细胞核内与 T 细胞转录因子 (T-cell-specific transcription factor, TCF)/ 淋巴增强因子 (lymphoid enhancing factor, LEF) 共同结合形成复合体, 激活下游靶基因的转录, 促进成骨细胞分化增殖^[1](图 1)。该通路的组成包括细胞外因子 Wnt 蛋白、跨膜受体 Fz、细胞膜上共受体 LRP5/6(the low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6, LRP5/6)、胞质内散乱蛋白 (dishevelled,

Dsh)、 β -catenin、糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、支架蛋白 Axin(axisinhibition)、APC 蛋白 (adenomatous polyposis coli)、核内转录因子 TCF/LEF、下游靶基因 (多数是参与细胞增殖与凋亡的基因, 如 cyclinD1、c-myc、Runx2、Osx 等), 以及与 Wnt/ β -catenin 通路相关的因子, 如 Dkks (Dickkopfs)、稳定自由基聚合 (stable free radical polymerization, sFRP)、蛋白磷酸酶 1(protein phosphatase 1, PP1)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、促甲状腺激素 (TSH)、早期 B 细胞因子 2(early human B cell factor 2, EBF-2)^[2] 等。它们分别对成骨细胞的分化增殖起着重要的作用^[3]。

收稿日期: 2011-01-08; 修回日期: 2011-03-10

基金项目: 卫生部科学研究基金(省部共建项目计划) (WKJ2008-2-032)

*通信作者: E-mail: tongpeijian@163.com

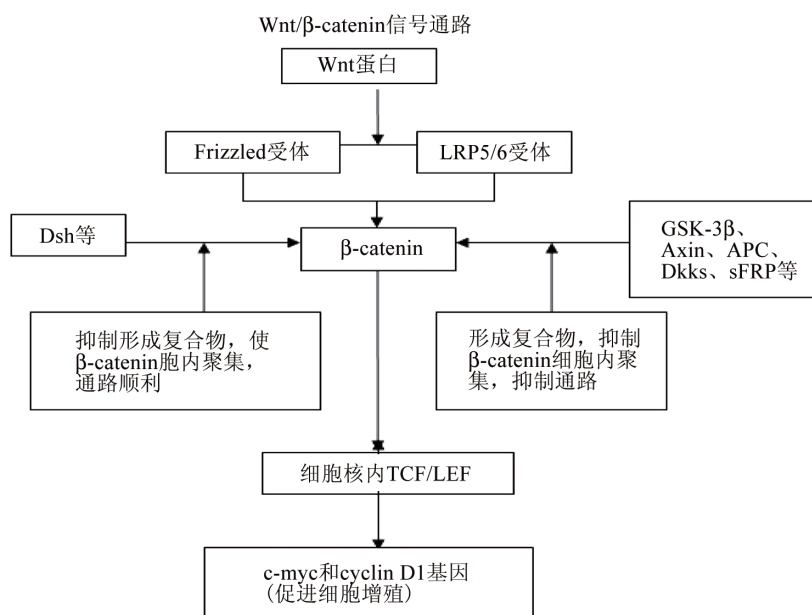


图1 经典Wnt/ β -catenin信号通路简易图

1 经典Wnt/ β -catenin通路中细胞膜外Wnt蛋白对成骨细胞的影响

Wnt蛋白是一类由wnt基因编码的, 相对分子质量为39 000~46 000的分泌性糖蛋白, 是F-跨膜卷曲蛋白受体家族(FZD)的配体, 调控着细胞生长、分化、功能和死亡等^[1,4]。它由350~380个氨基酸残基构成, 富含L-半胱氨酸, 其N端为疏水性信号序列, 其后包含多个糖基化位点, 还含有一段由24个半胱氨酸构成的保守区域。目前已发现有19种人类Wnt基因能够翻译转录成Wnt蛋白^[5]。细胞膜外的Wnt蛋白有两种类型: 一类能与LRP/FZD相互结合并发挥协同作用而激活Wnt/ β -catenin经典途径, 如Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3a、Wnt8和Wnt8b; 另一类能与Frizzled结合激活异源三聚体G蛋白, 具有提高细胞内钙水平等作用, 如Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a和Wnt11等^[6]。Wnt蛋白为Wnt/ β -catenin经典通路的起始因子, 它对成骨细胞的分化增殖有着重要作用。无Wnt信号时, Axin、APC、GSK-3 β 、CK1等构成 β -catenin降解复合物, 进而阻断经典Wnt/ β -catenin通路, 使成骨细胞分化增殖受阻; 当有Wnt信号时, GSK-3 β 活性受到抑制, β -catenin在胞内大量累积并进入核内, 从而启动靶基因的表达, 引起成骨细胞分化增殖^[7]。

2 经典Wnt/ β -catenin通路中细胞膜上两种受体与成骨细胞的关系

经典Wnt/ β -catenin通路中细胞膜外Wnt蛋白必须与膜上受体结合才能继续完成信号的转导。Frizzled受体就是一类跨膜蛋白, 其含有Wnt蛋白结合所必需的半胱氨酸富集结构域(CRD)的胞外区、与G蛋白偶联受体类似的七螺旋跨膜区和胞质内C端等三个部分, 并拥有能介导Wnt信号的KTXXXW区域。当细胞受到Wnt信号刺激时, 可与Frizzled受体的CRD区结合, 通过膜受体构象的改变将信号传递至胞内, 从而调节Wnt信号的传递, 影响骨形成和成骨细胞的发育^[8-9]。

LRP-5/6是Wnt的共受体, 均为低密度脂蛋白(LDL)受体超家族成员的单跨膜蛋白, 分别含有1 615和1 613个氨基酸残基, 两者胞外和胞内结构域有73%和64%相同^[10,11]。其中LRP5位于成骨细胞膜Frizzled受体与Kremen受体之间, 其功能高度保守。有动物实验研究证实, LRP5的胞外区可以与Wnt蛋白结合, 并且与Frizzled受体相互作用构成受体复合物, 将信号从胞外传入胞内; LRP6主要是通过GSK-3 β 使信号进入细胞膜内, 启动信号通路^[12]。对于成骨细胞而言, LRP5的功能缺失突变表现为由骨形成降低所造成的骨量下降; 在功能获得性突变LRP5(G171V)小鼠中, 发

现有大量成骨细胞产生,且ALP的表达和矿化能力也随之加强;LRP6^{+/-}小鼠模型与同龄鼠相比,其总体的骨密度下降^[13-14]。

目前对于Wnt与Fz/LRP受体的具体关系,有学者认为Frizzled受体为主要受体,而LRP受体只是辅助Wnt与Frizzled受体结合;也有学者认为两种受体独自与Wnt结合而起作用。总之,对于Wnt与Fz/LRP受体的关系及其结合的具体机制还不是十分清楚,有待进一步的研究。

3 经典Wnt/ β -catenin通路中细胞质内的因子与成骨细胞的关系

成骨细胞胞质内多个蛋白因子相互作用,共同调节经典Wnt/ β -catenin信号通路,从而影响成骨细胞的分化增殖。

3.1 经典Wnt通路的关键因子 β -catenin

β -catenin是相对分子质量为88000的蛋白因子,控制蛋白的稳定性,其N端由富含Ser、Thr位点的130个氨基酸残基构成,C端由负责激活靶基因转录的100个氨基酸残基组成。其中最重要的是一个可防止蛋白水解的含有12个armadillo重复区的棒状超螺旋结构,在细胞的信号转导过程中起着重要作用^[15]。 β -catenin是Wnt信号通路最关键的因子,细胞质中含量最多,也可存在于细胞膜及细胞核中。在细胞质中,当Wnt信号通路未被激活时, β -catenin被磷酸化而启动泛素系统,经蛋白酶体途径降解^[16]。在细胞核内, β -catenin与核内转录因子(TCF/LEF)结合启动靶基因*c-myc*、*cyclinD*等的转录^[17],使细胞进入S期,促进成骨细胞分化增殖。在细胞膜上的 β -catenin对细胞的作用研究较少,目前还不清楚。

3.2 GSK-3 β

GSK-3 β 是一种蛋白激酶。Kato等^[13]研究发现,口服给予GSK-3 β 抑制物LiCl可促进小鼠骨形成,缓解LRP5^{-/-}小鼠骨量的减少。Davidson等^[18]研究表明,抑制GSK-3 β 能使 β -catenin的降解立即被中断,与APC的亲和力降低,使游离 β -catenin增多,进而使Wnt/ β -catenin信号通路顺利进行。

3.3 Axin与APC

Axin是一个骨架蛋白,是Wnt途径的抑制性蛋白。Yu等^[19]研究发现,Axin蛋白中Axin2是经典Wnt/ β -catenin信号通路的反向调节因子,在颅盖骨形态形成中,Axin2^{-/-}鼠表现为颅骨结构异常(颅

缝早闭),敲除Axin2能使骨祖细胞增加、骨化加速、成骨标志物表达增加及矿化增强。

APC蛋白也是一种骨架蛋白,由2983个氨基酸残基组成,中央区包括 β -catenin、Axin的结合位点及GSK-3 β 磷酸化位点。APC蛋白成为调控Wnt信号途径的重要环节,主要是因为Axin结合在APC上,通过结合 β -catenin从而抑制Wnt信号通路的活化^[20]。

3.4 胞质内散乱蛋白(Dsh)^[21]

Dsh是成骨细胞膜内与膜上受体结合的因子。刘尚全和陈名道^[22]研究表明,有Wnt信号时,Frizzled作用于胞质内的Dsh。Dsh抑制GSK-3 β 的激酶活性,降低Axin与 β -catenin的亲和力,导致Axin和 β -catenin结合力减弱,使 β -catenin在细胞质中积聚,促使Wnt/ β -catenin通路顺利进行。

4 成骨细胞核内因子及靶基因与经典Wnt/ β -catenin通路的关系

经典Wnt/ β -catenin信号转导途径最终调节细胞核内的基因转录,从而调节成骨细胞的分化增殖,此时细胞核内因子及靶基因起着重要作用。

4.1 细胞核内因子TCF/LEF

TCF/LEF属于HMG(high mobility group)家族,具有与 β -catenin结合后促进基因转录的功能^[23]。LEF/TCF是Wnt/ β -catenin信号系统在核内的目的蛋白,它们都能与DNA序列-YCTTTGWW-相结合发挥调节基因转录的作用。Westendorf等^[24]研究发现LEF/TCF蛋白能够与核内 β -catenin结合形成异二聚体,进一步结合DNA并激活靶基因的转录,从而完成对成骨细胞的分化及转录调控;而LEF/TCF的缺失会影响基因的转录,影响成骨细胞的分化增殖,导致骨量下降。

4.2 核内靶基因

成骨细胞核内的原癌基因*c-myc*和*cyclin D1*是Wnt/ β -catenin通路的两个下游靶基因^[25]。*cyclin D1*是细胞周期增殖信号的关键蛋白^[26],为细胞周期从G₁期到S期转换所必需。当 β -catenin在胞质内累积时,进入细胞核内与LEF/TCF结合,激活*cyclin D1*基因转录,可促进细胞增殖。*c-myc*也能够调节细胞周期^[27],其基因启动子上有TCF4结合位点,能与 β -catenin结合,从而加速G₁到S期的转变,促进成骨细胞的分化增殖^[28]。另外,核内*Runx2*基因的启动能够明显刺激成骨细胞的分化增殖^[29]。

5 经典Wnt/ β -catenin通路中其他因子与成骨细胞的关系

Dkks 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制因子。去卵巢鼠 *Dkkl* 反义寡核苷酸处理组能与 Wnt 途径的共受体 LRP 结合, 从而抑制信号转导, 影响成骨细胞分化^[30-31]。sFRP 是 Wnt 的天然拮抗剂^[32]。sFRP1 会介导 β -catenin 去稳定化而损害成骨细胞功能, 并发现 sFRP1 基因缺失小鼠会出现 Wnt 信号通路的强活化和高骨量显性表达。sFRP2 也可抑制成骨细胞功能和成骨细胞前体细胞分化, 促使成骨细胞凋亡^[33-34]。另外, 成骨细胞中还有多种因子能够影响经典 Wnt/ β -catenin 通路, 其中正相调节因子有 PP1、EBF-2、糖皮质激素等, 负相调节因子有 TSH、Sizzled、WIF-1 等。它们共同调节经典 Wnt/ β -catenin 信号通路, 最终影响成骨细胞的增殖分化功能。

6 总结

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞, 负责骨基质的合成、分泌和矿化。它的分化增殖主要决定骨组织的骨量, 其内在的信号转导通路是目前国内外研究的重点。对经典 Wnt/ β -catenin 通路的研究已经深入到基因水平, 而对经典 Wnt/ β -catenin 通路与成骨细胞关系的研究也比较清楚, 了解得比较透彻; 但是在整个 Wnt/ β -catenin 信号转导通路中细胞因子如何调节成骨细胞的具体机制并不完全明确, 而且包括经典 Wnt/ β -catenin 通路在内的整个 Wnt 信号通路还与多条其他信号通路, 如 Notch、FGF、MAPK 通路等中的多种因子有交叉点^[35], 它们到底如何联系, 依旧有很多尚未清楚的地方。因此, 目前对于经典 Wnt/ β -catenin 通路和经典 Wnt/ β -catenin 通路中各种因子的具体作用机制还有待进一步的深入研究和探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Kestler HA, Kuhl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signaling network. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2008, 363(1495): 1333-47
- [2] Kieslinger M, Folberth S, Dobrev G, et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 757-67
- [3] Shi YC, Worton L, Estehen L, et al. Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation. *Bone*, 2007, 41(1): 87-96
- [4] Tamai K, Semenov M, Kato Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 2000, 407(6803): 530-5
- [5] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 59-88
- [6] Rulifson EJ, Wu CH, Nusse R. Pathway specificity by the bifunctional receptor frizzled is determined by affinity for wingless. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 117-26
- [7] Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev*, 2006, 20(4): 399-410
- [8] Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. The Wnt/ β -catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci*, 2007, 104(4): 293-302
- [9] Hoang BH, Kubo T, Healey J, et al. Expression of LDL receptor-related protein 5(LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer*, 2004, 109(1): 106-11
- [10] He X, Semenov M, Tamai K, et al. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 2004, 131(8): 1663-77
- [11] Pinson KI, Brennan J, Monkley S, et al. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature*, 2000, 407(769): 535-8
- [12] Zeng X, Huang H, Tamai K, et al. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, 2008, 135(2): 367-75
- [13] 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): 303-14
- [14] Babij P, Zhao W, Small C, et al. High bone mass in mice expressing a mutant *LRP5* gene. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(6): 960-74
- [15] Liu J, Xing Y, Hinds TR, et al. The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for β -catenin. *J Mol Biol*, 2006, 360(1): 133-44
- [16] Taurin S, Sandbo N, Qin Y, et al. Phosphorylation of β -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2006, 281(15): 9971-6
- [17] Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with β -catenin to activate gene expression. *J Cell Biol*, 2000, 149(2): 249-54
- [18] Davidson G, Wu W, Shen J, et al. Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 2005, 438(7069): 867-72
- [19] Yu HM, Jerchow B, Sheu TJ, et al. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. *Development*, 2005, 132(8): 1995-2005
- [20] Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, et al. Targeting the β -catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J*, 2005, 19(10): 1353-5
- [21] King RS, Maiden SL, Hawkins NC, et al. The N- or C-terminal domains of DSH-2 can activate the *C. elegans*

- Wnt/ β -catenin asymmetry pathway. *Dev Biol*, 2009, 332(2): 234-44
- [22] 刘尚全, 陈名道. 糖皮质激素诱导骨质疏松机制的研究进展. *国际内分泌代谢杂志*, 2006, 26(2): 135-7
- [23] Krieghoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of β -catenin is regulated by retention. *J Cell Sci*, 2006, 119(7): 1453-63
- [24] Westendof JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, 2004, 341: 19-39
- [25] Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, et al. β -catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (difemylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, 2002, 21(55): 8414-27
- [26] Matsubayashi S, Nakashima M, Kumagai K, et al. Immunohistochemical analyses of β -catenin and cyclin D1 expression in giant cell tumor of bone(GCTB): a possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis. *Pathol Res Pract*, 2009, 205(9): 626-33
- [27] Licchesi JD, Van Neste L, Tiwari VK, et al. Transcriptional regulation of Wnt inhibitory factor-1 by Miz-1/c-Myc. *Oncogene*, 2010, 29(44): 5923-34
- [28] Shtutman M, Zhurinsky I, Simcha I, et al. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(10): 5522-7
- [29] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating *Runx2* gene expression. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33132-40
- [30] Wang FS, Ko JY, Lin CL, et al. Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone*, 2007, 40(2): 485-92
- [31] McCarthy HS, Marshall MJ. Dickkopf-1 as a potential therapeutic target in Paget's disease of bone. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(2): 221-30
- [32] Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci*, 2003, 116(13): 2627-34
- [33] Hdder U, Hofbauer IC, Zavrski I, et al. Novel aspects of osteoclast activation and osteoblast inhibition in myeloma bone disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 338(2): 687-93
- [34] Von Marschall Z, Fisher LW. Secreted Frizzled-related protein-2(sFRP2) augments canonical Wnt3a-induced signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 400(3): 299-304
- [35] Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(14): 4042-5