

自噬在破骨细胞中的调控作用及机制

缪建森, 王向阳, 金海明

(温州医科大学附属第二医院脊柱外科, 浙江 温州 325000)

【摘要】 破骨细胞(osteoclast, OC)是由单核巨噬细胞增殖分化而来的一类具有骨吸收功能的多核细胞,其生成过多及异常活化可诱发如骨质疏松、骨关节炎等多种骨代谢性疾病。自噬作为真核细胞中高度保守的分解代谢过程,在维持细胞稳态、应激损伤修复以及增殖分化中发挥着重要作用。近年来研究发现,自噬同样参与调控 OC 的生成和骨吸收功能。一方面,自噬在 OC 中可被多种因素诱导激活,如营养不足、低氧、核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)、炎症因素、磨损颗粒、微重力环境等等,不同诱导因素如 RANKL、炎症因素和磨损颗粒之间可相互联系,共同发挥作用;另一方面,激活后的自噬参与调节 OC 分化成熟的各个阶段,自噬可促进 OC 的增殖并抑制凋亡、促进 OC 的分化、迁移和骨吸收功能。由哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 介导的经典自噬信号通路是目前研究的热点,其上游可被磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI-3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)等多种蛋白调控,然而,研究表明 mTORC1 介导的自噬可能对 OC 的分化和功能发挥双向调控作用,其内在机制有待进一步研究。整合素 α v β 3 和 Rab 蛋白家族分别是自噬在 OC 迁移和骨吸收功能中发挥重要作用的重要靶点。鉴于 OC 在各种骨疾病发生中的重要作用,阐明自噬对 OC 的作用及其机制对于各种骨疾病的治疗具有重要意义,自噬途径可作为一种新的治疗靶点用于临床骨疾病如骨质疏松症的治疗。

【关键词】 破骨细胞; 自噬; 综述文献

中图分类号: R681

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2023.04.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Regulatory function and mechanism of autophagy on osteoclast

MIAO Jian-sen, WANG Xiang-yang, JIN Hai-ming (Department of Spinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China)

ABSTRACT Osteoclast (OC) is multinucleated, bone-resorbing cells originated from monocyte/macrophage lineage of cells, excessive production and abnormal activation of which could lead to many bone metabolic diseases, such as osteoporosis, osteoarthritis, etc. Autophagy, as a highly conserved catabolic process in eukaryotic cells, which plays an important role in maintaining cell homeostasis, stress damage repair, proliferation and differentiation. Recent studies have found that autophagy was also involved in the regulation of osteoclast generation and bone resorption. On the one hand, autophagy could be induced and activated by various factors in osteoclasts, such as nutrient deficiency, hypoxia, receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL), inflammatory factors, wear particles, microgravity environment, etc, different inducible factors, such as RANKL, inflammatory factors, wear particles, could interact with each other and work together. On the other hand, activated autophagy is involved in regulating various stages of osteoclast differentiation and maturation, autophagy could promote proliferation of osteoclasts, inhibiting apoptosis, and promoting differentiation, migration and bone resorption of osteoclast. The classical autophagy signaling pathway mediated by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is currently a focus of research, and it could be regulated by upstream signalings such as phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3K)/protein kinase B (PKB), AMP-activated protein kinase (AMPK). However, the paper found that mTORC1-mediated autophagy may play a bidirectional role in regulating differentiation and function of osteoclasts, and its underlying mechanism needs to be further clarified. Integrin α v β 3 and Rab protein families are important targets for autophagy to play a role in osteoclast migration and bone resorption, respectively. In view of important role of osteoclast in the occurrence of various bone diseases, it is of great significance to elucidate the role of autophagy on osteoclast and its mechanism for the treatment of various bone diseases. The autophagy pathway could be used as a new therapeutic target for the treatment of clinical bone diseases such as osteoporosis.

KEYWORDS Osteoclasts; Autophagy; Review literature

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82202757); 浙江省自然科学基金(编号: LQ21H060010)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 82202757)

通讯作者: 金海明 E-mail: kkjinhaiming@126.com

Corresponding author: JIN Hai-ming E-mail: kkjinhaiming@126.com

骨是一个连续而又动态的器官,其通过成骨细胞的骨重建和破骨细胞(osteoclasts, OC)的骨吸收达到平衡而维持正常的骨结构,从而发挥机械支持,分泌激素,调节代谢等作用。研究表明^[1], OC 的生成过多及异常活化会破坏此平衡,诱发许多骨代谢性疾病,如骨质疏松症、骨髓炎、骨关节炎和牙周炎等等,其中以骨质疏松症最为常见。自噬作为细胞的自我保护机制,在维持细胞稳态、应激损伤修复以及增殖分化中发挥着重要作用。近年来,越来越多的研究表明自噬在 OC 形成和骨吸收功能中发挥着重要的调控作用。鉴于此,本文拟对自噬在 OC 中发挥的作用及其机制进行简要综述。

1 破骨细胞概述

OC 是由单核巨噬细胞增殖分化而来的一类具有骨吸收功能的多核细胞, OC 的形成是由遗传、体液和机械因素共同调控的多阶段过程。在这些因素中,核因子 κ B 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulation factor, M-CSF)是 OC 激活和分化的关键性细胞因子,二者缺一不可。M-CSF 对于破骨细胞前体细胞(osteoclast precursors, OCPs)的生存和增殖是必需的, RANKL 则促进 OC 的分化与成熟。RANKL 通过与其受体 RANK 结合,激活下游信号通路来介导 OCPs 分化为成熟的 OC。其中,肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TNF receptor-associated factor, TRAF-6)作为 RANKL 信号通路中必需的上游效应器,在 RANKL-RANK 信号传递转接中起着重要的作用^[2]。TRAF-6 募集后可激活下游核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)、钙离子等信号通路,并进一步促进活化 T 细胞核因子 1(nuclear factor of activated T cells 1, NFATc1)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAcP)等 OC 分化关键基因的表达,最终导致 OC 的分化成熟。在 OC 的分化过程中, OC 将会发生迁移并附着于骨骼表面,形成一个由褶皱缘围成的密闭区域。此时 OC 将会逐渐极化并重组其细胞骨架,形成肌动蛋白环结构。空泡型质子泵[Vacuolar H(+)-ATPases, V-ATPases]是一种质子泵,位于 OC 的褶皱缘中,用于维持骨表面酸化环境。在此酸性环境中,活化的 OC 通过分泌多种蛋白分解酶来发挥骨吸收功能^[3]。

2 自噬概述

自噬是真核细胞中高度保守的分解代谢过程,细胞内病原体 and 受损的细胞器等可被自噬体吞噬,随后与溶酶体融合形成自噬溶酶体而被降解,降解

的产物被循环利用,以利于细胞自身代谢和细胞器的更新^[4]。自噬对于机体具有重要意义,在生理情况下,细胞内长期维持着较低水平的自噬,可以将受损或者衰老的细胞器清除、更新来维持细胞稳态。而当细胞处于营养物质不足,缺氧、感染或者应激状态下,细胞内自噬活动将会增强,各种刺激引起的损伤的细胞器将会被降解,产生氨基酸、脂肪酸等营养物质,进一步用于维持细胞的正常生理功能和新陈代谢^[5]。但是过度的自噬也可诱发细胞的凋亡,这也是机体维持自我稳态的一种方式。根据降解底物从胞质进入溶酶体的途径不同,自噬可分为巨自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬,其中巨自噬指传统意义上的自噬,也是目前研究的主要类型,本文下面探讨的自噬均指巨自噬。

自噬是在细胞内多种基因严密调控下的一种主动过程,多种自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)及其编码蛋白在自噬过程中起着重要作用。自噬可分为启动、成核、延伸、融合降解和自噬终止 5 个阶段,每个阶段都受到自噬相关蛋白的严密调控。启动阶段,在营养不良等条件下,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)去磷酸化,与由 UNC-51 样激酶 1(UNC-51-like kinase, ULK1)、ATG13、ATG101 和粘着斑激酶家族相互作用蛋白(focal adhesion kinase family interacting protein, FIP)200 形成的 ULK1 复合体分离,从而启动自噬过程。随后,该复合体可募集液泡分选蛋白 34(vacuolar protein sorting 34, VPS 34)复合体在成核部位聚集并活化,后者由 VPS 34、Beclin-1、VPS15 和 ATG14 组成,以促进 3-磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)的合成。PI3P 合成后可募集多种蛋白,如 WD 重复磷酸肌醇相互作用蛋白(WD-repeat protein interacting with phosphoinositides, WIPIs)以促进成核以及游离双层膜结构的形成。研究表明^[6], Beclin-1 是自噬初始阶段至关重要的蛋白,往往被作为自噬的标志性蛋白之一。在延伸阶段,在 ATG7 和 ATG10 的共同作用下,ATG12 和 ATG5 被激活并与 ATG16L 形成稳定的复合体,同时自噬信号还可激活游离的微管相关蛋白轻链-I(microtubule-associated protein I light chain 3, LC3-I)转变为脂溶性的 LC3-II,并结合在自噬体膜上,ATG12-ATG5-ATG16L 复合体和 LC3-II 共同促进自噬泡双层膜结构不断延伸,并逐渐内吞包裹需要降解的底物形成自噬体;随后自噬体与溶酶体融合,内吞包裹的底物被转移至溶酶体腔中,在溶酶体的酸性环境以及分解酶的作用下被不断降解,降解产物如核苷酸、氨基酸等可被机体

循环利用,同时,这些产物又可发挥负反馈作用重新激活 mTORC1,从而逐渐终止自噬过程,避免在营养不足时自噬的过度激活。既往自噬被认为是一种非选择性过程,近年来研究表明^[7],一些蛋白如 P62、邻居 BRCA1 基因蛋白 1 (neighbor of BRCA1 gene 1 protein, NBR1)、自噬相关 FYVE 蛋白 (autophagy-linked FYVE protein, ALFY) 等可定位于自噬体表面启动高度特异性的选择性自噬过程。P62 蛋白,又称 Sequestosome-1 蛋白,一端结合待降解的泛素化蛋白,另一端通过与自噬体表面的 LC3-II 结合而进行选择性自噬,泛素化蛋白以及 P62 蛋白一同进入自噬体内而被降解(见图 1)。目前,P62 蛋白也被认为是自噬过程中的一种标志性蛋白,其含量的变化可反映自噬活性的增强或减弱^[8]。

3 诱导因素

3.1 营养不足

在营养不良条件下,多种细胞内的自噬活动将会加强,营养不良也可在 OC 分化成熟过程中激活自噬。ZHAO 等^[9]用缺乏氨基酸的培养基模拟低营养环境培养 OC,发现 OC 中 LC3-II 的表达增加,磷酸化的 mTOR 和 ULK1 含量降低,并伴有 Beclin 蛋白中第 15 位丝氨酸和第 119 位苏氨酸的磷酸化增加。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 作为细胞内能量状态的关键传感器,对于维持胞内能量稳态具有重要意义。研究表明^[10],当糖类、脂质和氨基酸等营养物质不足时,AMPK 可被激活,并通过磷酸化 mTOR 进而启动自噬,降解底物产生核苷酸、氨基酸等物质被机体循环利用,从而弥补营养不足时胞内合成代谢的原材料供应不足并维持

能量稳态,其中,氨基酸作为合成细胞蛋白质的重要原料,若缺乏会对细胞内自噬的诱导最为显著^[11]。

3.2 低氧

OC 分布在骨骼的表面和内部,其周围环境中较低的氧分压有利于 OC 的生存和分化成熟^[8]。ZHAO 等^[12]发现在低氧条件下,低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1- α , HIF-1 α) 及其下游信号分子 B 淋巴细胞瘤 2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3, BNIP3) 的表达增加,与此同时,自噬相关蛋白如 ATG5 和 ATG12 以及 Beclin-1 的表达上调。使用 HIF-1 α 抑制剂作用后,自噬及 OC 的分化成熟受到抑制,提示在低氧条件下,HIF-1-BNIP3 信号通路参与调节 OC 中自噬的活化,其内在机制可能与 BNIP3 作为一种促凋亡蛋白,其过度表达可促进 Beclin/Bcl-2 复合物的解离,从而激活自噬有关。在缺氧条件下,除了充当调节自噬的蛋白质信号传导途径外,HIF-1 α 还可介导与 miRNA 有关的 OC 自噬的调控。SUN 等^[13]发现在低氧条件下,表达上调的 HIF-1 α 显著抑制了 miRNA-20a 的转录水平,而 miRNA-20a 通过结合 ATG16L1 转录区域的 3'-非翻译区负性调控 ATG16L1 复合物的表达,ATG16L1 复合物在自噬体的形成过程与 LC3 的酯化相关,实验中 ATG16L1 及自噬相关基因如 LC3、ATG5 的表达增加与预期结果一致,提示低氧可通过 HIF-1-miRNA-20a-ATG16L1 调节轴激活自噬。

以上研究表明低氧可介导 HIF-1 α 通过促进凋亡相关蛋白如 BNIP3 的表达,进而促进 Beclin/Bcl-2 复合物的解离,从而激活自噬,同时,miRNA 作为一

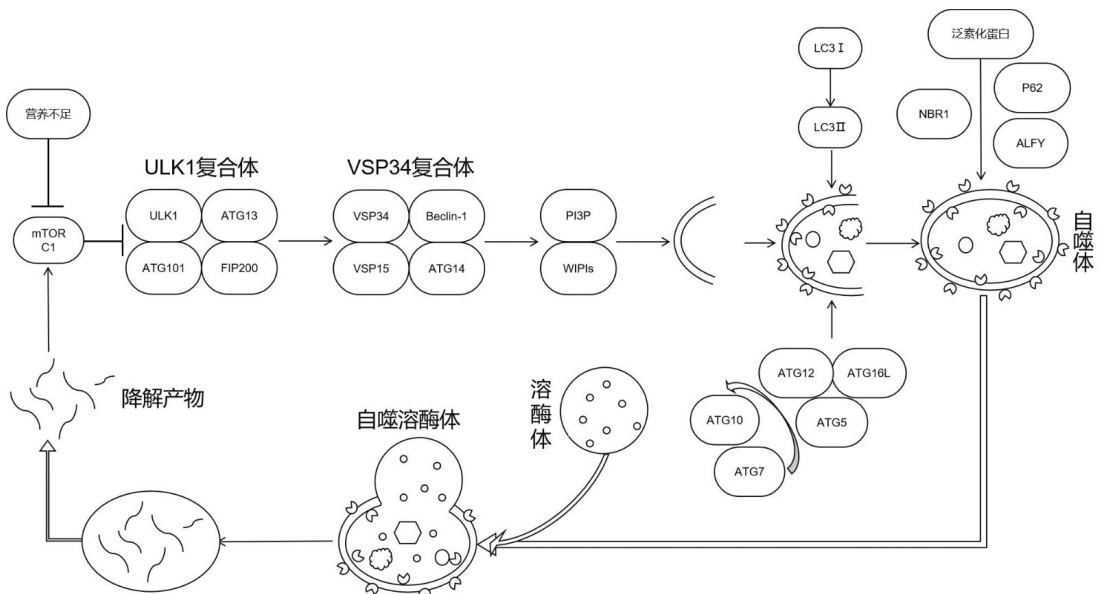


图 1 自噬机制示意图

Fig.1 Autophagy signaling pathway

种非编码 RNA,可在转录后阶段调控自噬相关基因的表达,这说明低氧可通过多种机制途径激活自噬,从而调节 OC 的分化成熟。此外,研究表明,根据低氧的程度及其持续时间的不同,低氧可通过不同的机制诱导自噬,激活后的自噬也可对动物细胞的生长发育表现为促进或抑制的作用,然而在 OC 中的作用目前尚不完善,需要进一步阐明^[14]。

3.3 RANKL

RANKL 作为 OC 分化的关键启动因子,通过与其受体 RANK 结合激活下游一系列信号分子,最终导致 OC 的生成。已有大量研究表明,RANKL 在促进 OC 分化的同时,也可诱导自噬途径的激活。ZHANG 等^[15]发现 RANKL 上调 OCPs 中 Beclin-1 的表达,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 比率增加,但对 ATG5 和 ATG7 的表达没有影响。ARAI 等^[16]发现在 RANKL 诱导 OC 分化的过程中,LC3-Ⅱ, P62, Beclin-1 以及自噬相关蛋白 ATGs 的表达明显增加,过度表达 Beclin-1 明显促进 OC 分化,同时 Beclin-1 基因敲除小鼠的骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMMs) 在 RANKL 作用下自噬相关基因的表达明显下调,OC 分化受到抑制。提示 RANKL 可通过诱导自噬促进 OC 的分化,其中 Beclin-1 在 RANKL 调节自噬的过程中发挥着重要作用,MAPK 和 NF- κ B 作为 RANKL 下游的重要信号通路,已被证实参与调控 RANKL 对自噬的激活^[17]。总体而言,RANKL 可在促进 OC 分化的过程中通过 MAPK 和 NF- κ B 等信号通路诱导自噬的激活,但对某些自噬相关蛋白如 ATG5 和 ATG7 等可表现为没有作用,这可能与 RANKL 浓度或培养时间等因素有关。

3.4 炎症因素

研究表明,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL-1) 等关键炎症因子可以促进 OC 的分化成熟,近年来研究发现自噬在其中起着重要作用。LIU 等^[18]发现在骨关节结核中,TNF- α 作为一种关键炎症因子,可促进 ATG7 和 Beclin-1 等自噬相关蛋白的表达以及 LC3-Ⅰ 向 LC3-Ⅱ 的转化,并进一步抑制细胞的凋亡,最终诱导 OC 的分化成熟。此外,IL-17 作为一种促炎症因子,可通过促进 TNF- α 和 IL-1 β 等炎症因子的表达,最终诱导 OC 的生成。KE 等^[19]发现低浓度的 IL-17 可促进 OCPs 的自噬水平和 OC 的生成,而高浓度的 IL-17 则抑制细胞内自噬。这说明炎症因子可以诱导 OC 内自噬的激活,但当浓度过高时可抑制自噬,表现为两面性的作用。此外,炎症因子如 IL-17 可通过诱导细胞内 RANKL 信号通路的激活^[20],从而进一步激活自噬,说明自噬的众多诱导因

素可能是相互联系的,而并不是孤立的发挥作用。

3.5 磨损颗粒

人工关节置换术中产生的磨损颗粒可诱导 OC 的分化成熟,并产生一系列术后并发症。SU 等^[21]使用钛颗粒诱导 OC 生成,结果发现直径 0.2~1.2 μ m 和 1.2~10 μ m 的钛颗粒上调了细胞中 Beclin-1 的蛋白质表达水平,钛颗粒直径 >10 μ m 时则对其无显著影响。使用氯喹抑制自噬后发现,细胞内 RANKL 的表达水平下调。WANG 等^[22]使用钛颗粒作用于 RAW264.7 细胞,发现 OC 生成增多,并伴有 ATG5, ATG7, ATG12, Beclin-1 以及 LC3-Ⅱ 表达水平的显著提高,还发现钛颗粒通过激活轴突导向因子-1 (netrin-1) 和 MAPK 信号通路从而诱导自噬,使用 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 抑制自噬后,OC 分化过程中的关键信号分子 TRAcP 的表达下调。以上研究表明,一定大小范围内的磨损颗粒可以激活自噬并促进 OC 的分化成熟,其内在机制可能与磨损颗粒作为一种异物物质,在体内存在时可诱导局部的炎症反应,激活 MAPK 等信号通路,从而间接激活自噬有关,当磨损颗粒过大时,不易被吞噬降解,自噬不被激活,就表现出更高的生物相容性。

3.6 微重力环境

现有研究表明^[23],宇航员在执行太空飞行时会遭受严重的骨质流失,其原因可能为宇航员所处的微重力环境促进了 OC 的分化成熟及其骨吸收功能,进而导致骨质流失和骨折风险增加。SAMBANDAM 等^[24]通过模拟微重力环境作用于小鼠 BMMs 后发现,ATG5、LC3 和 ATG16L 的 mRNA 表达水平上调,自噬体形成显著增加,使用自噬抑制剂 3-MA 后,自噬相关基因表达下调,OC 的分化成熟受到抑制,提示微重力环境可作为 OC 分化过程中上调自噬的诱导因素之一,但目前对于微重力环境在 OC 中诱导自噬的研究尚不完善,具体机制有待进一步研究,笔者推测可能与微重力环境下 OC 所承受的机械负荷相对减少有关,进而诱导胞内线粒体和内质网的应激反应,并激活自噬促进 OC 的分化成熟^[25]。

4 自噬对破骨细胞分化和功能的调控

4.1 自噬对 OCPs 增殖和凋亡的影响

OC 的生成可分为增殖和分化 2 个阶段,其前体细胞的正常增殖才有利于进一步的分化成熟,近年来研究发现自噬在 OCPs 的增殖阶段发挥着重要作用。CHENG 等^[26]发现 17 β -雌二醇可直接激活自噬进而促进 OC 的增殖,同时又可抑制 RANKL 信号通路对自噬起间接的抑制作用,在 OCPs 的增殖阶段,17 β -雌二醇对自噬的直接激活大于其通过 RANKL 信号通路的间接抑制作用,从而促进 OCPs 的增殖。

Ji 等^[27]发现 10^{-2} mmol/L 浓度的 1,25-二羟基维生素 D3 可以显著抑制 OCPs 的增殖,过度表达 Beclin 后, 10^{-3} ~ 10^{-1} mmol/L 各组细胞的增殖均显著增加,而过度表达 ATG5 和 ATG7 后,仅 10^{-2} mmol/L 组细胞增殖显著增加,这说明激活自噬可促进 OCPs 的增殖,但在 1,25-二羟基维生素 D3 作用下,不同自噬相关蛋白对于前体细胞增殖的作用不尽相同,然而目前对于自噬促进 OCPs 增殖的机制尚不明确,有待进一步研究。

细胞凋亡是维持细胞稳态的一种重要机制, Bcl-2 和 Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bcl-2-associated X, Bax)属于同一凋亡家族蛋白质,其中 Bcl-2/Bax 的比率是决定细胞凋亡的关键因素。Bcl-2 除了充当凋亡抑制基因外,还可通过与 Beclin-1 结合从而抑制自噬的发生。此外,促凋亡相关蛋白如半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)也被认为是在细胞凋亡过程中至关重要的末端剪切酶^[28]。LIU 等^[18]发现在 TNF- α 作用下,结核杆菌感染的 OC 内自噬水平上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达增加,同时促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的表达下降,使用 3-MA 抑制自噬后,上述自噬和凋亡蛋白表达情况被逆转。KE 等^[29]使用自噬激活剂雷帕霉素培养 OCPs 后发现,细胞内裂解型 Caspase-3 的表达水平显著降低,提示细胞凋亡减少,而在使用自噬抑制剂氯喹作用后细胞凋亡增加。以上研究表明自噬可通过调节细胞凋亡正向调控 OCPs 的分化过程,并对细胞有一定的保护作用,而 Beclin-1/Bcl-2 复合物可能为连接自噬与凋亡的重要的中间桥梁,自噬激活后可使磷酸化 Beclin-1 的表达上调,Bcl-2 从 Beclin-1/Bcl-2 复合物中游离出来,进而发挥抗凋亡作用而维持细胞稳态^[30]。

4.2 自噬对破骨细胞分化的调节

OC 的分化成熟是一个受多种信号通路调控的复杂过程,如 RANKL-RANK 信号通路等等。近年来,mTORC1 介导的自噬及其在 OC 分化中的作用被广泛研究。mTORC1 在自噬中起着重要的调节作用,在营养丰富的条件下,mTORC1 与 ULK1 复合体相互结合,抑制自噬活性;而在营养不良时,二者分离后,ULK1 复合体去磷酸化而活性增加,从而启动自噬信号通路^[10]。此外,mTOR 信号通路可被多种上游信号分子通路调控,如 AMPK 通路,磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B,PKB)通路等等,目前研究表明^[31],mTORC1 介导的自噬信号通路对 OC 可能存在双向调控作用。

AMPK 是维持细胞稳态的一种能量传感器,当细胞内能量较低时 AMPK 可被激活。CAI 等^[32]将

RAW264.7 细胞分别置于高浓度和低浓度的葡萄糖溶液中培养,结果发现,相比于低浓度组,高浓度组中磷酸化的 AMPK 和 ULK1 表达下降,磷酸化的 mTOR 表达增加,同时自噬标记蛋白 LC3-II 和 Beclin 的含量下降,P62 的表达上调,并伴有 OC 生成和骨吸收功能下降,使用雷帕霉素处理后,细胞内自噬水平提高并伴有 OC 数目增多。这说明 mTORC1 介导的自噬激活可促进 OC 的生成。

然而,也有研究表明自噬激活反而会抑制 OC 的生成。骨保护素(osteoprotegerin,OPG)是由成骨细胞分泌的骨活性调节因子,可与 RANKL 竞争性地结合 RANK 受体,从而抑制 OC 的分化。TONG 等^[33]研究发现 OPG 上调了 AMPK 及其下游 TSC2 蛋白的表达,促进 TSC1/TSC2 复合体的形成,并进一步抑制了 Ras 蛋白脑组织同源类似物 (Ras homolog enriched in brain,Rheb)的激活。随后,下游 mTOR 磷酸化减少并间接增加了磷酸化 p70 核糖体 S6 蛋白激酶(p-p70S6K)的表达,进而诱导自噬激活,抑制 OC 生成。MA 等^[34]发现在硫化氢作用下,OC 的分化及其骨吸收功能增加,同时 LC3-II 和 Beclin-1 等自噬标志性蛋白以及自噬体生成显著降低,进一步研究发现,硫化氢通过激活 PI3K/PKB/mTOR 信号通路抑制自噬标志性蛋白 LC3-II 和 Beclin-1 表达,并减少 OC 凋亡,最终促进 OC 生成。使用雷帕霉素处理后,细胞内上调的自噬水平促进了 OC 的生成。这进一步强调了 mTORC1 介导的自噬通路在 OC 分化成熟过程中的复杂作用,mTORC1 作为调节 OC 生成的双刃剑,可能是治疗骨相关疾病的重要靶点。

4.3 自噬对破骨细胞迁移的调节

OC 在分化成熟过程中会发生迁移并附着于骨骼表面,进一步发挥骨吸收功能。OC 迁移的能力取决于它们的适应性形态以及足小体不断地形成和降解。GAO 等^[35]发现在 RANKL 诱导的 OC 生成中,类端粒沉默干扰体 1(disruptor of telomeric silencing 1-like, DOT1L)的表达增加。使用 DOT1L 抑制剂作用 OCPs 40 h 后,细胞内与迁移和黏附相关的多种蛋白表达增加,同时细胞内自噬活性增加,表现为 SQSTM1 和 ATG3 等多种自噬相关蛋白表达上调,推测抑制 DOT1L 可能通过自噬途径调控 OC 的迁移与黏附。ZHANG 等^[36]发现使用 Lys05 自噬抑制剂后,OC 在牙本质切片上迁移的距离缩短、肌动蛋白环结构变得无序并形成多环结构,使用 LC3B siRNA 抑制自噬后,发现 kindlin3(一种重要的衔接蛋白)在 OC 大量积累并伴有整合素 $\alpha v \beta 3$ 的活化,足小体环的数量和厚度增加并形成无序的肌动蛋白结构,导致 OC 的迁移和骨吸收功能受损。这说明自噬相关

蛋白 LC3 B 可通过调节 kindlin3 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 在足小体降解和 OC 的迁移中发挥重要作用。以上研究说明自噬可促进 OC 的迁移,整合素 $\alpha v\beta 3$ 可能在其中扮演重要作用。整合素 $\alpha v\beta 3$ 被发现分布在足小体的基底膜外侧,胞内囊泡以及褶皱缘等处,一方面可重组其细胞骨架,从而使 OC 极化,更易于发生迁移,同时又可通过与细胞外基质的不断黏附与分离,促进 OC 不断迁移^[3],因此,整合素 $\alpha v\beta 3$ 及其下游粘着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)、Src 等多种效应蛋白可能是自噬在 OC 迁移中发挥作用的重要靶点。然而,自噬信号激活整合素 $\alpha v\beta 3$ 的内在机制目前尚未明确,有待进一步研究。

4.4 自噬对破骨细胞骨吸收功能的作用

OC 可附着于骨表面形成褶皱缘并分泌酸和多种蛋白分解酶,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)和组织蛋白酶 K(cathepsin K,CTSK)等,从而进一步发挥骨吸收功能。DESELM 等^[37]发现 ATG5、ATG7、ATG4B 和 LC3 在调节 OC 褶皱缘形成和溶酶体分泌中起着重要作用。将 ATG5、ATG7 基因敲除后,OC 褶皱缘形成障碍,骨吸收活性减弱,而 OC 的分化程度并未受到影响。LEE 等^[38]发现在 RANKL 诱导的 OC 生成中,脱氢肋内酯抑制了 ATG4B、ATG5 和 CTSK 的表达以及 LC3-I 向 LC3-II 的转换,进一步研究表明脱氢肋内酯可能通过调节 ATG5-LC3 轴抑制溶酶体运输和蛋白分解酶(如 CTSK)的表达,从而调节 OC 的骨吸收功能。V-ATPases 是一种位于溶酶体以及 OC 褶皱缘中,用于维持骨表面酸化环境的质子泵,其包含多种亚基,如 a3 亚基等等,目前自噬对 OC 中 V-ATPases 的作用尚不明确,而已有研究表明 V-ATPases 对自噬的影响。OCHOTNY 等^[39]通过构建一个 V-ATPases a3 亚基突变的 R740S 小鼠模型,发现 R740S/R740S 的 OC 没有极化,缺乏褶皱缘,并包含较少的自噬体,研究表明 V-ATPases 介导的细胞外酸化对于早期自噬的发生、OC 的分化成熟、极化以及关键蛋白水解酶的分泌起着重要作用。以上研究表明自噬可通过调节褶皱缘的形成以及溶酶体的运输和分泌,进而调节 OC 的骨吸收功能,同时 V-ATPases 介导的细胞外酸化也可影响自噬水平,这说明 OC 中自噬和骨吸收功能是相互影响的,溶酶体作为二者发挥作用的共同环节,可能在其中扮演着重要作用。

褶皱缘的形成依赖于大量溶酶体来源的酸性囊泡的不断融合,溶酶体的运输以及其中酸和分解酶的分泌同样涉及大量囊泡的融合和分离,Rab 家族蛋白,作为一种小分子鸟苷三磷酸水解酶(GTPases),是囊泡运输的重要调控者,在自噬与 OC 骨吸收

功能中均发挥着重要作用。研究表明,Rab7 对于 OC 的褶皱缘形成和溶酶体分泌是必不可少的,并且 Rab7 在褶皱缘处的定位呈 ATG5 依赖性,在 ATG5 缺失的 OC 中,Rab7 和 LC3 的表达异常,且组织蛋白酶 K 分泌显著减少^[40]。此外,ATG7 和 ATG4B/LC3 也有助于招募 Rab7 定位于褶皱缘处,从而进一步发挥骨吸收功能^[41]。鉴于 Rab 蛋白家族在囊泡运输和溶酶体分泌中的重要调控作用,笔者认为其是自噬调节 OC 骨吸收功能过程中的一个重要中介,其机制可能与 LC3、ATG7 等自噬相关蛋白调控 Rab 蛋白家族在褶皱缘和溶酶体上的定位有关。

5 结语与展望

自噬在 OC 中的研究尚不完善,多种自噬关键信号通路如 PI3K/PKB/mTOR、AMPK/mTOR 等信号通路在 OC 中的作用正在被广泛研究。目前已经明确自噬可被多种因素诱导激活,并在 OC 分化和骨吸收功能的各个环节中发挥着重要作用。目前研究表明,自噬可以促进 OC 的分化和骨吸收功能,但也有研究发现自噬对 OC 分化起负性调控作用,说明自噬对 OC 的调控是一个复杂的过程,需要进一步的深入研究。鉴于 OC 在许多骨疾病如骨质疏松症中的重要作用,且由于目前临床上治疗骨质疏松的药物均存在不同程度的副作用,因此对骨质疏松发病机制进行研究并寻找相应的治疗策略,是当前迫切需要解决的问题,阐明自噬对 OC 的作用及其机制有助于将来机制靶向性药物的研发,自噬途径可作为一种新的治疗靶点用以临床上骨疾病如骨质疏松症的治疗。

参考文献

- [1] CROCKETT J C, ROGERS M J, COXON F P, et al. Bone remodeling at a glance[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 7): 991-998.
- [2] PARK J H, LEE N K, LEE S Y. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation[J]. Mol Cells, 2017, 40(10): 706-713.
- [3] SOYSA N S, ALLES N. Osteoclast function and bone-resorbing activity: an overview[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476(3): 115-120.
- [4] WANG S, DENG Z T, MA Y C, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(14): 2675-2691.
- [5] DI GIACOMO V, CATALDI A, SANCILIO S. Biological factors, metals, and biomaterials regulating osteogenesis through autophagy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2789.
- [6] HILL S M, WROBEL L, RUBINSZTEIN D C. Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation[J]. Cell Death Differ, 2019, 26(4): 617-629.
- [7] YIN X, ZHOU C C, LI J T, et al. Autophagy in bone homeostasis and the onset of osteoporosis[J]. Bone Res, 2019, 7: 28.
- [8] MONTASERI A, GIAMPIETRI C, ROSSI M, et al. The role of autophagy in osteoclast differentiation and bone resorption function

- [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10):1398.
- [9] ZHAO S J, KONG F Q, CAI W, et al. GIT1 contributes to autophagy in osteoclast through disruption of the binding of Beclin1 and Bcl2 under starvation condition[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12):1195.
- [10] XIANG H G, ZHANG J F, LIN C C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4):569-581.
- [11] RABINOWITZ J D, WHITE E. Autophagy and metabolism[J]. *Science*, 2010, 330(6009):1344-1348.
- [12] ZHAO Y, CHEN G, ZHANG W, et al. Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2):639-648.
- [13] SUN K T, CHEN M Y, TU M G, et al. microRNA-20a regulates autophagy related protein-ATG16L1 in hypoxia-induced osteoclast differentiation[J]. *Bone*, 2015, 73:145-153.
- [14] FANG Y, TAN J, ZHANG Q. Signaling pathways and mechanisms of hypoxia-induced autophagy in the animal cells[J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(8):891-898.
- [15] ZHANG G Y, WANG Y, TANG G K, et al. Puerarin inhibits the osteoclastogenesis by inhibiting RANKL-dependent and-independent autophagic responses[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1):269.
- [16] ARAI A, KIM S, GOLDSHTEYN V, et al. Beclin1 modulates bone homeostasis by regulating osteoclast and chondrocyte differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(9):1753-1766.
- [17] CHUNG Y H, JANG Y, CHOI B, et al. Beclin-1 is required for RANKL-induced osteoclast differentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(12):1963-1971.
- [18] LIU W, ZHOU J, NIU F, et al. Mycobacterium tuberculosis infection increases the number of osteoclasts and inhibits osteoclast apoptosis by regulating TNF- α -mediated osteoclast autophagy[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(3):1889-1898.
- [19] KE D S, FU X M, XUE Y, et al. IL-17A regulates the autophagic activity of osteoclast precursors through RANKL-JNK1 signaling during osteoclastogenesis in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(3):890-896.
- [20] 沈焯琦, 王中秀, 谭静怡, 等. 白介素-17 诱导自噬促进破骨前体细胞分化的机制[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2021, 50(2):162-170.
- SHEN Y Q, WANG Z X, TAN J Y, et al. TRAF6/ERK/p38 pathway is involved in interleukin-17-mediated autophagy to promote osteoclast precursor cell differentiation[J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2021, 50(2):162-170. Chinese.
- [21] SU B H, LI D, XU J, et al. Wear particles enhance autophagy through up-regulation of CD147 to promote osteoclastogenesis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(8):806-812.
- [22] WANG L, GAO Z B, ZHANG J, et al. Netrin-1 regulates ERK1/2 signaling pathway and autophagy activation in wear particle-induced osteoclastogenesis[J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(3):612-622.
- [23] WU C H, OU C H, YEN I C, et al. 4-acetylanthroquinonol B inhibits osteoclastogenesis by inhibiting the autophagy pathway in a simulated microgravity model[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18):6971.
- [24] SAMBANDAM Y, TOWNSEND M T, PIERCE J J, et al. Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis[J]. *Bone*, 2014, 61:125-131.
- [25] SMITH J K. Osteoclasts and microgravity[J]. *Life (Basel)*, 2020, 10(9):207.
- [26] CHENG L, ZHU Y R, KE D S, et al. Oestrogen-activated autophagy has a negative effect on the anti-osteoclastogenic function of oestrogen[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(4):e12789.
- [27] JI L M, GAO J, KONG R N, et al. Autophagy exerts pivotal roles in regulatory effects of 1 α ,25-(OH)2D3 on the osteoclastogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(4):869-874.
- [28] WANG M Y, ZHANG L, LIN F W, et al. Dynamic study into autophagy and apoptosis during orthodontic tooth movement[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(5):430.
- [29] KE D S, JI L M, WANG Y, et al. JNK1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis via activation of a novel Bcl-2-Beclin1-autophagy pathway[J]. *FASEB J*, 2019, 33(10):11082-11095.
- [30] XU H D, QIN Z H. Beclin 1, bcl-2 and autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206:109-126.
- [31] 朱俊瑾, 周佳琦, 伍颖颖. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 介导的自噬对骨代谢的调控[J]. *国际口腔医学杂志*, 2020, 47(1):84-89.
- ZHU J J, ZHOU J Q, WU Y Y. Function of autophagy induced by mammalian target of rapamycin complex 1 in bone metabolism[J]. *Int J Stomatol*, 2020, 47(1):84-89. Chinese.
- [32] CAI Z Y, YANG B, SHI Y X, et al. High glucose downregulates the effects of autophagy on osteoclastogenesis via the AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2):428-435.
- [33] TONG X S, GU J H, SONG R L, et al. Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro[J]. *J Cell Biochem*, 2018. Online ahead of print.
- [34] MA J, DU D, LIU J, et al. Hydrogen sulphide promotes osteoclastogenesis by inhibiting autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *J Drug Target*, 2020, 28(2):176-185.
- [35] GAO Y P, GE W. The histone methyltransferase DOT1L inhibits osteoclastogenesis and protects against osteoporosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):33.
- [36] ZHANG Y A, CUI Y Z, WANG L, et al. Autophagy promotes osteoclast podosome disassembly and cell motility through the interaction of kindlin3 with LC3[J]. *Cell Signal*, 2020, 67:109505.
- [37] DESELM C J, MILLER B C, ZOU W, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(5):966-974.
- [38] LEE H I, LEE J E, HWANG D, et al. Dehydrocostus lactone suppresses osteoclast differentiation by regulating NFATc1 and inhibits osteoclast activation through modulating migration and lysosome function[J]. *FASEB J*, 2019, 33(8):9685-9694.
- [39] OCHOTNY N, VORONOV I, OWEN C, et al. The R740S mutation in the V-ATPase a3 subunit results in osteoclast apoptosis and defective early-stage autophagy[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(12):2823-2833.
- [40] ROY M, ROUX S. Rab GTPases in osteoclastic bone resorption and autophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7655.
- [41] DAI Y J, HU S X. Recent insights into the role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, 55(3):403-410.