

DOI: 10.13376/j.cbls/2021113

文章编号: 1004-0374(2021)08-1028-09

生物钟基因调控骨代谢的研究进展

李婷婷¹, 张士花¹, 杨雨轩¹, 元宇^{2*}, 邹军^{1*}

(1 上海体育学院运动科学学院, 上海 200438; 2 广州体育学院运动与健康学院, 广州 510500)

摘要: 哺乳动物的骨骼从胚胎时期开始便处于不断变化的动态代谢过程中, 骨骼的健康状态依赖于骨组织自身分解与合成代谢之间的动态平衡。这种动态平衡受基因和环境等因素影响, 其中生物钟基因能够直接或间接调控骨代谢的观点已受到广泛认可。然而生物钟基因种类繁多, 不同生物钟基因对骨代谢的调控作用各异, 且具体的调节机制仍未阐明。因此, 该文综述了生物钟基因调控骨代谢的研究进展, 旨在为骨质疏松等骨代谢疾病的预防与治疗提供新思路。

关键词: 生物钟基因; 昼夜节律; 骨代谢

中图分类号: R336 **文献标志码:** A

Research progress of circadian clock genes regulating bone metabolism

LI Ting-Ting¹, ZHANG Shi-Hua¹, YANG Yu-Xuan¹, YUAN Yu^{2*}, ZOU Jun^{1*}

(1 School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China;

2 School of Exercise and Health, Guangzhou Sport University, Guangzhou 510500, China)

Abstract: Mammalian skeleton is constantly metabolized since the embryonic stage, and the health of bone depends on the dynamic balance between the catabolism and anabolism of bone tissue. This dynamic balance of bone metabolism can be influenced by genetic and environmental factors, and it is widely recognized that circadian clock genes can directly or indirectly regulate bone metabolism. However, there is a variety of circadian clock genes. The regulatory roles of different circadian clock genes in bone metabolism are different, and the specific regulatory mechanisms remain unclear. Therefore, this review summarized the progress of research on the regulation of bone metabolism by circadian clock genes, aiming to provide some new ideas for the prevention and treatment of bone metabolic diseases such as osteoporosis.

Key words: circadian clock genes; circadian rhythm; bone metabolism

生物钟调控生命体各种生理和行为活动的内在节律, 使行为活动和新陈代谢与 24 h 的昼夜节律性变化相适应。生物体除视交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) 的脑区及一些外周器官中同样具有昼夜节律振荡器的发现推翻了生物钟只存在于 SCN 的观点。因此, 调控昼夜节律的生物钟可分为中枢钟和外周钟^[1]。两类生物钟由特定的基因表达产生, 它们被称为生物钟基因, 多个研究团队均发现生物钟基因可广泛参与机体内各种生理病理活动的调控^[2-3]。

骨代谢的平衡依赖于各类骨组织细胞规律的代谢活动, 使骨吸收和骨形成之间保持动态平衡。目

前认为, 骨代谢同时受力学因素和生物学因素的影响与调控。其中部分因素显示出一定的时间生物学特性, 即可发生昼夜节律性的变化, 如各类激素和细胞因子的产生与分泌等。此外, 骨细胞本身的活动也具有昼夜节律性变化的特征, 生物钟基因即是

收稿日期: 2021-04-28; 修回日期: 2021-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(81901430、81871835); 上海市人类运动能力开发与保障重点实验室(上海体育学院)(11DZ2261100)

*通信作者: E-mail: yuanyumail@126.com (元宇), Tel: 020-38024623; E-mail: zoujun777@126.com (邹军), Tel: 021-65507526

发挥这一效应的关键调节器^[4], 提示生物钟基因能够参与骨代谢平衡的调控。有研究指出, 倒班工作的人群和昼夜颠倒条件下饲养的小鼠因为昼夜节律紊乱引起生物钟基因异常表达, 继而导致骨微结构退化、骨量减少、骨强度降低及脆性增加等骨质疏松特征的出现^[4]。骨组织细胞中单个生物钟基因的缺失或突变也会引起骨分解和(或)骨合成代谢相关因子的异常表达, 使骨吸收和骨形成能力的平衡受损^[5]。另外, 已知各类生物钟基因在不同的时段内表达水平各异, 再结合临床研究发现绝经后骨质疏松患者在不同的时间进行同一药物干预后显示出骨转换指标不同程度的改变^[6]。因此, 明确生物钟基因可以调控骨代谢过程。然而, 生物钟基因如何调控骨代谢的具体机制尚不清楚, 且目前国内关于生物钟基因与骨代谢的综述报道仍较为鲜见, 因此, 本文主要综述生物钟基因对骨代谢的调控作用, 旨在为骨代谢疾病的防治提供新思路。

1 生物钟基因及其生物学功能

生物钟基因是存在于所有生物体内的一种时间测量装置, 影响机体的生长发育、生活方式以及寿命^[7]。目前发现的生物钟相关基因主要包括核心生物钟基因 *BMAL1* (brain and muscle ARNT-like-1)、*CLOCK* (circadian locomotor output cycles kaput)、*PERs* (periods)、*CRYs* (cryptochromes) 及非核心生物钟基因如 *REV-ERB α* (Nr1d1)、*REV-ERB β* 和 *RORA* (retinoid-related orphan receptor alpha)、*TIM* (timeless)、*DEC* (differentiated embryo chondrocyte)、*DBP*、*Nocturnin* 等, 这些基因的表达产物蛋白质大部分都以准对数形式存在, 构成复杂的正/负调控环进而共同调控生物节律^[7-8]。

其中, *BMAL1* 和 *CLOCK* 是生物节律系统中的核心生物钟基因, 蛋白质组学实验证实 *BMAL1* 主要定位于细胞核, 它发挥功能最常见的形式是通过与其他生物钟基因编码的蛋白形成二聚体(如 *BMAL1-CLOCK*、*BMAL1-NPAS2*), 然后与位于生物钟下游基因启动子内的 E-box 元件结合从而激活其转录^[9]。目前已知的位于细胞核内的生物节律复合体有两个, *BMAL1-CLOCK* 正反馈复合体是其中之一^[10]。Welz 等^[11]提出一种生物钟基因调节的双分支模型: 机体内以 *BMAL1* 为中心的生物钟调节网络可分为一个自主反应分支和一个记忆分支, 即体内没有任何依赖于 *BMAL1* 的时钟时, 由光引导生物钟。没有明暗规律变化的光线时, 则体内依

赖于 *BMAL1* 的时钟来“记住”时间。*BMAL1* 是表现 24 h 周期性活动所必需的基因, 2020 年有研究采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术使 *BMAL1* 在小鼠体内表达, 可直接定量测量 *BMAL1* 的时空分布、每日动态、细胞内动力学、半衰期以及分子浓度, 揭示 *BMAL1* 在细胞核内有明显的昼夜振荡^[12-13]。功能研究表明, *BMAL1* 与 HIF-1 α 串扰调节免疫细胞功能, 首次证明生物钟与免疫代谢存在一定关系^[2]。另外, *BMAL1* 受 PI3K/AKT 信号通路的调节, 可增加神经细胞氧糖剥夺后的细胞存活率^[14]。*CLOCK* 作为 *BMAL1* 的二聚化伴侣则通常需要依附于 *BMAL1* 发挥作用, 雌激素的产生已被证实与 *CLOCK* 表达水平密切相关^[15]。上述研究表明, *BMAL1* 与 *CLOCK* 作为生物钟正向调节因子, 参与生物节律、免疫代谢和细胞活动等多种生物学过程的调节。

CRYs、*PERs* 是生物节律的负调控因子。当 *CRYs*、*PERs* 蛋白积累到临界水平, 两者便被酪蛋白激酶 -1 δ (casein kinase-1 δ , CK1 δ) 磷酸化, 随后进入细胞核直接结合在 *BMAL1-CLOCK* 蛋白二聚体上形成复合体, 从而抑制自身的转录, 此复合体称为 *PER* 复合体, 是细胞核内除 *BMAL1-CLOCK* 正反馈复合体的另一复合体, 在生物节律方面主要发挥负反馈调节作用^[10, 16]。*CRYs* 可分为 *CRY1* 和 *CRY2*, 果蝇中的 *CRYs* 对光敏感, 被认为是蓝光感受器, 而在哺乳动物体内尚未发现其感光功能。早前的研究发现, 敲除 *CRY1* 和 *CRY2* 基因对小鼠的睡眠稳态未造成明显障碍, 因此认为 *CRY1* 和 *CRY2* 在睡眠调节中发挥的作用并不大^[17]。进一步研究发现, 两者均可以和 *BMAL1* 的相关结构域结合进而激活 *BMAL1* 的转录, 将其从辅激活物中分离出来并抑制 *BMAL1-CLOCK* 的活性, 而 *CRY1* 与 *BMAL1-CLOCK* 的 PAS 结构域核心有更高的亲和力, 对 *BMAL1-CLOCK* 活性的抑制作用高于 *CRY2*, 有效延长昼夜节律周期, 更易导致睡眠时相延迟综合征^[18-19]。*PERs* 则包括 *PER1*、2、3。其中 *PER2* 相关的研究最多, 其突变会打乱内部生物钟功能, 但不会改变生物节律周期长度。它还可以与 HIF-1 α 相互作用并参与缺氧反应调节^[20]。动物实验还发现 *PER2* 是一种温度敏感因子, 通过同步解耦联蛋白 1 (uncoupling prtein1, UCPI) 的表达和激活来参与哺乳动物每日的体温节律性变化调控^[21]。*CRYs*、*PERs* 作为生物钟负调控因子, 同 *BMAL1* 和 *CLOCK* 一样可调节生物节律和自身免疫, 另外在激素产生、缺氧反应和体温调节中也具有重要作用。

除了 *BMAL1* 等核心生物钟基因, 还有一类生物钟基因, 可统称为非核心生物钟基因, 它们也在昼夜节律调控环路中发挥不可或缺的作用。如 *REV-ERB α* (*Nr1d1*) 是除 *PER/CRY* 负反馈循环外的另一负反馈调节因子, 同时也是一种核受体。其转录由 *BMAL1-CLOCK* 二聚并结合到 E-box 而激活, 进而抑制 *BMAL1* 转录^[22]。它也能通过 mTOR 信号途径使 *BMAL1* 磷酸化, 从而改变昼夜节律^[23]。*BMAL1* 的缺失会诱导较长时间和较早阶段的 *PER2* 振荡^[24], 但也有学者认为, *REV-ERB α* 的缺乏不影响 *PER2* 的昼夜表达节律, 而是影响 *BMAL1* 和 *Npas2*^[25]。作为昼夜节律基因之一, 它在包括局部炎症性疾病、心力衰竭和癌症在内的病理情况下发挥着广泛的调控作用, 且目前已有靶向药物可有效地治疗一些特定的疾病^[26-27]。*RORA* 同 *REV-ERB α* 一样, 都参与气道炎症性疾病和癌症的发生发展过程^[28], 但其基因突变会导致严重的自闭症, 因此目前更多将其考虑为焦虑、抑郁等情绪情感障碍问题的调控因子^[29]。另一种基因 *TIM* 最初在果蝇中被发现, 较早的研究也证明果蝇中的时差通过将光信号从 *CRY* 传输到 *TIM* 来重置生物钟^[30]。然而, 它在脊椎动物中是否发挥生物钟调控功能尚无定论, 近年的研究初步表明哺乳动物中 *TIM* 通过微调 *PER2-CRY2* 复合物的水平来发挥调节昼夜节律的作用^[31]。目前已知的是 *TIM* 不仅影响昼夜节律, 其突变会导致家族性的睡

眠时相前移征, 还参与细胞周期、DNA 复制等调节过程。此外, 它也显示出一定程度的抗癌作用, 是早期非小细胞肺癌患者有价值的预后指标之一。且 *TIM* 功能发挥常与 *PER* 关联, 具体为被 *CLOCK* 激活, 随后与 *PER* 结合并入核, 进而反向抑制 *CLOCK* 活性^[32-33]。至于 *DEC*, 它属于碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 超家族的成员, 在昼夜节律、免疫反应、细胞增殖、缺氧反应等领域发挥作用^[34-35]。另外, *DEC* 还显示与细胞、组织和生物体水平的能量代谢调节特别相关^[36]。非核心生物钟基因在生物钟系统中并非冗余, 反之, 它们配合核心生物钟基因, 极大程度地丰富了生物钟对生命活动代谢的调控网络 (图 1)。

2 生物钟基因与骨代谢

2.1 骨代谢概述

正常的生物节律是机体各系统代谢活动良好运行的保障, 生物节律紊乱引发人类疾病已受到广泛关注。较早的研究指出生物钟基因缺陷小鼠随着年龄增长, 活动减少且骨骼出现病理性改变, 可见生物钟基因不仅调节行为活动, 在机体新陈代谢中也发挥重要作用, 骨代谢亦是受关注的其中一点^[37]。骨代谢是一个动态平衡的过程, 为了保持骨骼的机械完整性和钙磷平衡, 主要由破骨细胞与成骨细胞相互协调, 分解吸收骨质并重新合成新骨以维持正

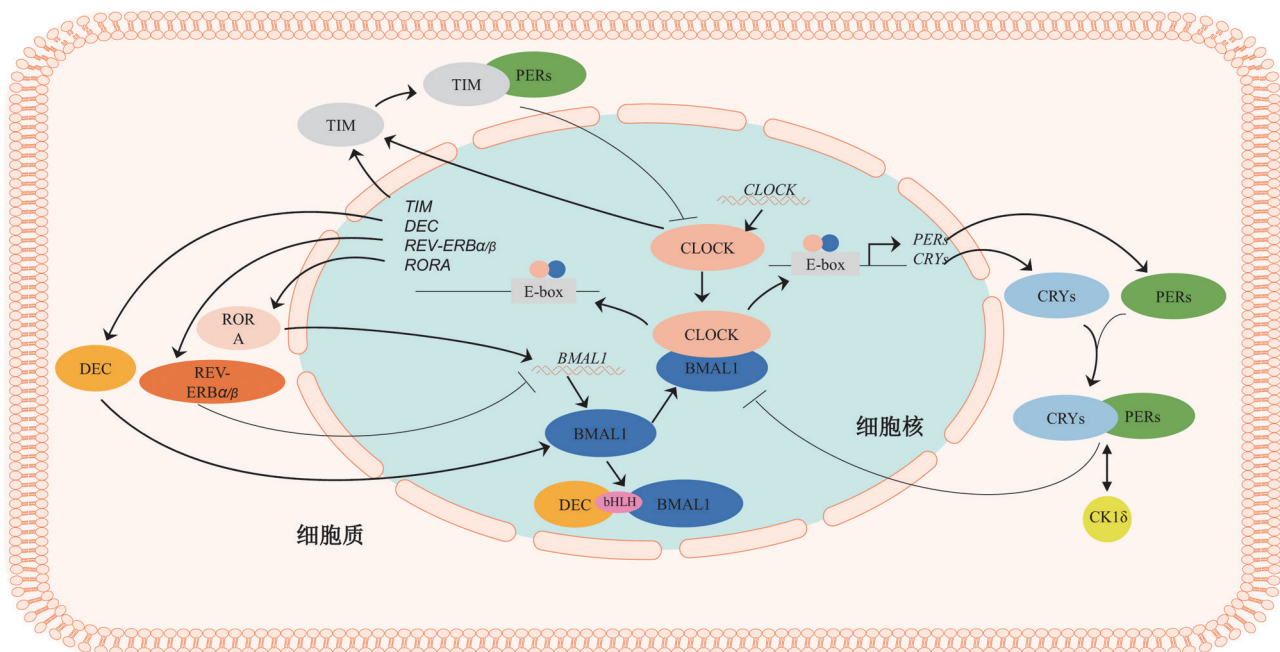


图1 生物钟基因交互作用形成的正负反馈环路示意图(根据参考文献[26]修改)

常的骨量及骨强度, 而骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cell, BMSC) 同时具有成骨分化和软骨分化的能力, 软骨细胞也可以转化为骨组织的一部分。因此, 从细胞水平观察, 参与骨代谢的细胞包括成骨细胞、破骨细胞、BMSC、骨细胞和软骨细胞^[38]。在分子层面, 判断骨形成或骨吸收则一般以特异性基因或蛋白表达为参考, 目前已经确认的成骨特异性标志物有碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、转录因子 Runt 域家族成员 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、骨钙素 (osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、I 型胶原 (type I collagen, COL I)、骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP) 等, 破骨相关标志物则包括抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP)、活化 T 细胞核因子 1 (nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1, NFATc1) 等。它们介导 Wnt/ β -catenin、BMP、OPG/RANKL/RANK 和 Notch 等各种信号通路参与骨代谢调节。而骨代谢同时也受多种因素影响, 如雌激素、甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 和糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 等激素, IL-1、IL-6 和 TNF- α 等细胞因子^[39]。近年来越来越多的研究表明, 骨代谢的平衡与生物钟基因密切相关。

2.2 生物钟基因调控骨代谢

各类骨组织细胞已被证明可表达与昼夜节律相关的生物钟基因。在分子水平, 部分骨形成和骨吸收相关标志物的表达与生物钟基因的表达在时间生物学方面保持着特有的振荡规律。如 *BMALI* 和 *CLOCK* 的表达呈日间升高而夜间下降的趋势, *PER* 和 *CRY* 则在日间表达下降, 夜间上升。相应地, *OPG* 的表达日升夜降, 而 *RANKL* 和 *CTSK* 则显示出日降夜升的变化。研究发现, 控制干预时间点为单一变量, 不同时间点的干预可以提供不同程度的骨保护作用。在细胞水平, 昼夜节律紊乱导致的各种生物钟基因表达变化, 包括 *BMALI*、*CLOCK*、*REV-ERB α* 、*PERs*、*CRYs* 等主要通过影响骨细胞的功能或活性来改变骨转换。与成骨细胞相比, 破骨细胞功能相关的基因表达在每日规律的明暗交替的光照中被发现是最有节律性的。但是, 成骨细胞与其他骨代谢相关细胞的基因表达同样具有昼夜振荡, 表明所有的骨组织细胞类型活动均存在节律, 并共同促进节律性的骨重建^[4, 40]。

2.2.1 核心生物钟基因 *BMALI* 和 *CLOCK* 调控骨代谢

BMALI 在各种骨组织中表达并影响骨代谢进程, 其表达异常与骨骼发育不良、骨关节炎、骨质疏

松等骨骼疾病有关^[41]。首先, 分析 *BMALI* 和 *CLOCK* 在介导骨吸收过程的破骨细胞中的作用可以发现, 破骨细胞特异性敲除 *BMALI* 会导致破骨细胞分化减少而出现骨量较高的表型^[42]。而一项关于骨性下颌骨发育不全 (skeletal mandibular hypoplasia, SMH) 的动物实验表明, SMH 小鼠的下颌骨中 *BMALI* 表达降低, 而 *BMALI* 蛋白可直接与 *OPG* 启动子结合并上调其表达, 从而抑制破骨细胞分化, 因此认为 *BMALI* 缺乏导致的 SMH 是由于破骨细胞分化加快引起^[43]。但是, 2019 年的研究发现, 在小鼠中条件性敲除破骨细胞 *BMALI* 后, 并没有出现骨小梁或皮质骨参数的变化, 破骨细胞在体外分化也未受影响^[44]。同时, 该研究还发现, 成年后小鼠的骨量更多受 BMSC 而非破骨细胞的内在生物钟控制。多项关于 *BMALI* 与破骨细胞分化的研究得出了完全不一致的结论, 其中各项研究所选取小鼠的性别以及取材时的周龄各不相同可能是原因之一, 另外破骨细胞与成骨细胞之间的串扰机制、BMSC 对破骨细胞活动的间接影响或许也是被忽略的因素。

探究 *BMALI* 和 *CLOCK* 对成骨细胞的影响, 可以发现 *BMALI* 通过调节 BMP2 的表达促进成骨分化的结论在成骨细胞和成骨细胞系 MC3T3-E1 中得到支持^[45]。而另一项条件性敲除 *CLOCK* 的动物研究指出, 蛋白质二硫键异构酶家族 A 成员 3 (protein disulfide isomerase family A member 3, PDIA3) 是一种生物钟下游基因, 其编码的蛋白是 1,25-二羟基-维生素 D₃(1 α ,25(OH)₂D₃) 受体。*CLOCK* 即作为 PDIA3 的转录激活因子进一步激活 1 α ,25(OH)₂D₃ 及下游的 PKC 信号通路, 促进小鼠成骨细胞分化^[46]。若继续考虑成骨细胞与破骨细胞之间的相互作用, 则会发现已有研究证实成骨细胞中 *BMALI* 的缺失可加快破骨细胞介导的骨吸收^[47]。这或许是导致上述内容所提及的 *BMALI* 对破骨细胞分化的功能不一致的原因之一。

再观察 *BMALI* 和 *CLOCK* 在 BMSC 中的作用, 可以发现在 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 大鼠的 BMSC 中, *BMALI* 表达被抑制, RANKL/OPG 比值、抑制因子 κ B (I κ B)、磷酸化 p65 (p-p65)、Casepase3 和磷酸化的 I κ B(p-I κ B) 表达水平较正常健康大鼠均升高, 整体成骨能力降低。过表达 *BMALI* 即可恢复 BMSC 的成骨能力并抑制 NF- κ B 信号通路, 进而抑制破骨细胞的生成及功能^[48]。这在 Mao 等^[49]的研究中再次得到证实, 并为进一步探讨 *BMALI* 在糖尿病性骨质疏松中的作用机制提

供了新方向。并且这两项研究或许也可以对上述内容所提及的 *BMAL1* 对破骨细胞分化的功能不一致做出另一种解释。若单独分析 *BMAL1* 在 BMSC 成骨分化方面的作用机制, 可发现过表达 *BMAL1* 可上调成骨基因 *BMP2*、*Runx2*、*ALP* 和 *OCN* 的表达, *BMAL1* 能通过 *BMP2* 信号通路促进 BMSC 的成骨分化^[50]。作为 *BMAL1* 的二聚化伙伴, 人 BMSC 中 *CLOCK* 敲除则在不改变周期振荡的情况下, 诱导 *BMAL1* 的表达下调和振荡幅度的降低, 引起 BMSC 向脂肪细胞分化并轻度抑制 *OCN* 的表达, 但不足以支撑 *CLOCK* 敲除显著抑制 BMSC 的成骨分化的结论^[51]。这说明单纯敲除 *CLOCK* 基因的效应可能不至于导致对骨代谢产生巨大影响。

在软骨细胞中, 也有证据支持 *BMAL1* 调节其活性和功能, 但具体机制尚未明确^[52]。在人的卵巢颗粒样细胞系 KNG 细胞中, *CLOCK* 敲除导致雌二醇表达水平降低, 其中 *BMP* 系统也参与并协同调节卵巢类固醇激素的生成^[15]。由于雌激素水平与骨稳态密切相关, 因此 *CLOCK* 调节雌激素表达进而调控骨代谢这一路径可能会是一个新的机制研究方向。综上, 相关研究虽存在争论, 但是多数观点指向 *BMAL1* 促进骨形成, *CLOCK* 也具有一定的促进骨形成潜力。

2.2.2 核心生物钟基因 *PERs* 和 *CRYs* 调控骨代谢

在生理情况下, *CRYs* 和 *PERs* 各自对几类骨组织细胞的代谢活动产生不同效应。目前关于破骨细胞中 *CRYs* 和 *PERs* 的功能研究仍在探索, *CRYs* 在培养的原代成骨细胞中的研究非常有限。早前的研究显示, 成骨细胞中 *PERs* 的缺乏使小鼠表现出高骨量的表型, 而 *PERs* 在成骨细胞中的正常表达则通过抑制成骨细胞的增殖和细胞周期蛋白 1 的表达, 介导瘦素依赖性交感神经抑制骨形成^[53-54], 表明 *PERs* 负调控骨形成。*PERs* 可能不直接通过改变成骨细胞基因表达而调节骨代谢的结论在后来的研究中得到印证, *PER2* 突变的小鼠与野生型小鼠相比, 成骨特异性标志物与破骨特异性标志物的参数并无差别, 但骨形成率却显著升高, 因此 *PER2* 突变可能导致其他某些调节成骨细胞活性的因子发生改变, 不同水平的系统和细胞自主调控机制似乎都可以调节成骨细胞活性^[55]。而鉴于 BMSC 成骨分化也是骨形成中重要的部分, 大量研究也对 *CRYs* 和 *PERs* 在 BMSC 中的作用进行探索。其中 *CRYs* 作为无脊椎动物中对光敏感的昼夜节律调节因子, 脊椎动物中 *CRYs* 是否具有感光作用也在不断地被

探究。研究发现, 激光照射小鼠 BMSC 后将诱导 *CRY1* 蛋白从细胞质移位细胞核内, 随后调节 BMSC 的细胞外钙化, 促进 BMSC 成骨并抑制成脂分化进而增加骨量^[56]。进一步的机制研究通过在细胞系 C3H10 中抑制 *CRY1* 表达, 发现 *CRY1* 以依赖于 *AKT* 和 *ERK* 信号通路的方式调节细胞的增殖与成骨分化^[57]。对鼠 BMSC 中 *PER2* 的功能进行分析发现 *PER2* 对 BMSC 的成骨分化发挥负调控作用^[5]。而在人 BMSC 中, *PER2* 敲除同 *CLOCK* 敲除一样, 导致 BMSC 向脂肪细胞分化较显著, 成骨分化被抑制但无显著差异。不同的是, *PER2* 敲除还可影响干细胞本身行为, 降低 BMSC 的细胞迁移能力^[51]。

病理情况下, *CRYs* 和 *PERs* 同样影响骨代谢过程, 但目前 *CRYs* 的研究更深入。活化转录因子 4 (activating transcription factor 4, *ATF4*) 是生长期小鼠成骨细胞分化的主要调节因子, *CRY1* 的表达即受到 *ATF4* 介导, 对慢性肾脏疾病的骨代谢和骨强度产生一定影响^[58]。在骨疾病如关节炎中, 褪黑素治疗小鼠抗 II 型胶原抗体诱导的关节炎后, *CRY1* 的 mRNA 和蛋白水平均显著下调, 同时伴随关节软骨和骨结构的退化, 提示 *CRY1* 可能参与褪黑素治疗关节炎的进展^[59]。最新的研究同时观察了正常与骨关节炎患者及小鼠的软骨, 发现在患有关节炎的人和小鼠软骨中, *CRY2* 而非 *CRY1* 表达显著降低。小鼠中 *CRY2* 敲除而非 *CRY1* 敲除表现出软骨、软骨下骨和滑膜组织中病理学改变的严重程度显著增加。野生型和 *CRY2* 敲除小鼠膝关节软骨的 RNA 测序还鉴定出 53 个差异表达的基因, 其中包括已知的 *CRY2* 靶基因 *Nr1d1*、*Nr1d2*、*DBP* 和 *Tef* 等, 表明 *CRY2* 在维持软骨外基质的动态平衡方面发挥积极作用^[60]。

如此看来, *CRYs* 和 *PERs* 虽同为生物节律的负调控因子, 但两者在骨合成代谢和分解代谢中各司其职, *CRYs* 主要具有成骨效应, 而 *PERs* 则对骨形成起负调控作用。

2.2.3 非核心生物钟基因调控骨代谢

在众多的非核心生物钟基因中, 部分基因被证实直接参与骨合成和分解代谢活动过程。功能研究表明, *REV-ERBa* 影响骨髓源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophage-like cells, *BMMs*) 增殖与成骨分化的能力, 其激动剂具有抑制破骨细胞生成、防治因卵巢切除导致的骨丢失的作用^[61], 说明 *REV-ERBa* 可能对骨形成发挥促进作用。然而, 另有证据提示 *REV-ERBa* 与 *Wnt/β-catenin* 交互作用调节

BMSC 增殖, 且 *REV-ERB α* 可能在成骨分化晚期发挥负调控作用^[62]。机制研究则发现, 破骨细胞和成骨细胞分化的部分标志物表达受 *REV-ERB α* 表达水平影响较大。分别抑制破骨细胞和成骨细胞前体细胞中 *REV-ERB α* 表达会引起 TRAP、NFATc1 等破骨因子和 ALP、BSP 等成骨因子的表达水平同时升高, 而过表达破骨细胞和成骨细胞前体细胞中 *REV-ERB α* 时, 则导致破骨分化和成骨分化同步增强, 且伴随 p38 MAPK 信号通路激活, 因此得出 *REV-ERB α* 通过 p38 MAPK 信号通路负调控破骨细胞和成骨细胞分化的结论^[63]。因此, 针对 *REV-ERB α* 对骨形成的功能研究出现了不一致的结果, 尽管机制研究深入挖掘, 仍不能明确它是促进或抑制骨形成。另外, *RORA* 与骨代谢相关研究不多, 仅有离体实验阐释了它通过刺激 MG-63 细胞中 ALP、OCN 等成骨基因和蛋白表达并抑制炎症反应参与成骨细胞代谢^[64]。而 *DEC* 因为其组织特异性, 受 BMP2、PTH 和 PTH 相关蛋白 (PTH-related protein, PTHrp) 的影响, 在软骨细胞中表达上调并调控细胞分化^[65]。另外还有更为少见的生物钟基因 *Nfil3* 和 *Nocturnin*, *Nfil3* 在成骨细胞中表达, 响应肾上腺素能受体信号, 调节 BMP4 的表达进而影响骨代谢。*Nocturnin* 虽不是中枢核心生物钟复合体的一部分, 但受中枢生物钟基因的转录调控, 其缺失可以促进骨形成, 且能挽救罗格列酮诱导的骨丢失^[66-67]。

除此以外, 部分基因虽然尚缺乏直接参与骨代谢调控的证据, 但因为它和骨代谢其他影响因素密切相关, 或许可以间接对骨形成或骨吸收产生影响。如在急性呼吸道感染的小鼠模型中, *RORA* 表达与 Wnt/ β -catenin 信号通路显示出一定联系^[68], 而 Wnt/ β -catenin 信号通路是骨代谢中最经典的信号转导通路之一。因此, 或许可以考虑 *RORA* 是否通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控骨代谢。与 *RORA* 相比, *TIM* 与骨代谢相关研究则至今空白, 尚待探讨。可见, 各种功能研究和机制研究充分证明了非核心生物钟基因在骨代谢过程中的调控作用, 且同一非核心生物钟基因可能在骨代谢的不同阶段发挥不同的效应。

综合各项功能研究、机制研究中离体实验和在体实验的结果, 均可支持生物钟基因调控骨代谢过程的结论。尽管多数生物钟基因在骨代谢调控过程中扮演的角色可被初步定义, 例如 *BMAL1*、*CLOCK*、*CRYs* 可能在骨形成过程中主要发挥正向调控作用, *PERs* 和 *Nocturnin* 则在骨吸收方面占主导作用, 但

是因为某些基因可能在不同阶段的骨细胞活动中发挥不同的作用, 部分生物钟基因经历了长时间的研究仍无法得出一致的结果, 如 *REV-ERB α* 。还有另一部分生物钟基因在骨形成或骨吸收中的作用尚未经过研究, 如 *RORA*、*TIM*、*DEC* 等。因此, 生物钟基因调控骨代谢领域中还存在许多未知仍待探究。生物钟基因骨代谢调控的总结见表 1。

3 小结与展望

骨代谢是一种非常复杂的生理代谢活动, 受多因素影响。各种功能和机制研究均表明 *BMAL1*、*CLOCK* 等核心生物钟基因和 *REV-ERB α* 等非核心生物钟基因在骨的分解与合成代谢中分别扮演不同的角色, 其中 *BMAL1*、*CLOCK*、*CRYs* 倾向于骨的合成代谢, 而 *PERs* 和 *Nocturnin* 更多在骨的分解代谢中占主导, 其他生物钟基因在骨代谢中的角色则还需进一步的研究来确定。生物钟基因异常表达影响骨代谢, 反之, 骨代谢异常也扰乱生物钟基因表达, 并且昼夜节律时相的推移往往还伴随着各种激素、细胞因子及非编码 RNA 等与骨代谢的交互作用, 因此生物钟基因调控骨代谢并非是直接且单向的过程。

最新的研究已将目光放在生物钟基因作为治疗靶点来治疗自身免疫性疾病的领域, 而目前通过靶向生物钟基因治疗骨代谢疾病的研究尚无人涉足。现今倒班工作的人群越来越多, 而昼夜颠倒工作导致骨代谢性疾病易感性增强, 一方面给公共卫生系统带来潜在负担, 而另一方面却为后续研究提供了更多的研究对象。因此, 首先明确各种类型的骨疾病代谢特点, 以生物钟基因调节骨组织生理病理代谢的机制为基础, 综合考虑给药时间及采取综合治疗, 以期达到对骨代谢疾病的及时预防或疗效最大化是未来学者们可以深入研究的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*, 2003, 18: 250-60
- [2] Alexander RK, Liou YH, Knudsen NH, et al. *Bmal1* integrates mitochondrial metabolism and macrophage activation. *Elife*, 2020, 9: e54090
- [3] Zhuang X, Forde D, Tsukuda S, et al. Circadian control of hepatitis B virus replication. *Nat Commun*, 2021, 12: 1658
- [4] Schilperoort M, Bravenboer N, Lim J, et al. Circadian disruption by shifting the light-dark cycle negatively affects bone health in mice. *FASEB J*, 2020, 34: 1052-64
- [5] Zhou H, Wang Y, Zhao Q. The interaction between *Bmal1*

表1 生物钟基因对骨代谢的调控

生物钟基因 表达水平	细胞/组织类型	种属	对骨代谢效应	参考文献
<i>BMAL1</i> ↓	破骨细胞	小鼠	抑制破骨细胞分化	[42]
<i>BMAL1</i> ↓	下颌骨标本, RAW 264.7细胞 和骨髓间充质干细胞	人类和 小鼠	促进破骨细胞分化	[43]
<i>BMAL1</i> ↓	破骨细胞和骨髓间充质干细胞	小鼠	不改变破骨细胞分化能力并增强骨转换, 但降低整体骨量	[44]
<i>BMAL1</i> ↑	骨髓间充质干细胞	大鼠	促进成骨分化并抑制破骨细胞生成	[48]
<i>BMAL1</i> ↑	骨髓间充质干细胞	大鼠	促进成骨分化	[49]
<i>BMAL1</i> ↑	骨髓间充质干细胞	大鼠	促进成骨分化	[50]
<i>BMAL1</i> ↑	MC3T3-E1细胞	小鼠	促进成骨分化	[45]
<i>BMAL1</i> ↓	成骨细胞	小鼠	促进骨吸收	[47]
<i>BMAL1</i> ↑	ADTC5细胞	小鼠	促进软骨发生	[52]
<i>CLOCK</i> and <i>PER2</i> ↓	骨髓间充质干细胞	小鼠	促进成脂分化但对成骨分化无显著影响	[51]
<i>CLOCK</i> ↓	成骨细胞	小鼠	促进成骨细胞凋亡	[46]
<i>CRY1</i> -	间充质干细胞	小鼠	增加CRY1入核并促进间充质干细胞的细胞外钙化	[56]
<i>CRY1</i> ↑	成骨细胞	大鼠	促进成骨细胞增殖	[58]
<i>CRY1</i> ↓	C3H10细胞	小鼠	促进成骨分化和细胞增殖	[57]
<i>CRY1</i> ↓	软骨和软骨下骨	小鼠	增加软骨和软骨下骨的侵蚀	[59]
<i>CRY2</i> ↓	软骨、软骨下骨和滑膜	人类和 小鼠	加剧软骨、软骨下骨和滑膜的病理变化	[60]
<i>PERs</i> ↓	骨组织	小鼠	增加骨量	[53]
<i>PER2</i> ↓	腰椎椎体和胫骨	小鼠	增加骨形成率	[55]
<i>PER2</i> ↓	髓间充质干细胞	小鼠	促进成骨分化	[5]
<i>PER2</i> ↓	MC3T3-E1细胞, C2C12, 10T1/2 细胞和原代成骨细胞	小鼠	促进细胞增殖	[54]
<i>REV-ERBα</i> ↑	骨髓源巨噬细胞	小鼠	抑制破骨细胞生成	[61]
<i>REV-ERBα</i> ↑	破骨细胞和成骨细胞前体细胞	小鼠	抑制破骨细胞和成骨细胞分化	[63]
<i>REV-ERBα</i> ↑	骨髓间充质干细胞	小鼠	抑制晚期的骨形成	[62]
<i>RORA</i> ↑	MG-63细胞	人类	促进成骨基因和蛋白的表达	[64]
<i>DEC</i> ↓	软骨细胞	小鼠	抑制软骨细胞分化	[65]
<i>Nfil3</i> -	MC3T3-E1细胞	小鼠	调节骨代谢, 具体机制尚不明	[66]
<i>Nocturnin</i> ↓	MC3T3-E1 C4 前体成骨细胞	小鼠	促进骨形成	[67]

↑: 过表达; ↓: 低表达; -: 表达不变

- and *Per2* in mouse BMSC osteogenic differentiation. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3407821
- [6] Luchavova M, Zikan V, Michalska D, et al. The effect of timing of teriparatide treatment on the circadian rhythm of bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *Eur J Endocrinol*, 2011, 164: 643-8
- [7] Schibler U. The daily rhythms of genes, cells and organs. *Biological clocks and circadian timing in cells*. EMBO Rep, 2005, 6: S9-13
- [8] Weger M, Diotel N, Dorsemans AC, et al. Stem cells and the circadian clock. *Dev Biol*, 2017, 431: 111-23
- [9] Debruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. *CLOCK* and *NPAS2* have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 543-5
- [10] Aryal RP, Kwak PB, Tamayo AG, et al. Macromolecular assemblies of the mammalian circadian clock. *Mol Cell*, 2017, 67: 770-82.e6
- [11] Welz PS, Zinna VM, Symeonidi A, et al. *BMAL1*-driven tissue clocks respond independently to light to maintain homeostasis. *Cell*, 2019, 177: 1436-47.e12
- [12] Yang N, Smyllie NJ, Morris H, et al. Quantitative live imaging of Venus: *BMAL1* in a mouse model reveals complex dynamics of the master circadian clock regulator. *PLoS Genet*, 2020, 16: e1008729
- [13] Ray S, Valekunja UK, Stangherlin A, et al. Circadian rhythms in the absence of the clock gene *Bmal1*. *Science*, 2020, 367: 800-6
- [14] Beker MC, Caglayan B, Caglayan AB, et al. Interaction of melatonin and *Bmal1* in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Sci Rep*, 2019, 9: 19082
- [15] Nagao S, Iwata N, Soejima Y, et al. Interaction of ovarian

- steroidogenesis and clock gene expression modulated by bone morphogenetic protein-7 in human granulosa cells. *Endocr J*, 2019, 66: 157-64
- [16] Cao Q, Zhao X, Bai J, et al. Circadian clock cryptochrome proteins regulate autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 12548-53
- [17] Wisor JP, Pasumarthi RK, Gerashchenko D, et al. Sleep deprivation effects on circadian clock gene expression in the cerebral cortex parallel electroencephalographic differences among mouse strains. *J Neurosci*, 2008, 28: 7193-201
- [18] Fribourgh JL, Srivastava A, Sandate CR, et al. Dynamics at the serine loop underlie differential affinity of cryptochromes for CLOCK:BMAL1 to control circadian timing. *Elife*, 2020, 9: e52575
- [19] Patke A, Murphy PJ, Onat OE, et al. Mutation of the human circadian clock gene *CRY1* in familial delayed sleep phase disorder. *Cell*, 2017, 169: 203-15.e13
- [20] Kobayashi M, Morinibu A, Koyasu S, et al. A circadian clock gene, *PER2*, activates HIF-1 as an effector molecule for recruitment of HIF-1 α to promoter regions of its downstream genes. *FEBS J*, 2017, 284: 3804-16
- [21] Chappuis S, Ripperger JA, Schnell A, et al. Role of the circadian clock gene *Per2* in adaptation to cold temperature. *Mol Metab*, 2013, 2: 184-93
- [22] Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 2002, 110: 251-60
- [23] Dadon-Freiberg M, Chapnik N, Froy O. REV-ERB α alters circadian rhythms by modulating mTOR signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 521: 111108
- [24] Milicevic N, Mazzaro N, De Bruin I, et al. Rev-Erb α and photoreceptor outer segments modulate the circadian clock in retinal pigment epithelial cells. *Sci Rep*, 2019, 9: 11790
- [25] Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, et al. REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating mammalian circadian output. *Sci Rep*, 2019, 9: 10171
- [26] Wang S, Li F, Lin Y, et al. Targeting REV-ERB α for therapeutic purposes: promises and challenges. *Theranostics*, 2020, 10: 4168-82
- [27] Yue J, He J, Wei Y, et al. Decreased expression of Rev-Erb α in the epileptic foci of temporal lobe epilepsy and activation of Rev-Erb α have anti-inflammatory and neuroprotective effects in the pilocarpine model. *J Neuroinflammation*, 2020, 17: 43
- [28] Gaertner VD, Michel S, Curtin JA, et al. Nocturnal asthma is affected by genetic interactions between *RORA* and *NPSR1*. *Pediatr Pulmonol*, 2019, 54: 847-57
- [29] Guissart C, Latypova X, Rollier P, et al. Dual molecular effects of dominant *RORA* mutations cause two variants of syndromic intellectual disability with either autism or cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet*, 2018, 102: 744-59
- [30] Koh K, Zheng X, Sehgal A. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science*, 2006, 312: 1809-12
- [31] Kurien P, Hsu PK, Leon J, et al. TIMELESS mutation alters phase responsiveness and causes advanced sleep phase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 12045-53
- [32] Rageul J, Park JJ, Zeng PP, et al. SDE2 integrates into the TIMELESS-TIPIN complex to protect stalled replication forks. *Nat Commun*, 2020, 11: 5495
- [33] Bianco JN, Bergoglio V, Lin YL, et al. Overexpression of Claspin and Timeless protects cancer cells from replication stress in a checkpoint-independent manner. *Nat Commun*, 2019, 10: 910
- [34] Liu Q, Wu Y, Yoshizawa T, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC2 functions as an anti-apoptotic factor during paclitaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Mol Med*, 2016, 38: 1727-33
- [35] Liu Q, Wu Y, Seino H, et al. Correlation between DEC1/DEC2 and epithelial mesenchymal transition in human prostate cancer PC3 cells. *Mol Med Rep*, 2018, 18: 3859-65
- [36] Sato F, Kohsaka A, Bhawal UK, et al. Potential roles of *Dec* and *Bmal1* genes in interconnecting circadian clock and energy metabolism. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 781
- [37] Bunker MK, Walisser JA, Sullivan R, et al. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal-1* locus. *Genesis*, 2005, 41: 122-32
- [38] Khosla S. Pathogenesis of age-related bone loss in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2013, 68: 1226-35
- [39] Tong X, Chen X, Zhang S, et al. The effect of exercise on the prevention of osteoporosis and bone angiogenesis. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 8171897
- [40] Fujihara Y, Kondo H, Noguchi T, et al. Glucocorticoids mediate circadian timing in peripheral osteoclasts resulting in the circadian expression rhythm of osteoclast-related genes. *Bone*, 2014, 61: 1-9
- [41] Chen G, Tang Q, Yu S, et al. The biological function of BMAL1 in skeleton development and disorders. *Life Sci*, 2020, 253: 117636
- [42] Xu C, Ochi H, Fukuda T, et al. Circadian clock regulates bone resorption in mice. *J Bone Miner Res*, 2016, 31: 1344-55
- [43] Zhou X, Yu R, Long Y, et al. BMAL1 deficiency promotes skeletal mandibular hypoplasia via OPG downregulation. *Cell Prolif*, 2018, 51: e12470
- [44] Tsang K, Liu H, Yang Y, et al. Defective circadian control in mesenchymal cells reduces adult bone mass in mice by promoting osteoclast function. *Bone*, 2019, 121: 172-80
- [45] Min HY, Kim KM, Wee G, et al. Bmal1 induces osteoblast differentiation via regulation of BMP2 expression in MC3T3-E1 cells. *Life Sci*, 2016, 162: 41-6
- [46] Yuan G, Hua B, Yang Y, et al. The circadian gene *Clock* regulates bone formation via PDIA3. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 861-71
- [47] Takarada T, Xu C, Ochi H, et al. Bone resorption is regulated by circadian clock in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 872-81
- [48] Li X, Liu N, Gu B, et al. BMAL1 regulates balance of osteogenic-osteoclastic function of bone marrow

- mesenchymal stem cells in type 2 diabetes mellitus through the NF- κ B pathway. *Mol Biol Rep*, 2018, 45: 1691-704
- [49] Mao X, Li X, Hu W, et al. Downregulated brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1 inhibits osteogenesis of BMSCs through p53 in type 2 diabetes mellitus. *Biol Open*, 2020, 9: bio051482
- [50] Huang Z, Wei H, Wang X, et al. Icariin promotes osteogenic differentiation of BMSCs by upregulating BMAL1 expression via BMP signaling. *Mol Med Rep*, 2020, 21: 1590-6
- [51] Boucher H, Vanneaux V, Domet T, et al. Circadian clock genes modulate human bone marrow mesenchymal stem cell differentiation, migration and cell cycle. *PLoS One*, 2016, 11: e0146674
- [52] Li D, Zhang R, Sun Q, et al. Involvement of Bmal1 and circadian clock signaling in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells by fluoride. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 204: 111058
- [53] Fu L, Patel MS, Bradley A, et al. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell*, 2005, 122: 803-15
- [54] Abe T, Sato T, Yoda T, et al. The period circadian clock 2 gene responds to glucocorticoids and regulates osteogenic capacity. *Regen Ther*, 2019, 11: 199-206
- [55] Marond EE, Schilling AF, Seitz S, et al. The clock genes Period 2 and Cryptochrome 2 differentially balance bone formation. *PLoS One*, 2010, 5: e11527
- [56] Kushibiki T, Awazu K. Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg*, 2009, 27: 493-8
- [57] Zhou L, He J, Sun S, et al. Cryptochrome 1 regulates osteoblast differentiation via the AKT kinase and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Cell Reprogram*, 2019, 21: 141-51
- [58] Pawlak D, Domaniewski T, Znorko B, et al. The impact of peripheral serotonin on leptin-brain serotonin axis, bone metabolism and strength in growing rats with experimental chronic kidney disease. *Bone*, 2017, 105: 1-10
- [59] Bang J, Chang HW, Jung HR, et al. Melatonin attenuates clock gene *Cryptochrome1*, which may aggravate mouse anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Rheumatol Int*, 2012, 32: 379-85
- [60] Bekki H, Duffy T, Okubo N, et al. Suppression of circadian clock protein cryptochrome 2 promotes osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020, 28: 966-76
- [61] Song C, Tan P, Zhang Z, et al. REV-ERB agonism suppresses osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss partially via FABP4 upregulation. *FASEB J*, 2018, 32: 3215-28
- [62] He Y, Lin F, Chen Y, et al. Overexpression of the circadian clock gene *Rev-erba* affects murine bone mesenchymal stem cell proliferation and osteogenesis. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1194-204
- [63] Kim K, Kim JH, Kim I, et al. *Rev-erba* negatively regulates osteoclast and osteoblast differentiation through p38 MAPK signaling pathway. *Mol Cells*, 2020, 43: 34-47
- [64] Benderdour M, Fahmi H, Beaudet F, et al. Nuclear receptor retinoid-related orphan receptor α 1 modulates the metabolic activity of human osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 2160-9
- [65] Kato Y, Kawamoto T, Fujimoto K, et al. DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 coordinate physiological processes, including circadian rhythms in response to environmental stimuli. *Curr Top Dev Biol*, 2014, 110: 339-72
- [66] Hirai T. Regulation of clock genes by adrenergic receptor signaling in osteoblasts. *Neurochem Res*, 2018, 43: 129-35
- [67] Guntur AR, Kawai M, Le P, et al. An essential role for the circadian-regulated gene nocturnin in osteogenesis: the importance of local timekeeping in skeletal homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1237: 58-63
- [68] Li J, Xue K, Zheng Y, et al. RORA overexpression alleviates nasal mucosal injury and enhances red blood cell immune adhesion function in a mouse model of allergic rhinitis via inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019, 180: 79-90