

OPGL 对骨骼和淋巴发育的作用

刘明志

(暨南大学生物工程学系 广州 510632)

OPGL(osteoprotegrin ligand 即 OPG Ligand),是与 TNF 相关的细胞生长因子^[1]。也称为破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)^[2],实际上与 TRANCE(TNF-related activation-induced cytokine)和 RANK(receptor activator of NF κ B)配体(RANKL)是同一种细胞因子^[2,4]。而 OPG(osteoprotegerin)为 TNF 受体(TNFR)超家族中新发现的一种^[5]。OPGL 刺激破骨细胞分化,而 OPG 抑制破骨细胞分化。最新的研究表明,OPGL 的作用不仅仅在于刺激破骨细胞分化,因而对骨骼再造型(remodding)具有重要作用^[6],而且对淋巴器官发生具有十分重要的作用^[7]。

一、OPGL 的分子性质及其表达^[1,5,7]

1. OPGL 的证实及其分子性质

OPGL 是以跨膜或可溶性形式存在的 TNF 细胞因子家族中的一员。在离体条件下,当出现 CSF-1 时,OPGL 可连接到破骨细胞前体表面,刺激破骨细胞前体分化形成破骨细胞。

利用重组的 OPG-Fc 融合蛋白作为免疫探针可用于筛选各种细胞系和原始造血细胞表面与 OPG 相连接的蛋白质。通过研究发现小鼠骨髓单核细胞系 32D 可表达与小鼠 OPG[22-194]-Fc 和人 OPG[22-194]-Fc 融合蛋白相连的表面分子。从 32D 细胞 mRNA 构建质粒 cDNA 表达文库,克隆并转染到 COS7 细胞中,然后用人 OPG[22-201]-Fc 融合蛋白染色筛选,经证实得到一个阳性克隆,经过一系列选择得到一个单一的质粒克隆,32D-F3。用 32D-F3 质粒 DNA 再转染 COS7 培养细胞,然后用人

OPG[22-201]-Fc 融合蛋白进行免疫反应,并结合 FITC 的次级抗体进行免疫染色。由于只有 OPG-Fc 融合蛋白能接到 COS7/32D-F3 细胞上,因而 32D-F3 质粒编码一个连接 OPG 的蛋白质。

32D-F3 克隆含有一个长的开放读码框,在哺乳动物细胞中,利用 CMV 启动子区可表达得到 316 个氨基酸的基因产物,即 OPGL。含有人 *opgl* cDNA 的质粒克隆可从淋巴结 cDNA 文库中分离得到。人 *opgl* cDNA 可转译成 317 个氨基酸的多肽,与小鼠 OPGL 有 87% 的同源性,表明 OPGL 在进化上是相当保守的。在 OPGL 中的氨基酸序列中,在 49 位和 69 位氨基酸残基之间可能含有疏水性的跨膜区域,是 II 型跨膜蛋白,较短的 N-末端胞内区较短,C 末端胞外区较长。C 末端胞外区含有两个部分,一个是杆状区域,从第 70 位亮氨酸到第 157 位的甘氨酸,另一个是具有配体活性的区域,从 158 位赖氨酸到 C 末端,该部分可能含有 10 个 β -片层区,它是在所有与 TNF 相关的蛋白质都具有的。

2. OPGL 与 OPG 的特异连接

为了检测 32D-F3 克隆所编码的 OPG 配体是否连接 OPG 上,检测了重组的跨膜 OPGL 和可溶性 OPGL 对 OPG 的连接。研究表明,用 I¹²⁵-标记的人 OPG[22-201]-Fc 仅连接于用鼠 *opgl* 感染的 COS7 细胞上。在人 293 成纤维细胞中,用小鼠的 OPG 信号肽(1-21)与 OPGL 的 71-316 位残基,或 158-316 位残基连接,可产生截短了的小鼠 OPGL,其所产生的两种分泌蛋白可连接到 OPG-Fc 融合蛋白上,它表明 OPG 既可与可溶性的 OPGL,又可与膜

连接的 OPGL 相互作用。

根据计算机分析,OPGL 的 71-316 位残基可能编码该蛋白的胞外区。含有 158-316 位氨基酸残基的重组蛋白在大肠杆菌中产生后,用 ^{125}I 标记 OPGL[158-316],暴露于几种形式的 OPG 以及与 TNFR 相关的两种对照蛋白质,最后经过非还原性的 SDS-PAGE 电泳后被固定于尼龙膜上。结果显示出经放射性标记的 OPGL 可连接于 OPG[22-401]-Fc 和 OPG[22-201]-Fc 融合蛋白上,但是既不能连接于 OPG[22-180],TNFR1,ATAR 上,也不能连接于可溶性的 DR3-Fc 融合蛋白上。各种 N 末端截短了的 OPGL 经在大肠杆菌中产生并经纯化后,这些蛋白可通过亲和结合方式可连接于经固定尼龙膜上的人 OPG[22-201]-Fc 融合蛋白上,分析表明重组的 OPGL 从 126 位、137 位和 158 位残基开始均可连接到 OPG 上,并且平衡解常数在 1-5nM 范围内,因而这些重组的可溶性 OPGL 在生物学研究中具有应用价值。

3. OPGL 在小鼠胚胎组织和成体组织中的表达

通过 Northern blot 分析表明 *opgl* 在小鼠组织中的表达类型与 TRANCE 和 RANK 配体的表达类型相似。对人 *opgl* mRNA 表达分析表明,*opgl* 表达仅限于少数几种组织中,如外周淋巴结中表达水平较高。在小鼠中,骨髓/基质细胞比脾脏,胸腺和淋巴结含的更高水平的 *opgl* mRNA。在人的骨瘤细胞系 ROS 和 SaOS 中也表达 *opgl* mRNA,此外,在成骨细胞系 MC3T3 以及支持破骨细胞发育的基质细胞系 ST2 中都表达 *opgl* mRNA。

在小鼠胚胎和成体组织中,可通过原位杂交对 *opgl* 表达进行进一步定位。在 15 天的胚胎和成体组织中的脾脏,胸腺髓质,发育中的淋巴结和消化道淋巴集结中表达 *opgl*。在脾脏中,表达 *opgl* 的细胞位于淋巴结的白色髓状区域和皮质区域,紧邻于被膜下淋巴窦。在骨骼中,在软骨原基周围的原始间充质细胞和原基

中过度肥大的软骨细胞中,以及原始海绵组织中均可检测到 *opgl* 表达。在发育的股骨中,在进行原始骨化区和骨干皮层和髓质区可检测到 *opgl* mRNA。OPGL 不能在长骨的骨干和骨外膜中表达。

二、OPGL 对骨骼再造形的作用

1. OPGL 是破骨细胞分化因子

破骨细胞为多核的大细胞,来自于类似于单核细胞——巨噬细胞系的造血细胞的前体,在离体条件下,在出现维生素 D₃ 和基质细胞时,破骨细胞可由骨髓和脾细胞发育形成。最终,破骨细胞获得了明显的表型标志,如降钙素受体(calcitonin receptor),抗酒石酸的酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP),整合素 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ^[8]。在骨骼再造形过程中,破骨细胞通过转胞吞作用(transcytosis)吸收骨质^[9]。

影响破骨细胞发生(osteoclastogenesis)因子有许多种,包括集落刺激因子(CSF-1 or M-CSF)、白细胞介素(interleukin-1, interleukin-6, interleukin-11)、转化生长因子(TGF- β , TGF- α)、肿瘤坏死因子(TNF- α , TNF- β)、维生素 D₃、降钙素、前列腺素(PGE₂),甲状旁腺素(PTH)。然而,在活体内通过遗传切除实验表明这些因子对于破骨细胞发育不是必需的。仅 CSF-1 对破骨细胞的发育具有一定程度的作用,因为在 *csf-1* 突变的石骨症小鼠中早期的破骨细胞发育受到一定程度的抑制。虽然如此,缺失 *csf-1* 的石骨症小鼠也能通过抗凋亡蛋白 Bcl-2 的过度表达来克服该症状^[10]。

在骨髓细胞和基质细胞的共培养模型中,由于基质细胞提供了 CSF-1,加入重组的小鼠 OPGL 可促进破骨细胞形成,其 ED₅₀ 约为 1 ng/ml,而 OPG 可阻止这种作用。如果不加入 OPGL,不能够检测到 TRAP 阳性细胞,且所出现的细胞主要为单核细胞。用 FITC-OPGL 作探针,经过 FACS (fluorescence-activated cell sorting) 分析表明与 FITC-OPGL 连接的细胞具有黏连性的成纤维细胞类型的外观,经培养

3天后,转变成具有树突状突起和折皱边缘的大细胞,少部分细胞具有多个核。经培养到第4天后,这种细胞变得更大,直径可达150 μm ,具有卷曲的膜及许多膜突起,大部分细胞具有多个核,可多达10个核。所有这些细胞在离体条件下均可形成破骨细胞。不与OPGL连接的细胞培养4天后仍然保持圆形,很少有黏连的细胞^[1]。

2. OPGL 激活离体的破骨细胞吸收骨质

OPGL 是否能激活成熟破骨细胞,需要通过皮质骨薄片实验来验证。从新生小鼠分离得到成熟的破骨细胞,在加入和不加入OPGL的情况下,定量分析皮质骨薄片中的骨质的吸收。结果表明在离体条件下,OPGL可刺激成熟破骨细胞的活性,在1 ng/ml时就表现出一定程度的作用,在10 ng/ml时表现出最大效果,但加入5倍量的OPG可完全抑制OPGL的活性。

使用重组的OPGL皮下注射小鼠可使得血液中离子钙在处理一天后即有快速增加,即造成高血钙。高血钙的严重程度取决于剂量水平和给药次数。在高剂量水平(每次50 μg ,每天两次),发现小鼠的最近端胫骨的体积与对照组相比减小。虽然对照组和OPGL处理组破骨细胞的数量是相似的,没有明显变化,但是OPGL处理组中破骨细胞的大小和细胞活性明显超过对照组^[1]。

3. *opgl*^{-/-} (*opgl*-knockout) 小鼠具有正常的造血破骨细胞前体

来自于*opgl*^{+/+}和*opgl*^{-/-}小鼠脾的破骨细胞在离体条件下其TRAP活性依赖于重组OPGL浓度,且培养于皮质骨薄片上时均具有骨质吸收功能。用FITC标记OPGL,利用流式细胞仪分析OPGL受体的表达,表明,在*opgl*^{-/-}、*opgl*^{+/-}和*opgl*^{+/+}小鼠中破骨细胞前体出现频率是相似的。因此,*opgl*^{-/-}小鼠脾细胞中含有造血细胞的前体,在外源OPGL作用下能分化形成有功能的成熟破骨细胞。

从新生的*opgl*^{+/-}和*opgl*^{+/+}小鼠的颅骨中分离得到了成骨细胞,用正常小鼠的骨髓细

胞与*opgl*^{+/-}成骨细胞共培养,*opgl*^{+/-}成骨细胞支持TRAP阳性的多核破骨细胞分化。但是正常小鼠骨髓细胞与*opgl*^{-/-}成骨细胞的共培养时却不能检测到TRAP阳性的破骨细胞。这表明*opgl*^{-/-}小鼠成骨细胞和基质细胞不能递呈OPGL以支持破骨细胞发生^[7]。

4. *opgl*^{-/-} 小鼠出现严重石骨症

通过研究3-4周大的*opgl*^{+/+}和*opgl*^{-/-}仔鼠的全身X光照片表明:*opgl*^{-/-}小鼠在出生后两天已表现出严重的石骨症,经X射线照射后,其股骨、胫骨、腓骨、椎骨和肋骨变得相对不透明,说明骨密度增加,而由于骨骼再造形缺失导致其长骨缩短,两端加宽成为杵状。在这些小鼠中不出现门牙,在口腔中也不长白齿。不长牙是石骨症的一个典型特征,这是由于骨质吸收可从颌骨打开一个通道以便长出牙齿,而*opgl*^{-/-}小鼠破骨细胞发生受阻,不能完成骨质吸收。石骨症造成中轴骨的变化,主要是增加椎骨和肋骨的放射密度。而与此形成对照的膜内骨化过程,如头骨,在显影图上却是正常的。

通过外围量化计算的X射线断层术,计算*opgl*^{-/-}小鼠和杂合小鼠及野生型同窝仔鼠的胫骨的骨密度表明,与*opgl*^{+/-}和*opgl*^{+/+}小鼠相比,*opgl*^{-/-}小鼠的骨密度有相当大的增加。

通过对*opgl*^{-/-}小鼠的组织学分析表明,长骨呈现石骨症的外观,在骺、干骺端和骨干中积累软骨和骨质,且几乎填充着骨髓腔。中部骨干的骨密度与骨骺端相似,表明两者几乎没有骨质吸收。与野生型的同窝仔鼠的缺刻状的外观相比,在*opgl*^{-/-}小鼠中,与生长板相邻的骨膜骨(periosteal bone)外观是光滑的,而且在骨膜骨生长板中软骨细胞的柱状结构呈无组织结构状。*opgl*^{-/-}小鼠的颅盖骨比对照组薄且骨髓腔减少,且面部较圆。用骨骼切片进行TRAP染色表明*opgl*^{-/-}小鼠完全缺少TRAP染色阳性的非成熟和成熟的多核破骨细胞。而TRAP染色阳性的破骨细胞在野生型中非常丰

富。因此,破骨细胞的分化完全依赖于 OPGL 表达。

三、*Opgl*-knockout 小鼠的淋巴细胞和淋巴结器官的发育^[7]

1. *opgl*^{-/-}小鼠胸腺细胞发育受损

分析 4 周大的 *opgl*^{-/-}小鼠中的原初淋巴器官表明胸腺的细胞结构和胸腺的大小有相当程度减小。在 *opgl*^{-/-}小鼠中 CD4⁺CD8⁺非成熟的胸腺细胞数量与成熟的 CD4⁺和 CD8⁺胸腺细胞数量是正常的。它们均表达 TCR-CD3 复合物,以及分化标记如 CD5,CD69 和热稳定抗原(HSA)。这表明在 *opgl*^{-/-}小鼠中,从非成熟的 CD4⁺CD8⁺胸腺细胞到成熟的 CD4⁺和 CD8⁺胸腺细胞的发育是正常的。此外,在 *opgl*^{+/+},*opgl*^{+/-}和 *opgl*^{-/-}小鼠中由 CD3 和 CD95 介导的 CD4⁺CD8⁺胸腺细胞的凋亡是相似的,这表明在 *opgl*^{-/-}小鼠中胸腺细胞结构减少不是由于增加抗原-受体介导的细胞死亡所致。令人惊奇的是在 *opgl*^{-/-}小鼠中双阴性 CD44⁻CD25⁺前体分化形成 CD44⁻CD25⁻胸腺细胞的过程被终止。这很可能是胸腺细胞结构减少的原因。在 CD4⁻CD8⁻胸腺细胞前体中通过原位杂交可检测到 OPGL 表达以及 OPGL 受体(RANK)的扩散性表达。

将 *opgl*^{-/-}、*opgl*^{+/-}和 *opgl*^{+/+}小鼠胚胎肝细胞从它发育到 14.5 天时转移到经辐射后激活重组酶基因蛋白(RAG)缺失的小鼠中,虽然在嵌合的 *opgl*^{+/-}*ragl*^{-/-}和 *opgl*^{-/-}*ragl*^{+/+}小鼠中胸腺细胞的发育是正常的,但是在嵌合的 *opgl*^{-/-}*ragl*^{-/-}小鼠中在从 CD25⁺CD44⁻胸腺细胞发育到 CD25⁻CD44⁻胸腺细胞时受阻,并且胸腺细胞的结构减少。这种发育障碍在 OPG 转基因小鼠和注射了重组 OPG 的小鼠中可观察到。用 *opgl*^{-/-}小鼠与正常的骨髓细胞重新组合能够促进正常的 T 细胞发育,因而胸腺细胞发育与骨髓衍生细胞所固有的特性有关。这些结果表明 TNF 家族的细胞因子 OPGL 对于胸腺细胞在前 TCR 表

达时期的发育是一种新的调节因子。

2. *opgl*^{-/-}小鼠 B 细胞发育受损

虽然 *opgl*^{-/-}、*opgl*^{+/-}和 *opgl*^{+/+}小鼠的脾脏细胞结构是类似的,但是 *opgl*^{-/-}小鼠的脾脏大约是正常的同窝仔鼠脾脏的 2 到 3 倍。*opgl*^{-/-}小鼠脾脏的 IgM⁺sIgD⁺或 B220⁺sIgM⁺B 细胞的总量和相对量均有相当程度的减少。*opgl*^{-/-}小鼠脾脏的 sIgM⁺sIgD⁺B 细胞在细胞表面表达了相当水平的 II 型主要组织相容性抗原复合物(MHC)和 CD23 分子。

用 *ragl*^{-/-}小鼠和 *opgl*^{-/-}小鼠胚胎肝细胞重新组合可观察到 IgM⁺sIgD⁺,B220⁺和 CD19⁺脾脏 B 细胞减少。很显然,*opgl*^{-/-}*ragl*^{-/-}嵌合小鼠在骨髓中具有正常数量的 B220⁺C43⁺和 B220⁺CD25⁻前 B 细胞,但是骨髓中的 B220⁺CD43⁻,B220⁺CD25⁺和 B220⁺sIgM⁺B 细胞前体有相当程度地减少,并且 B220⁺CD25⁻前 B 细胞到 B220⁺CD25⁺前 B 细胞的发育受阻。*opgl*^{-/-}小鼠与正常的骨髓细胞重新组合表现出正常的 B 细胞发育并引导 B 细胞进入到 *opgl*^{-/-}小鼠的脾脏中。因此,OPGL 对于 B 细胞前体的发育起重要作用。

3. *opgl*^{-/-}小鼠缺少对树突细胞和 T-细胞的激活作用

实验表明巨噬细胞,树突细胞和破骨细胞可能来自共同的前体。在离体培养系统中,由于 OPGL 通过促进 Bcl-X_L 的表达而作为树突细胞存活因子起作用,因此推测 OPGL-RANK 相互作用影响树突细胞的发育。*opgl*^{+/-}和 *opgl*^{-/-}小鼠的 CD11c⁺树突细胞在一定程度上能够诱导异源 T 细胞增殖和产生细胞因子。虽然 *opgl*^{-/-}树突细胞能够诱导正常的异源 T 细胞产生细胞因子,但野生型树突细胞对 *opgl*^{-/-}小鼠 T 细胞的刺激作用受到削弱。另一方面,*opgl*^{-/-}小鼠 T 细胞在 IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5 和 IL-6 以及 T_H1 和 T_H2 两种细胞因子的产生方面受到严重削弱,因此,OPGL 经过抗原-受体激活后对于细胞因子的产生却是必需的。通过研究证实 *opgl*^{-/-}T 细胞之所以

在细胞因子产生方面受到削弱是由于T细胞发育缺失所致,而不是由于OPGL对成熟T细胞的作用所致。

4. *opgl*^{-/-}小鼠完全缺乏淋巴结

对 *opgl*^{-/-} 小鼠的次级淋巴器官进行解剖学分析,发现肠系膜、颈部、下颌骨、腹股沟、腋部、副动脉和腠动脉处缺少淋巴结。对这些部位进行组织化学切片分析证实,缺少类似于早期的淋巴结原基的组织。将 *opgl*^{-/-} 胚胎肝细胞转移到 *ragl*^{-/-} 小鼠中表明, *opgl*^{-/-} T细胞和B细胞能够使淋巴结增殖。这表明缺少淋巴结是由于细胞自引导缺失所致。转移正常的骨髓细胞到新生的 *opgl*^{-/-} 小鼠中并不能恢复淋巴结形成。

尽管 *opgl*^{-/-} 小鼠缺少所有淋巴结,但是仍然能观察到淋巴集结(Peyer's patches)。*opgl*^{-/-} 小鼠淋巴集结也含有B细胞和T细胞区,并且具有完整的脾脏结构,该脾结构含有正常的红髓和白髓,正常的T细胞和B细胞分离区,以及含有T细胞和B细胞区的滤泡结构、边缘区以及泡状和网状树突细胞网。这些结果表明缺少OPGL对于脾结构以及淋巴集结的形成没有明显的影响,但是OPGL表达对于淋巴集结形成是必需的。

研究工作

平阳霉素对鸡胚绒毛尿囊膜血管内皮细胞生长的影响

武利存 宋守芹 王 丽 张维东 孙公甲

(山东省医学科学院基础医学研究所 济南 250062)

内皮细胞的移动与增殖是血管生成过程的主要内容。血管生成不仅存在于胚胎发育、黄体形成等生理过程,而且在许多病理过程如恶性肿瘤、风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、银屑病、创伤愈合中起重要作用^[1]。因此,血管

生成与抑制研究成为近年来广为关注的热点。特别是抑制血管生成成为控制肿瘤生长和抗转移开辟了一条新的途径而日益受到重视^[2-3]。而

本文1999年6月14日收到,2000年1月12日接受。

摘 要

OPGL是OPG(osteoprotegerin)的配体。人 *opgl* cDNA编码317个氨基酸的多肽,是一种跨膜蛋白。研究表明OPGL是一种新发现的破骨细胞分化因子。破骨细胞前体在OPGL的作用下,可分化为成熟的破骨细胞。OPGL可激活离体的成熟破骨细胞吸收骨质。最新的研究表明, *opgl*-knockout 小鼠出现严重的石骨症,对骨骼再造形具有重要的作用;并且小鼠的胸腺细胞和B淋巴细胞的发育受阻,淋巴结的器官发生也受到抑制,不能形成淋巴结。

参 考 文 献

- [1] Lacey, D L, et al., 1998, *Cell*, **93**:165-176.
- [2] Yasuda, H, et al., 1998, *PNAS. USA.*, **95**:3597-3602.
- [3] Wong, B R, et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:25190-25194.
- [4] Anderson, D M, et al., 1997, *Nature*, **390**:175-179.
- [5] Simonet, W S, et al., 1997, *Cell*, **89**:309-319.
- [6] Reddi, A H, 1997, *Cell*, **89**:159-161.
- [7] Kong, Y-Y, et al., 1999, *Nature*, **397**:315-323.
- [8] Mostov, K, et al., 1997, *Science*, **276**:219-220.
- [9] Saol, J, et al., 1997, *Science*, **276**:270-273.
- [10] Lagasse, E, et al., 1997, *Cell*, **89**:1021-1031.