

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.043

# 软骨形成因子及骨生成因子在骨重塑中的作用\*

王直兵 综述,张 峡<sup>△</sup>,张 瑗,程兴旺,郝 勇,张玉梅,周 跃 审校

(第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

[关键词] Sox-9; RunX-2; 软骨; 软骨下骨

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)27-3865-03

软骨损伤会引起软骨下骨改变,然损伤后修复,对骨科医师来讲,一直是个难题。因软骨无血管,只有软骨细胞,损伤后其自身修复能力非常有限。目前,许多方法的治疗效果均不理想。目前,学术界普遍认为软骨全层损伤会引起骨关节炎,最终执行关节置换<sup>[1]</sup>。近年来,许多学者发现,在性别的分化、胚胎的发育、骨骼及神经系统发育的过程中,SOX 基因家族起着至关重要的作用。有研究揭示在胚胎的软骨生发区,sry 相关高迁移率蛋白转录因子(Sry-related high-mobility-group box transcription factor, Sox-9)的表达很高,并影响 II 型胶原(COL II)的合成,对软骨生成产生作用<sup>[2]</sup>。与此同时,runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, RunX-2)在成骨及软骨细胞的分化、成熟、基质蛋白生成方面都有着重要的作用。该综述针对软骨诱导生成蛋白 Sox-9 和骨诱导生成蛋白 RunX-2 对软骨损伤后,软骨下骨的重塑作用作一总结。

## 1 Sox-9 分子的生物学特征

**1.1 Sox 基因家族** 近年来,许多学者发现 SOX 基因家族,在性别的分化、胚胎的发育、骨骼及神经系统发育的过程中,起着至关重要的作用。近年对 Sox-9 基因的研究一直是个热点。在人类 17 号染色体,Sox-9 位于其长臂,HMG-box 保守基因为其主要特征,该基因能与 DNA 序列特异性结合。许多研究证实,SOX 转录因子具有维持软骨细胞表型的重要作用<sup>[3-4]</sup>。当今,许多学者认为除了肥大软骨细胞,在肌肉骨骼系统发育过程中,Sox-9 几乎表达于所有软骨细胞<sup>[4]</sup>。

**1.2 软骨细胞与 Sox-9 的关系** 体外实验发现,Sox-9 能结合特定软骨基质蛋白,并将其激活,例如 COL2A1 等胶原蛋白以及糖胺聚糖等<sup>[3-4]</sup>。Sox-9 部分结合 COL2A1 编码序列,说明 Sox-9 对 COL2A1 表达进行调控。部分研究者认为,Sox-9 功能上调控软骨的发生,然而其具体机制仍不清楚。有文献揭示,软骨祖细胞的增殖、募集、成熟以及肥大后的转化,都与 Sox-9 的表达相关。但当 Sox-9 基因停止表达后,相应的软骨特异性分子(如胶原蛋白及糖胺聚糖)也停止表达,但在缺失 Sox-9 基因的小鼠身上却表现出发育不全的弯肢<sup>[5]</sup>。Sox-9 是调节软骨分化发育的重要转录蛋白,在软骨细胞膜表面存在 aggrecan 蛋白增强蛋白 COL II, Sox-9 与其结合并使之激活、表达,进一步调节软骨分化。有研究发现,在非软骨细胞内存在软骨基因,在该基因上存在增强子序列,Sox-9 能与之结合并使其激活,导致非软骨细胞产生软骨细胞样表型<sup>[4]</sup>。Kim 等<sup>[6]</sup>及其研究团队将聚(乳酸-羟基乙酸)纳米微球用活化后的 PEI/ Sox-9 基因转染入骨髓间充质干细胞,不管是体内还是体外实验均显示 II 型胶原、Aggrecan、COMP 基因的表达上调,

同时糖胺聚糖的合成也增加,利用阿利辛蓝、番红-固绿染色也证实,通过非病毒 Sox-9 基因转染至软骨细胞也能成功控制软骨的分化。陈金武等<sup>[7]</sup>将 Sox-9 基因以脂质体形式成功转入胎儿骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs),转染后的第 2、16 天时,他们发现标签蛋白 Flag 以及过表达的 Sox-9 使 BMSCs 发生软骨细胞分化,软骨特异性蛋白 COL II 的表达也增加,并证实标签蛋白 Flag 由 Sox-9 表达。徐忠世等<sup>[8]</sup>也做了类似研究,他们将成功转染 Sox-9 基因后的 BMSCs,种植于支架 PLGA 内,在体外共培养后,移植入软骨缺损后的动物模型身上,HE 染色显示:在第 12 周时,缺损的软骨区域出现大量成熟的软骨细胞,大量的软骨基质及胶原纤维在胞质内出现,类似于正常软骨。这些都表明对种子细胞行 Sox-9 基因的转染,可以成功实现损伤软骨的修复。

综上所述可以得出,Sox-9 参与骨髓间充质干细胞向软骨细胞方向分化的调控,对软骨祖细胞增殖、募集、成熟及其肥大转化发挥着至关重要的作用,控制软骨特异性细胞外基质的表达,是软骨形成、修复重建的主要调控者。

## 2 RunX-2 分子构成与特性

RunX-2 属于 runt 结构域,为 RunX 家族转录因子。因 N-端序列不同,RunX-2 有 3 种异构形式<sup>[9]</sup>,按起始氨基酸序列的不同分为 I、II、III 型, I 型为 MRIPVD, II 型为 MASNSL, III 型为 MLHSPH。每种异构体都被两种转录启动子 P1 和 P2 调控,同时还具有 NF-KB、AP-1、c-Myb 和 HLH 等多种其他转录因子结合位点。研究显示,即使 RunX-2 只存在 1 个完整的成骨基因结合位点,CBFcd 蛋白的过表达也能对其发挥反馈性抑制作用<sup>[10]</sup>。这个现象说明在 CBFcd 的表达过程中,CBFcd 蛋白自身结合位点及成骨基因的存在是其负反馈调控的关键。该机制是成骨细胞调节分化过程中的重要环节,如果没有 CBFcd 蛋白自身紧密及严格的负反馈调节机制,成骨细胞分化过程中精确的生物学功能调控根本没办法完成。

## 3 Run-2 参与的骨代谢

**3.1 RunX-2 与成骨细胞的关系** 研究显示,被敲除 RunX-2 基因的小鼠均失去了膜内及软骨内成骨能力,这一研究表明,在成骨细胞的分化过程中 RunX-2 基因具有极其重要的作用<sup>[11]</sup>。即使存在基质金属蛋白酶 2(bone morphogenetic protein, BMP2),缺失 RunX-2 基因的小鼠颅骨细胞,无论体内还是体外均失去了分化为成骨细胞的能力,但却保留了向脂肪细胞及软骨细胞分化的潜力。因此可以看出,缺失 RunX-2 基因的 BMSCs 虽然丧失了向成骨细胞分化的能力,但仍具有向脂肪细胞及软骨细胞分化的能力<sup>[12]</sup>。RunX-2 基因在早期时能

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81171720)。 作者简介:王直兵(1985—),主治医师,硕士,主要从事骨关节损伤与修复的研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wangzhiqiang18716@126.com。

促进 MSCs 分化为成骨细胞, Gersbach 等<sup>[13]</sup>通过转基因的技术成功使 RunX-2 在原代成肌细胞中稳定表达, 成肌细胞获得典型的成骨作用, 骨基质生成相关基因的表达明显增加, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)分泌显著增加, 并出现骨质矿化。研究显示, 首先将 BMLB/c 小鼠颅骨造成 5mm 的缺损, MSCs 转导 Ad-Cbhl/osf2 后种植于缺损区域, 在体内观察 Cbfa1/Runx-2 诱导骨形成, 4 周后, 发现 85% 的缺损区域出现骨性愈合, 在对照实验组却没有发现骨愈合<sup>[14]</sup>。有文献显示, 在体外, RunX-2 过表达的成骨细胞不仅不会使骨形成增加, 相反还会加速破骨细胞分化, 破骨细胞分化因子的表达增加, 促进骨的吸收<sup>[15-17]</sup>。

**3.2 软骨细胞与 RunX-2 基因** RunX-2 的表达随软骨细胞的成熟逐渐增加, 在肥大软骨细胞内, RunX-2 基因大量表达, 与 COL II 的表达呈正相关。体外实验显示, RunX-2 基因敲除后, 小鼠软骨细胞的分化被抑制, 只有少部分骨骼内发现 X 型胶原表达, 出现成脂分化<sup>[18-20]</sup>。在转基因小鼠体内, 因 RunX-2 基因的过表达, 出现软骨细胞早熟, 骨化加速; 在未成熟软骨细胞内, RunX-2 基因的连续表达能诱使非成熟软骨细胞的肥大<sup>[21, 21]</sup>。这些表明, 软骨细胞的成熟及其分化与 RunX-2 基因密不可分; 此外, 有研究表明, RunX-2 基因还参与血管长入, 基因缺失后, 血管入侵的能力明显下降<sup>[22]</sup>。将转入小鼠体内后, 肥大软骨细胞募集不能, 该现象表明通过调节终末肥大软骨细胞中的基质蛋白相关基因, 加速软骨细胞的终末期分化, 能加快软骨的血管长入过程以及软骨细胞分化为终末细胞<sup>[23-24]</sup>。

**3.3 RunX-2 对细胞外基质的调节** 研究显示, 在成骨分化相关基因骨钙蛋白基因的启动子中具有 2 个成骨细胞特定元素(osteoblast specific elements, OSE)序列, 该序列为 RunX-2 结合位点。骨桥接素、ALP(alkaline phosphatase)、骨涎蛋白和 I 型胶原等其他成骨分化相关基因的启动子中也存在 OSE。由此, RunX-2 与启动子中的 OSE 序列结合后, 可有效促进骨细胞外基质的合成, 包括 I 型胶原、骨保护素、骨唾蛋白、骨钙素等<sup>[25-26]</sup>。

以上诸多研究显示, RunX-2 基因不仅能使原代成肌样细胞分化为具有矿化能力的成骨样细胞表型, 还能促进 MSCs 向成骨细胞系分化; 与此相同, Inman 等<sup>[27]</sup>研究也显示, 在早期 Runx-2 能促进成骨细胞分化, 可是, 在晚期却为抑制成骨细胞分化。而且, 在软骨细胞向终末细胞的分化过程及胞外基质形成方面, Runx-2 都表现出极其重要的作用, 充分揭露了 Runx-2 基因在损伤软骨和软骨下骨修复过程中的重要地位。

#### 4 展 望

在软骨细胞内, Sox-9 的表达在软骨祖细胞的增殖、募集成熟以及向肥大软骨细胞的转化方面起着至关重要的作用, 对软骨的发生, 损伤后修复、重建起主要调控; RunX-2 基因不仅能促进成骨细胞的分化及骨形成, 加速软骨细胞的分化成熟及后期血管化, 还参与破骨细胞分化、成熟及其细胞外基质生成, 这些都有力地说明了在软骨与软骨下骨的修复重建中, Sox-9 和 RunX-2 有着极其重要的作用。

鉴于此, 如果能在基因工程技术中, 充分发挥该两种基因的作用, 在不久的将来有望实现软骨及软骨下骨损伤后的修复。

#### 参考文献

[1] Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, et al. Biochemical and biomechanical properties of lesion and adjacent articular

cartilage after chondral defect repair in an equine model [J]. *Amer J Sp Med*, 2005, 33(11): 1647-1653.

- [2] Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos [J]. *Nat Genet*, 1995, 9(1): 15-20.
- [3] Lefebvre V, Huang WD, Harley VR, et al. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha 1(II) collagen gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(4): 2336-2346.
- [4] Lefebvre V, Behringer RR, De Crombrugge B. L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway [J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001, 9(A): S69-S75.
- [5] Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9 [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18(3): 213-219.
- [6] Kim JH, Park JS, Yang HN, et al. The use of biodegradable PLGA nanoparticles to mediate SOX9 gene delivery in human mesenchymal stem cells (hMSCs) and induce chondrogenesis [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(1): 268-278.
- [7] 陈金武, 吴军正, 李焰, 等. SOX-9 基因过表达诱导人骨髓基质干细胞向软骨细胞分化 [J]. *临床口腔医学杂志*, 2003, 19(12): 712-724.
- [8] 徐忠世, 林博文, 卢小虎, 等. SOX-9 转染骨髓基质细胞与聚乳酸-羟基乙酸共聚物的生物相容性 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(51): 9559-9562.
- [9] Stock M, Otto F. Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(3): 506-517.
- [10] Drissi H, Luc Q, Shakoori R, et al. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 184(3): 341-350.
- [11] Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, et al. RUNX-2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro [J]. *Cell Sci*, 2004, 117(Pt 3): 417-425.
- [12] Kobayashi H, Gao Yh, Ueta C, et al. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2): 630-636.
- [13] Gersbach CA, Byers B, Pavlath GK, et al. Runx 2/cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 300(2): 406.
- [14] Zheng H, Guo Z, Ma Q, et al. Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74(2): 194-203.
- [15] Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155(1): 157-166.
- [16] Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, et al. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17): 6222-6233.

- [17] Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, et al. Changes in RunX-2/cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(2):213-221.
- [18] Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development[J]. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21(4):193-197.
- [19] Inada M, Yasui T, Nomura S, et al. Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice[J]. *Developmental Dynamics*, 1999, 214(4):279-290.
- [20] Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, et al. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(12):8695-8702.
- [21] Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, et al. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes[J]. *J Cell Biol*, 2001, 153(1):87-100.
- [22] Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, et al. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(4):467-481.
- [23] Himeno M, Enomoto H, Liu W, et al. Impaired vascular invasion of Cbfa1-deficient cartilage engrafted in the spleen[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(7):1297-1305.
- [24] Kern B, Shen J, Starbuck M, et al. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10):7101-7107.
- [25] Viereck V, Siggekkow H, Tauber S, et al. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 86(2):348-356.
- [26] Komorl F. Regulation of skeletal development by the RUNX family of transcription factors[J]. *J Cell Biochemistry*, 2005, 95(3):445-453.
- [27] Inman CK, Shore P. The osteoblast transcription factor Runx2 is expressed in mammary epithelial cells and mediates osteopontin expression[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(49):48684-48689.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-04-06)

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.044

## 内皮细胞蛋白 C 受体与脓毒症关系的研究进展\*

梁燕冰 综述, 廖品琥<sup>△</sup> 审校

(右江民族医学院附属医院呼吸科, 广西百色 533000)

[关键词] 脓毒症; 内皮细胞蛋白 C 受体; 活化蛋白 C

[中图分类号] R631

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)27-3867-04

脓毒症是临床常见、由感染引起的全身性炎症反应综合征(SIRS), 易发展成为严重脓毒症和脓毒症休克, 甚至多器官功能障碍(MODS)。其病情发展迅速、治疗费用高, 医疗资源消耗大, 病死率高<sup>[1-2]</sup>。在脓毒症病情发展过程中, 凝血系统的紊乱、尤其蛋白 C 系统功能的异常尤为突出。蛋白 C 系统主要包括蛋白 C(PC)、内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)、蛋白 S(PS) 血栓调节蛋白(TM)及凝血酶, 其终产物均为活化蛋白 C(APC)。EPCR 参与了 PC 的活化和脓毒症的发生发展过程, 下文简述 EPCR 的一般性质及其在脓毒症中的作用。

### 1 EPCR 的一般性质

EPCR 是 PC/APC 的高亲和力和内皮细胞表面受体, 主要表达于大血管以及大部分小动、静脉的内皮细胞表面<sup>[3]</sup>。虽然 EPCR 最初仅被界定为内皮细胞受体, 但在血管平滑肌细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、单核细胞、角化细胞、海马神经元、心肌细胞、胎盘滋养层细胞也可检测到它的表达<sup>[4]</sup>。

**1.1 EPCR 的基因结构** 人 EPCR 基因(PROCR)位于 20 号染色体 q11.2, 全长约 8 kb, 含 4 个外显子和 3 个内含子, 可编码由 238 个氨基酸组成的蛋白。第一个外显子(1~24 氨基酸残基)

可编码信号肽及 5'非翻译区, 第二(24~108 氨基酸残基)和第三个外显子(108~201 氨基酸残基)则编码绝大多数胞外区域, 而第四外显子(201~238 氨基酸残基)编码 3'非翻译区和剩余的蛋白<sup>[5]</sup>。EPCR 基因 5'侧翼序列有两个主要的转录起始位点, 分别位于 TATA 盒元件下游的 79 bp 和 82 bp 处<sup>[6]</sup>。该区域还存在多个转录因子结合位点 Sp1, 对 EPCR 的表达具有重要作用<sup>[7]</sup>。EPCR 基因的变异主要在内含子 1 的位点 C2532T、内含子 2 多态性的 C6333T、外显子 3 多态性的 C6622T、3'UTR 多态性的 C4078G 和外显子 4 多态性的 A6936G<sup>[8-11]</sup>。

**1.2 EPCR 蛋白结构** 人 EPCR 蛋白是一种多功能的 I 型跨膜糖蛋白, 在序列及三维空间结构上和 CD1/MHC I 蛋白家族受体具有同源性。但与 CD1/MHC I 受体不同的是, EPCR 缺乏  $\alpha 3$  域, 不能与  $\beta 2$  微球蛋白相结合。EPCR 有结合型 EPCR(mEPCR)和血浆可溶性 EPCR(sEPCR)两种形式, 其中 mEPCR 主要在血管内皮细胞表面表达。EPCR 在金属蛋白酶的作用下从内皮细胞表面脱落, 形成 sEPCR。

### 2 EPCR 与脓毒症的关系

EPCR 作为 APC 生成的辅助因子, 促进 PC 转化为 APC;

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560321);2014 年广西医学高层次骨干人才培养“139”计划培养人选项项目;广西高校急重症分子免疫研究重点实验室项目(yy2015ky002);广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2015222)。 作者简介:梁燕冰(1993-),在读硕士,主要从事脓毒症基因学机制的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail:1067532076@qq.com。