

软骨细胞分化调节的分子机制研究进展

颜炜群 杨同书*

(白求恩医科大学应用基础医学研究所 长春 130021)

软骨内成骨是动物骨形成(除部分扁平骨以外)的基本方式之一。在胚胎软骨内成骨的过程中,未分化的间充质细胞向软骨细胞分化,形成透明软骨(软骨雏形)。然后这些软骨细胞开始分裂,经过增殖、成熟、肥大化等一系列的细胞分化,出现以基质小胞(matrix vesicles)为核心的细胞外基质钙化。进一步,毛细血管和成骨细胞、破骨细胞向钙化的软骨基质侵入形成新生骨。这一过程受到许多激素和生长因子在时间和空间上相互协调的调控。除生长激素、胰岛素样生长因子(IGF)、甲状腺素(TH)、降钙素(CT)、甲状旁腺素(PTH)等调节作用以外,软骨细胞还自泌(autocrine)局部活性因子。近年来,在这一领域的研究取得了很大进展,本文仅就软骨细胞分化和调节的分子机制作简要介绍。

一、软骨细胞分化的基本过程和特点

软骨细胞的分化可分为3个主要阶段:

(1) **诱导分化期** 指由未分化间充质细胞向软骨干细胞分化的过程。在胚胎期间,间充质、中外胚层及神经嵴细胞(neural crest cell)等都具有向软骨细胞分化的能力,但是,这些细胞只是在特定的微环境下才能向软骨细胞定向分化。目前有关分化诱导的详细机制尚不十分清楚。

(2) **分化期** 指静止软骨细胞增殖和成熟化的过程。在这一期间,静止软骨细胞进行分裂,进入快速的增殖阶段,然后向成熟期软骨细胞分化。这些软骨细胞形态扁平形,具有旺盛的增殖能力,但细胞外基质的合成能力较低。当细胞分化进入成熟期,其增殖速度明显降低,在形态上表现为圆形或扁圆形,能够大量

地合成Ⅱ型胶原、Ⅳ型胶原和软骨特异的蛋白聚糖等细胞外基质,这是成熟软骨细胞的一个非常重要的特征。

(3) **终末分化期** 成熟的软骨细胞向肥大软骨细胞转换,细胞形态明显肥大化,蛋白聚糖和Ⅱ型胶原等细胞外基质合成能力明显降低,同时大量合成碱性磷酸酶(ALPase)、活性维生素D₃受体和X型胶原等。此时在细胞外基质出现大量的功能性基质小胞。与静止期、增殖期和成熟期的软骨细胞相比,肥大期的软骨细胞合成ALPase、维生素D₃受体和X型胶原的能力非常高,因此通常将ALPase、维生素D₃受体和X型胶原等作为肥大期软骨细胞的特异标志。随着软骨细胞的进一步分化,钙摄取的能力明显增加,最后出现以基质小胞为核心的细胞外基质的钙化完成软骨细胞的终末分化过程。

由此可见,在软骨细胞分化过程中,细胞形态学和新陈代谢都发生许多特征性变化。从细胞和分子水平推进了人们对于软骨细胞分化本质的认识。两者之间的联系极为密切,可概括于表1。

二、软骨细胞分化的调节因子及其特点

(1) **软骨细胞初期分化诱导因子** 在出生后动物的研究报道中,Urist等^[1]将脱钙后的骨基质植入动物皮下或肌肉内时,诱发了软骨和骨的形成。证实在骨基质中存在诱导间充质细胞向软骨细胞分化的活性物质,称为骨形成蛋白(BMP)。在进一步的研究中,Wang^[2]报告了牛BMP(30 kD)分子中的一部分氨基酸序列,并且克隆了人的4种BMP(BMP-1, -2

* 吉林大学酶工程国家重点实验室。

A, -2 B, -3)。现知其中 BMP-2 A、-2 B, -3 与转化生长因子(TGF- β)的氨基酸顺序具有 30—40%的同源性,同时还证实了重组 BMP-2 A 具有诱导软骨形成的生物活性^[3]。另外, Raddi 从牛脱钙骨基质中提纯的骨诱导因子(osteogenin)与 BMP-3 具有相同的一级结构; Sampath 提纯的骨诱导蛋白-2(osteogenic protein, OP)与 BMP-2 为同一物质。因此,目前除 BMP-1 以外,其他的 BMP 均认为是 TGF- β 家族成员。

表 1 在各分化时期软骨细胞的代谢特点

	增殖期	成熟期	肥大期	钙化期
DNA 合成	+++	+	-	-
蛋白聚糖	+	+++	+	+
胶原(II)	+	+++	+	+
碱性磷酸酶	-	-	+++	++
维生素 D ₃ 受体	-	-	+++	++
胶原(X)	-	-	+++	+++
钙	-	-	++	+++

(2) 软骨细胞增殖、成熟化的调节因子

在生长激素的作用下,肝脏能合成并分泌 IGF-I, 培养的软骨细胞也能分泌 IGF-I。IGF-I 能够促进软骨细胞的 DNA 合成和蛋白聚糖合成。在成熟期,软骨细胞的 IGF-I 受体含量较高,而进入肥大期以后其含量明显降低^[4]。

在无血清条件下培养软骨细胞,并且观察各种调节因素对软骨细胞增殖、分化的影响时,证明碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、皮质醇激素,转铁蛋白、高密度脂蛋白(HDL)和胰岛素等都是维持培养软骨细胞生长的必需物质^[5,6]。软骨细胞本身也产生 bFGF^[7,8], 这种因子不仅具有促进细胞增殖作用,同时还能使增殖细胞稳定地向成熟软骨细胞分化^[9],但是对蛋白聚糖的合成几乎无明显影响。软骨细胞 bFGF 受体的含量在增殖期最高,成熟期明显降低,而在肥大期最低^[10]。PTH 能够促进培养的胚胎软骨细胞的增殖和蛋白聚糖的合成,对出生后家兔的软骨细胞蛋白聚糖合成具有明显的促进作用,但是对 DNA 合成无明显影响^[4,11]。软骨细胞 PTH 受体的含量在成熟期

最高,而在增殖期和肥大期较低。TH、CT、糖皮质激素对于软骨细胞外基质合成也具有重要的调节作用。

除此以外,血清中还存在多种促进软骨细胞增殖和成熟化的活性物质。

(3) 软骨细胞终末分化的调节因子 过去关于软骨细胞终末分化调节方面所知甚少。1988年, Kato 等^[12]分离、培养成功了肥大期软骨细胞,成功地建立了软骨细胞分化模型。利用这一模型研究各种激素和生长因子的促分化作用。结果证明, TH、CT 具有轻微的促进软骨细胞终末分化的作用^[13], 还证明了在胚胎牛血清中存在能够诱导软骨细胞终末分化的活性物质。与上述物质的作用相反, bFGF、TGF- β 、PTH、表皮生长因子(EGF)以及白细胞介素-1(IL-1)等则能够抑制软骨细胞的终末分化和钙化。bFGF 对完全分化的肥大软骨细胞,在 ALPase 的合成和钙摄取方面无明显影响,但是却能够完全抑制成熟软骨细胞向肥大细胞转化,即有抑制软骨细胞终末分化的作用。bFGF 的作用是可逆的,在含有 bFGF 的培养液中培养 20 天以上的软骨细胞,当去除 bFGF 后这种终末分化的抑制作用就完全解除^[14]。活性维生素 D₃ 能够抑制肥大软骨细胞的 ALPase 合成(80%)。在维生素 D₃ 缺乏的实验动物,软骨组织的肥大细胞约增加 2—3 层,并且 ALPase 含量增加,但是向这些动物注射活性维生素 D₃ 以后,其软骨组织的 ALPase 含量能恢复到对照组相同的水平。

(4) 软骨细胞自泌的增殖、分化因子 目前已证实,软骨细胞能够合成分泌 bFGF 和 IGF-I。此外,软骨中还存在一组软骨细胞肽类活性因子(cartilage-derived factors, CDFs)。已知 CDF-I 的分子量为 16 kD, 具有促进软骨细胞蛋白聚糖合成的活性; CDF-II 的分子量为 22—25 kD, 能够促进软骨细胞在软琼脂上的克隆生长^[15]。

我们还从软骨中提纯了分子量为 11—14 kD 的新软骨细胞活性因子。它具有非常强烈

的促进软骨细胞增殖的生物活性,免疫学证明与抗bFGF和EGF抗体都无交叉反应性,现在正在进行氨基酸序列测定中。

三、ConA在软骨细胞分化过程中的生物学作用

众所周知,ConA等植物凝集素能够与淋巴细胞表面受体相结合并且促进淋巴细胞的分裂和增殖。ConA还能够诱导原肠胚外胚叶脑的形态发生^[16]。但是在软骨细胞分化过程中,ConA以及其他植物凝集素的生物学作用则了解较少。最近,我们在进行有关ConA等植物凝集素诱导软骨细胞分化的实验研究^[17]中发现,培养的静止软骨细胞用ConA处理后,能够大量合成细胞外基质,使软骨细胞迅速成熟化,随后伴随ALPase和维生素D₃受体的合成而逐渐肥大化(终末分化),这些软骨细胞在25天内发生明显的细胞外基质钙化。而对照组软骨细胞甚至培养到60天,仍未能观察到ALPase含量升高和钙化现象。表明ConA对于软骨细胞分化具有非常强的诱导作用。ConA对于软骨细胞的生物学作用主要包括:(1)诱导软骨细胞的形态分化;(2)抑制软骨细胞DNA合成;(3)促进软骨细胞合成软骨特异的高分子蛋白聚糖;(4)促进软骨细胞ALPase和维生素D₃受体的合成以及诱导细胞外基质钙化等等。关于ConA促进软骨细胞分化的机理虽然尚不完全清楚,似乎是与细胞膜表面的糖蛋白有关,推测在软骨或血液中也可能有天然存在的ConA样分化诱导因子。

综上所述,软骨的分化过程主要经过增殖、成熟和肥大等几个分化阶段,最后产生细胞外基质钙化。随着这些形态变化的同时,软骨细胞的代谢性质等方面也出现了相应的改变。另外,在软骨细胞分化过程中,软骨细胞还接受来自全身性的远位激素和软骨细胞自泌的局部生长因子的双重调节,在生理条件下,它们相互协调地控制软骨细胞的增殖和分化,以维持与全身生长相平衡的骨软骨的生长速度。目

表2 各种激素、生长因子对软骨细胞增殖、分化的影响

激素或生长因子	增殖	成熟化	肥大化
bFGF	↑	↓	↓
GTF-β	↑	↑	↓
IGF-I	↑	↑	
PTH	↑	↑	↓
CDFs	↑	↑	
EGF	↑	↓	
HDL	↑		
CT		↑	↑
TH		↑	↑
VD	↑	↑	↓
IL-1	↓	↓	↓
IL-6			↑

前,关于各种激素、生长因子调节软骨细胞分化的研究工作取得较大进展,相信进一步深入研究软骨细胞自泌的活性因子及ConA等分子活性片段等问题,将对于软骨细胞分化及调节的分子机理的阐明和骨、软骨疾病的临床防治等都具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Urist, M. R., 1965, *Science*, 150: 893—897.
- [2] Wang, E. A. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 9484—9488.
- [3] Wozney, J. M. et al., 1988, *Science*, 242: 1528—1534.
- [4] 铃木不二男, 1991, 蛋白质 核酸 酵素, 36: 1267.
- [5] Iwamoto, M. et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159: 1006—1011.
- [6] Kato, Y. and Gospodarowicz, D., 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 2364—2373.
- [7] Klagsbrun, M. et al., 1977, *Exp. Cell Res.*, 105: 99—108.
- [8] Lobb, R. et al., 1986, *J. Biol. Chem.*, 261: 1924—1928.
- [9] Kato, Y. and Gospodarowicz, D., 1985, *J. Cell Biol.*, 100: 477—485.
- [10] Iwamoto, M. et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 461—465.
- [11] Suzuki, F. et al., 1976, *FEBS Lett*, 70: 155—158.
- [12] Kato, Y. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 9552—9556.
- [13] Kato, Y. et al., 1988, *Endocrinology*, 122: 1991—1997.

- [14] Kato, Y. and Iwamoto, M., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**, 5903—5909.
- [15] Kato, Y. et al., 1991, *Methods in Enzymology*, **198**, 416—424.
- [16] Takata, K. et al., 1984, *Cell Differ.*, **14**, 25—31.
- [17] Yan, W. et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**: 13125—13131.

分子伴侣研究概况

王润华

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

目前虽然已经搞清楚了数百种蛋白质的三级结构,但是对这些蛋白质是怎样达到它们最终构象的过程却知之不多。过去的教科书往往告诉人们多肽链在核糖体上合成并释放后会自发地折叠成具有生物学活性的天然构象。但目前这种“自装配”的观点已遭到严重的挑战。在新生多肽的运输、折叠及组装过程中,有一类被称为“分子伴侣(molecule chaperone)”^[1]的蛋白质起到非常重要的作用。

目前分子伴侣主要是指在进化上非常保守的热休克蛋白(heat shock protein 或 HSP)的几个家族。在正常情况下,从细菌到哺乳动物,热休克蛋白或其类似物对维持细胞正常的生命活动是不可缺少的。但是在一些应激条件下,特别是在热休克状态,这类蛋白的表达量会突然增加。目前作为分子伴侣的热休克蛋白主要包括三个家族,即 hsp 70 家族, hsp 90 家族和 hsp 60(chaperonin, 伴侣蛋白)家族。现已发现分子伴侣在蛋白质的折叠、组装及解离、错叠(misfolding)多肽的降解过程中起到非常重要的作用。本文对这几种分子伴侣家族的构成,它们在蛋白质的运输、折叠和装配等过程中的作用以及它们在生物工程下游处理过程中的应用作简要介绍。

一、hsp 70 家族

虽然早已认识到 hsp 70 在热休克反应中的作用,但只是到近年才知道 hsp 70 作为分子伴侣在细胞中蛋白质折叠、组装、解离及降

解等过程中起到很重要的作用。hsp 70 家族的成员在结构上非常保守,它们包括大肠杆菌中的 Dnak, 酵母中的 Ssa 1 p 和 Ssa 2 p; 内质网中的 Kar 2 p 及其线粒体中的 Ssc 1 p; 哺乳动物细胞中的胞浆蛋白 hsp70, hsc 70 及 prp 73 及其内质网中的 Bip, 植物细胞叶绿体中的 ct-hsp 70 等。

首先被研究的 hsp 70 家族的成员是大肠杆菌中的 Dnak, 它与另外两种热休克蛋白, DnaJ 和 GrpE 共同协助噬菌体的复制^[2]。此外 Dnak 还可以促进未折叠(unfolded)的外源蛋白的稳定^[3], 协助 Lac Z 杂交蛋白从细胞内膜输出^[4]。

在真核细胞的胞浆中,在热休克条件下,核蛋白体部分失活形成不溶的凝聚物。hsp 70 或 hsc 70 可以促进这类不溶物的解聚。在酵母细胞中, Ssa 1 p 和 Ssa 2 p 可以结合未折叠的线粒体蛋白或分泌蛋白前体,使它们保持一种具有转位能力的状态(translocation-competent state),并促进它们转位进入内质网和线粒体^[5,6]。hsc 70 还可以短暂地结合胞浆蛋白以促进它们在胞浆中的正确折叠和组装。此外, hsc 70 还可以与网格蛋白(clathrin)轻链结合,促进网格蛋白包被颗粒的脱壳,从而促进笼罩(cages)的解离^[7]。最后,该家族的另一个成员 prp 73 能识别和结合含有 KFERQ 序列的多肽,导致细胞内蛋白被溶酶体降解^[8]。

在哺乳动物细胞内质网中的 hsp 70 家族成员,最初被认作免疫球蛋白的重链结合蛋