

糖皮质激素受体的生物学功能及其 在骨代谢中作用的研究进展

郑舜杰 洪 盾 陈海啸*

(浙江省台州医院骨科, 临海 317000)

摘要 骨质疏松(osteoporosis)是最常见的骨骼代谢性疾病,其特征包括正常骨密度的减少、骨质脆弱以及骨折的风险性增加。糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)治疗的病人容易并发糖皮质激素性骨质疏松症(glucocorticoids-induced osteoporosis, GCOP)。糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)基因多态性能可改变其受体对糖皮质激素的敏感性,而激素高敏感病人极易被临床医生所忽视而使用常规剂量糖皮质激素,所以存在更高的糖皮质激素性骨质疏松症风险,甚至出现病理性骨折。糖皮质激素性骨质疏松症最明显的表现为体内的骨代谢水平升高,体内骨代谢敏感性变化能反映骨质疏松的进展情况。然而,近来对糖皮质激素受体基因多态性与骨代谢敏感性的研究缺乏统一的认识。作者对文献进行检索分析发现,糖皮质激素受体基因的多态性可能增强或者减弱其对糖皮质激素敏感性,进而促进或抑制骨代谢,其作用结果和基因多态性位点、受体作用通路等有关。

关键词 糖皮质激素受体;多态性;骨代谢;敏感性

1 引言

糖皮质激素性骨质疏松症(glucocorticoids-induced osteoporosis, GCOP)是成人骨质疏松症以及医源性骨质疏松症最常见的原因,如在长期接受糖皮质激素(glucocorticoids, GCs)治疗的患者中,30%~50%并发骨质疏松性骨折,9%~40%发生骨坏死^[1]。Shaker等^[2]报告,长期应用外源性GCs的患者50%以上并发GCOP。虽然人工合成的GCs如强的松、地塞米松等可能会导致骨质疏松等严重的并发症,但是由于它们具有突出的免疫抑制和抗炎作用,所以仍广泛应用于治疗过敏、类风湿性关节炎,以及抑制器官移植排斥。如何平衡GCs的疗效和骨质疏松并发症,仍然是一个亟待解决的医学难题。

GCs的生物学效应需通过糖皮质激素受体介导,因此,糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)的基因表达差异能改变GCs敏感性,进而导致骨代谢水平变化。随着分子生物学技术的进步,对GR的研究已经有许多崭新的进展,在此就GR的基因结构、效应机制及GR基因多态性与骨代谢敏感性关系的研究进展作一综述。

2 GR亚型的功能特点

GR是核受体超家族的成员,为配体激活的转录因子。GR主要的亚单位为GR α 、GR β 和GR γ 。GCs主要和GR α 结合,发挥其生理及药理功能。GR α 位于胞质,主要由3个不同的功能域组成。包括与基因的转录活化密切相关的活化功能域-1(AF-1)、在受体二聚体的形成中起关键作用的DNA结合区(DNA binding domain, DBD)和结合GCs的配体结合区(ligand binding domain, LBD)。LBD在结合GCs之前与热休克蛋白(heat shock protein, HSP)等分子伴侣结合以维持GR的稳定性和高度的配体亲和力,还与DBD一起参与GR二聚体的形成,也含有反式功能激活区-2(AF-2)。GR β 位于胞核,对GR α 的功能有拮抗作用。Rivers等^[3]的研究表明,人类普遍存在第3种GR(hGR γ)。hGR γ 与hGR α 相比,由于hGR γ 的DNA结合区增加了一个精氨酸,导致其转录活化功能较GR α 下降48%。另外,GR γ 还与GR β 一起,抑制GR α

收稿日期: 2012-04-23 接受日期: 2012-09-18

国家自然科学基金(No.81171748)、浙江省自然科学基金(No. Y2111236)和台州市科技计划A类(No.102KY09)资助项目

*通讯作者。Tel: 0576-85120120, E-mail: drchx@126.com

的反式阻抑效应,使糖皮质激素在治疗慢性炎症性疾病中产生耐受^[4]。

3 GR的效应机制

3.1 GR的转录活化作用

GR是一种配体激活的内源性转录因子,主要位于胞浆内,当无配体时与热休克蛋白90(HSP90)、热休克蛋白70(HSP70)、亲免疫素(immunophilin)等形成复合物,不具有刺激转录的活性。当GCs进入胞浆后,GR与HSP90等分子伴侣解离,与GCs结合成复合物而活化并转位到核内。在核内,GR α 以同源二聚体形式与靶基因启动子/增强子区域的糖皮质激素反应元件(glucocorticoid response element, GRE)发生特异性结合,并吸引多种辅激活因子聚集发挥协同作用,促进靶基因的转录活性,调节蛋白质合成,或者与其他转录因子发生蛋白-蛋白相互作用,通过调节下游基因的表达发挥生物学效应。另外,糖皮质激素还可通过转录活化促进抗炎蛋白的合成,如脂皮素-1(lipocortin-1)和分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(secretory leukocyte protease inhibitor, SLPI)和白介素10(interleukin-10, IL-10)等,发挥抗炎活性^[5]。

3.2 GR的转录抑制作用

GR α 介导的下游基因转录抑制作用是GCs产生抗炎功效的主要机理,包括几种不同的作用方式。GR α 通过与负性GRE(negative GRE, nGRE)直接结合,抑制相关基因的转录,如阿片黑皮质素原、骨钙素(osteocalcin)和丝氨酸/苏氨酸激酶、无赖氨酸4(with-no-lysine (K) kinase-4, WNK4)的基因^[6]。GR α 还可通过与NF- κ B和AP-1的亚单位之间直接的蛋白-蛋白相互作用,即竞争性地结合转录活化所需的辅助激活因子,抑制NF- κ B和AP-1等多种炎症转录因子的转录,导致与炎症相关的多种细胞因子、趋化因子、黏附因子等的生成减少,进而达到抗炎效果。Matysiak等^[7]的研究表明,在细胞质中,GR复合体上的HSP90的过度表达能抑制GR转位到细胞核内并减少它的转录。

4 GR是介导GCs影响骨代谢途径上的重要分子

研究表明,GCs主要是通过GR作用于成骨细胞、破骨细胞、细胞因子、钙代谢和激素等多方面引起骨吸收增加、骨形成减少和/或脂肪细胞增

加,最终导致GCOP。抑制或选择性地敲除GR,可使GCs的作用受到相应的影响^[8-9]。因此,GR是介导GCs作用途径上的重要分子。

由于破骨细胞在不同周期及不同的分化阶段GR表达的水平不一,所以破骨细胞对GCs的反应及敏感性也不尽一致^[10]。生理剂量的GCs不改变成熟破骨细胞的骨吸收活性。超生理剂量GCs应用后的早期骨量丢失主要归因于破骨细胞功能增强。细胞骨架是影响破骨细胞吸收能力的一个重要部件,地塞米松可以通过特异性地抑制M-CSF对RhoA、Rac和Vav3(调节细胞骨架的细胞因子)的激活来显著地改变破骨细胞的细胞骨架,而GR敲除的破骨细胞却不受地塞米松的影响^[9]。一定浓度GCs对破骨细胞有抑制或者促进分化作用,但GR条件性敲除后GCs对破骨细胞的作用消失^[9]。米非司酮(RU486)是一种GCs作用的调节剂。研究表明,阿伦磷酸盐(骨密度保护剂)通过激发caspase-8和caspase-9诱导破骨细胞凋亡,地塞米松能拮抗这种作用,而RU486可以揭示这种拮抗效果是由GR介导的,因为被RU486阻滞后出现地塞米松对细胞的作用受到抑制^[8]。

研究也表明,成骨细胞的一些基因对GR有直接调节作用,使成骨细胞合成蛋白的减少^[11]。此外,GCs通过GR抑制成骨细胞的增殖,促进其凋亡,使骨转换降低。地塞米松对M3T3-E1细胞(小鼠成骨细胞系)抑制主要是依赖细胞凋亡和G₁期停滞,而凋亡和细胞周期的停滞都要依靠GR,因为RU486能阻断这种作用^[12]。MSCs在一定的微环境作用下,可以向成骨、成脂、成软骨等多方向分化,骨质疏松症患者体内MSCs向成骨分化减少,成脂分化增加,临床上往往见到老年人或者骨质疏松患者骨髓腔脂肪堆积。研究表明,PPAR γ 2活化后作用于核GR,刺激骨髓间充质干细胞分化成为脂肪细胞而抑制成骨分化^[13]。GR也能通过下调Runx-2的表达促进M3T3-E1细胞减少成骨分化,转而向脂肪细胞分化^[14]。

5 GR基因多态性与骨代谢敏感性

GCs是临床治疗的常用激素,具有极其重要的药理作用,但临床患者表现出明显的GCs个体差异,GCs高敏感性患者体内骨代谢增加,从而增加了GCOP的风险。GR是介导GCs作用的最重要的分子,所以GR的基因变异可能是导致GCs敏感性变化,进而影响体内骨代谢敏感性的关键因素之

一。GR的单核苷酸多态性包括*Bcl I*、*N363S*变异、*ER22/23EK*等和GCs的敏感性、细胞代谢和免疫功能有关。

5.1 GR基因多态性与骨代谢的关系

研究表明, *Bcl I*是相对常见的GR基因多态性, 存在C→G突变, *Bcl I* 3种基因型GG、GC、CC频率在正常人依次为3.5%、38.6%和57.9%^[15]。在地塞米松抑制试验后, 杂合子GC和纯合子GG体内的皮质醇水平低于纯合子CC携带者, 说明G等位基因携带者能引起GCs的敏感性增高。另据研究表明, *Bcl I*多态性位点与皮质醇增多症(库欣病)患者的骨密度下降有关联。*Bcl I* GG基因型的患者股骨颈的骨密度值显著低于野生CC基因型的患者, *Bcl I* GG基因型的患者股骨转子的骨密度也显著低于CC基因型的患者^[16]。这表明C/G交换使得GR对GCs的敏感性增高, 更易导致骨密度降低引发GCOP。

GR核苷酸基因多态性导致*N363S*变异, 导致363位密码子上天冬酰胺酸(Asparagine, N)替代为丝氨酸(Serine, S)。对*N363S*携带者使用0.25 mg超小剂量地塞米松抑制试验, 可显示体内氢化可的松的水平明显抑制, 血浆胰岛素水平轻度升高, 因而*N363S*携带者可引起GCs敏感性增高^[17], 从而导致高血压和胰岛素浓度的升高, 这与欧洲肥胖人群密切相关^[18], 由此推测这些*N363S*变异的病人也更易出现GCOP。另外在肾上腺偶发瘤病人中, 椎体骨折的出现和GR基因*Bcl I*和*N363S*变异的出现有关, Logistic回归分析表明, 椎体骨折和动脉瘤的联合出现和H2组合(即纯合子*Bcl I*和杂合子*N363S*的GR多态性)有关, 而与他们的皮质醇分泌程度及BMI无关^[19]。

*ER22/23EK*存在G→A突变, 也是常见一种GR基因多态性, 它与GCs抵抗和胰岛素敏感性提高有关^[20]。

此外, 通过对GR基因外显子8的研究发现, 在女性人群中, 678位点突变(C→T)即TT基因型者L2-4骨密度明显升高, 而其他部位的骨密度也有升高趋势, 且CC、CT、TT基因型逐步升高^[21]。因此, GR基因外显子8的678位点突变(C→T)可使女性腰椎骨密度增加, 具有骨密度保护作用。

5.2 GR基因多态性导致GC敏感性改变的分子机制

目前, GR基因多态性导致GCs敏感性改变的分子机制仍有争议。研究表明, GR变异可作用于GR通路的任何环节, 它可以使GR本身失去转录活性, 或不能与配体结合, 或与配体结合后核转位速度减缓, 还有转入核内后不能与GRE结合等^[22]。

Tuckemann等^[23]等采用选择性GR突变小鼠来研究激素的抗炎机制, 发现激素受体间存在DNA连接缺失的小鼠显示了对激素治疗的抵抗。多态性的激素受体基因还可以引起相关细胞因子(如IL-4)或各种诱导激素抵抗的关键分子的过度表达^[24], 这可能跟GCs敏感性下降有关。

另外, GR与GCs结合过程中GR的构建发生改变, 螺旋3(H₃)向螺旋5(H₅)弯曲靠拢以便于GR与GCs的结合。研究发现, 部分人的GR上H₅的第604氨基酸碱基突变, 即第604位的甲硫氨酸取代为亮氨酸(M604→L604, 即GR_{L604}), 由于亮氨酸较长的甲基侧链与GR的567位点的甘氨酸相互作用, 产生新的范德华力, H₅-H₃螺旋之间的相互作用增强, 从而引起GR与糖皮质激素亲和力增加10倍^[25]。

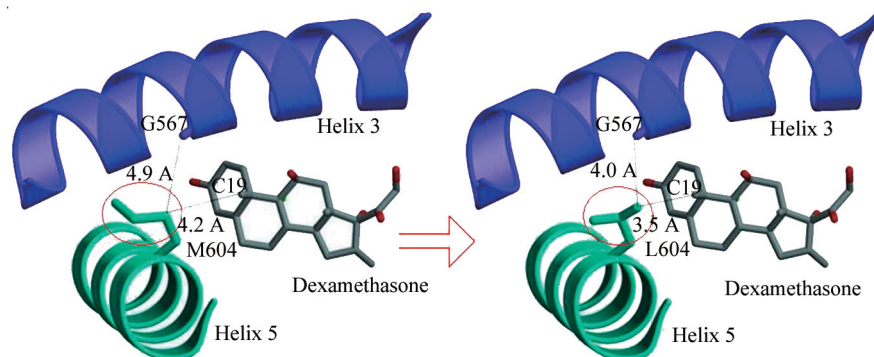


图1 人类GR第604氨基酸碱基突变示意图(根据参考文献[25]修改)

Fig.1 The schematic of human GR 604-amino acid base mutation(modified from reference[25])

6 总结

尽管GCs治疗的高敏感性患者容易出现GCOP,但是在这些病人中,GCs是如何通过GR基因多态性的表达从而导致GCOP的机制目前还不清楚,而且目前的研究只是局限于单个基因影响,至于是否还有未被发现的影响基因,以及这些基因作为一个整体,它们之间是如何相互协调进而表达作用于GCOP的,目前缺乏这方面的整体研究。本综述归纳的主要观点如下: (1) GR是介导GCs作用途径上的最重要的分子,抑制或选择性地敲除GR,可使GCs的作用受到相应的影响; (2) 一些GR基因多态性能引起GCs敏感性增高或降低,影响骨代谢水平,进而增加或降低GCOP的风险: *Bcl I*、*N363S*能引起GCs敏感性增高, *ER22/23EK*与GCs抵抗有关,而678位点突变(C→T)具有骨密度保护作用; (3) GR基因多态性导致GCs敏感性改变的分子机制尚不清楚,可能不仅通过使激素受体本身失去转录活性,而是作用于激素受体通路的各个环节引起GCs的敏感性变化的。

随着GR分子结构、亚型及其功能特点的不断深入了解,GR基因多态性与骨代谢敏感性关系的机制的阐明将为GCOP疾病的预防和个体化治疗提供理论依据。

参考文献 (References)

- Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012; 41(3): 595-611.
- Shaker JL, Lukert BP. Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005; 34(2): 341-56.
- Rivers C, Levy A, Hancock J, Lightman S, Norman M. Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(11): 4283-86.
- Taniguchi Y, Iwasaki Y, Tsugita M, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, *et al.* Glucocorticoid receptor-beta and receptor-gamma exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. *Endocrinology* 2010; 151(7): 3204-13.
- Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol* 2004; 500(1/2/3): 51-62.
- Li C, Li Y, Li Y, Liu H, Sun Z, Lu J, *et al.* Glucocorticoid repression of human with-no-lysine (K) kinase-4 gene expression is mediated by the negative response elements in the promoter. *J Mol Endocrinol* 2008; 40(1): 3-12.
- Matysiak M, Makosa B, Walczak A, Selmaj K. Patients with multiple sclerosis resisted to glucocorticoid therapy: Abnormal expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid receptor complex. *Mult Scler* 2008; 14(7): 919-26.
- Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, *et al.* Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 2002; 109(8): 1041-8.
- Kim HJ, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer JA, Muglia LJ, *et al.* Glucocorticoids and the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116: 335-9.
- Dempster DW, Moonga BS, Stein LS, Horbert WR, Antakly T. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J Endocrinol* 1997; 154(3): 397-406.
- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol Cell Biol* 1997; 17(6): 3181-93.
- Li H, Qian W, Weng X, Wu Z, Li H, Zhuang Q, *et al.* Glucocorticoid receptor and sequential P53 activation by dexamethasone mediates apoptosis and cell cycle arrest of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *PLoS One* 2012; 7(6): e37030.
- Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Curr Osteoporos Rep* 2005; 3(3): 98-102.
- Zhang YY, Li X, Qian SW, Guo L, Huang HY, He Q, *et al.* Down-regulation of type I Runx2 mediated by dexamethasone is required for 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2012; 26(5): 798-808.
- 王莉莉, 谢琰臣, 侯世芳, 冯凯, 殷剑, 许贤豪, 等. 糖皮质激素受体基因多态性与重症肌无力的关系. *中华医学杂志* (Wang Lili, Xie Yanchen, Hou Shifang, Feng Kai, Yin Jian, Xu Xianhao, *et al.* Association of glucocorticoid receptor gene polymorphism with myasthenia gravis. *National Medical Journal of China*) 2009; 89(43): 3035-7.
- Szappanos A, Patocs A, Toke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, *et al.* *BclI* polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(5): 636-43.
- Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, *et al.* A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(1): 144-51.
- Buemann B, Black E, Holst C, Toubro S, Echwald S, Pedersen O, *et al.* The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor and metabolic syndrome factors in men. *Obes Res* 2005; 13(5): 862-7.
- Morelli V, Donadio F, Eller-Vainicher C, Cirello V, Olgiati L, Savoca C, *et al.* Role of glucocorticoid receptor polymorphism in adrenal incidentalomas. *Eur J Clin Invest* 2010; 40(9): 803-11.
- van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, *et al.* Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med* 2004;

- 117(3): 158-62.
- 21 赖 滨, 丁国宪, 蔡金梅, 刘 娟, 程蕴琳. 糖皮质激素受体基因多态性与骨密度关系的研究. 中国骨质疏松杂志(Lai Bin, Ding Guoxian, Cai Jinmei, Liu Juan, Cheng Yunlin. Association of polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and bone mineral density. Chinese Journal of Osteoporosis) 2004; 10(2): 169-71.
- 22 Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Zachman K, Alatsatianos A, Chrousos GP. Functional characterization of the natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutants hGRalphaR477H and hGRalphaG679S associated with generalized glucocorticoid resistance. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(4): 1535-43.
- 23 Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggl R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, *et al.* Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. J Clin Invest 2007; 117(5): 1381-90.
- 24 Koyano S, Saito Y, Nagano M, Maekawa K, Kikuchi Y, Murayama N, *et al.* Functional analysis of three genetic polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene. J Pharmacol Exp Ther 2003; 307(1): 110-6.
- 25 Zhang J, Simisky J, Tsai FT, Geller DS. A critical role of helix 3-helix 5 interaction in steroid hormone receptor function. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(8): 2707-12.

Research Progress of the Biological Mechanism of the Glucocorticoid Receptor and Its Relation to Bone Metabolism Sensitivity

Jia Shunjie, Hong Dun, Chen Haixiao*

(Department of orthopedics, Taizhou hospital, Linhai 317000, China)

Abstract Osteoporosis is one of the most common bone metabolic diseases, which characters include reduction of normal bone mineral density, and raise of bone fracture risk and fragility. Glucocorticoid-treated patients easily get glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid receptor gene polymorphisms alter its receptor sensitivity on glucocorticoid. Glucocorticoid high sensitive patients are very likely to be ignored by clinicians when taking of conventional-dose glucocorticoids, so glucocorticoid-induced osteoporosis risk are higher, which may include the pathological fracture. The most obvious manifestation of glucocorticoid-induced osteoporosis is elevation of the bone metabolism *in vivo*, and changed bone metabolism sensitivity *in vivo* reflects the progress of osteoporosis. Recently, however, there are lack of a unified understanding of the glucocorticoid receptor gene polymorphism and bone metabolism sensitivity. Our literature search analysis reveals that glucocorticoid receptor gene polymorphism may enhance or diminish glucocorticoid sensitivity, thereby promoting or inhibiting bone metabolism, and the results may relate with gene polymorphism loci and receptors pathway.

Key words glucocorticoid receptor; polymorphism; bone metabolism; sensitivity

Received: April 23, 2012 Accepted: September 18, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81171748), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2111236) and the Science and Technology Program of TaiZhou City (No.102KY09)

*Corresponding author. Tel: 86-576-85120120, E-mail: drchx@126.com