

叉头转录因子-1与骨代谢关系的研究进展

舒林径¹ 伍颖颖² 谭震² 宫苹²

1.口腔疾病研究国家重点实验室 华西口腔医院(四川大学); 2.种植科, 成都 610041

[摘要] 叉头转录因子-1(FoxO1)可调控细胞增殖、葡萄糖异生、能量代谢和氧化应激等生物学过程,近年来研究表明,其在骨重塑过程中也发挥着重要的作用,影响机体骨量。其主要通过调控成骨细胞形成新骨,破骨细胞吸收矿化骨基质和前体细胞的分化增殖,影响骨代谢过程,调控机体骨量。本文通过对FoxO1在骨代谢中的研究进行回顾,对其在骨代谢中的作用途径和机制进行综述。

[关键词] 叉头转录因子-1; 骨代谢; 成骨细胞; 破骨细胞

[中图分类号] Q 51 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2016.04.022

Research progress on forkhead box protein O1 and bone metabolism Shu Linjing¹, Wu Yingying², Tan Zhen², Gong Ping².

(1. State Key Laboratory of Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Dept. of Implantology, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Supported by: National Natural Science Foundation for Youth of China(81400543). Correspondence: Gong Ping, E-mail: gp602002@163.com.

[Abstract] Recent studies found that forkhead box protein O1 (FoxO1) does not only demonstrate important biological functions in cell proliferation, gluconeogenesis, energy metabolism, and oxidative stress, but it also plays a vital role in the remodeling process of bones. FoxO1 can regulate bone mass by affecting osteoblasts, osteoclasts, and precursor cells. In this article, we review the role of FoxO1 in bone metabolism and elucidate its underlying mechanism.

[Key words] forkhead box protein O1; bone metabolism; osteoblasts; osteoclasts

叉头转录因子(forkhead box protein O, FoxO)家族中发现最早的成员是FoxO1,其可通过转录和传导生长因子及细胞因子信号,发挥调节细胞增殖、葡萄糖异生、能量代谢和氧化应激等多种生物学活性^[1-2]。近年研究^[3]显示,FoxO1通过调控成骨细胞形成新骨,破骨细胞吸收矿化骨基质和前体细胞的分化增殖,影响骨代谢过程。

1 FoxO1在成骨细胞中的作用

在生理情况下,骨组织处于不断改建过程中,骨吸收和骨形成维持动态平衡^[4-5]。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的形成、分泌和矿化。在3种FoxO蛋白中,FoxO1是成骨细胞中表达量

最高的亚型,通过调节氧化还原平衡^[3]、骨骼葡萄糖代谢^[6-8]调控成骨细胞的增殖、分化、凋亡,从而影响新骨的形成过程。

1.1 调节成骨细胞氧化还原平衡

在正常情况下,骨骼细胞内处于氧化还原平衡。在应激条件下机体产生过量自由基等氧化性物质,造成细胞氧化还原调控失衡,导致脂质过氧化、DNA损伤断裂、蛋白质功能丧失等,从而引发骨质疏松等骨骼疾病^[3,9-11]。

Rached等^[3]敲除小鼠成骨细胞中的FoxO1基因发现,成骨细胞数量明显减少,成骨率下降,骨骼体积萎缩,骨吸收增加。探究FoxO1的调控机制发现,FoxO1在成骨细胞中一方面通过调控氨基酸的摄入,调节成骨细胞的蛋白质合成,从而发挥保护作用。这种功能与FoxO1和激活转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)相互作用有关。ATF4是调控蛋白质摄入的负反馈调节通路的重要组成部分,可促进谷胱甘肽的合成^[12]。ATF4能与FoxO1相互作

[收稿日期] 2015-08-04; **[修回日期]** 2016-05-05

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(81400543)

[作者简介] 舒林径, 硕士, E-mail: kuailless@163.com

[通信作者] 宫苹, 教授, 博士, E-mail: gp602002@163.com

用并促进FoxO1活化, FoxO1也能增强ATF4的转录活性。成骨细胞中的FoxO1表达降低会导致蛋白质合成降低, 从而使一些抗氧化防御分子如谷胱甘肽和超氧化歧化酶2等机体抗氧化的防御物质活性下降, 活性氧和脂肪氧化产物水平升高。当给予缺乏FoxO1的小鼠抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸后, 可将其成骨细胞的氧化应激状态控制在正常水平, 其成骨细胞数量、成骨率和骨骼体积均得到恢复^[3]。另一方面, 在成骨细胞中, FoxO1还可通过抑制P19ARF/P16/P53和P66Shc两条关键的信号转导通路, 维持成骨细胞的正常增殖。P19ARF和P16是P53信号转导通路的上游调节基因, P19ARF和P16可活化P53。P19ARF/P16/P53信号转导通路可由活性氧激活, 调节活性氧诱导的抗细胞增殖作用及其早期老化。生理情况下, FoxO1可通过抑制P19ARF和P16的表达, 从而下调P53的活性, 防止成骨细胞周期抑制, 保证其正常增殖和骨稳态^[10]。另一条是P66Shc信号转导通路, 该通路可调节活性氧导致的细胞早期程序性死亡作用^[11]。而在FoxO1敲除小鼠的成骨细胞中, P19ARF、P16、P53以及P66Shc基因表达均上调。

1.2 FoxO1调节成骨细胞葡萄糖代谢

研究^[13-18]表明FoxO1可能是骨骼系统作为一个内分泌器官调节葡萄糖代谢的关键调控因子, 主要通过调控骨钙素的分泌和活性, 实现调控作用。

FoxO1在成骨细胞细胞核内, 与ATF4共定位, 与ATF4相互作用发挥效用^[6]。对成骨细胞中特异性敲除FoxO1基因的小鼠研究^[7]发现, 成骨细胞内FoxO1可通过抑制胰岛细胞增殖和功能, 抑制胰岛素靶器官的胰岛素敏感性, 从而升高空腹和餐后血糖。不仅如此, 成骨细胞表达的FoxO1还可以促进糖异生, 并且不影响胰高血糖素和生长激素等激素水平。

进一步研究发现, FoxO1可通过促进骨钙素的羧基化, 抑制非羧基化骨钙素的分泌, 从而减少胰岛β细胞增殖、胰岛素分泌及其敏感性, 发挥升高血糖的作用。FoxO1一方面可以直接与骨钙素的启动子和第一内含子结合, 阻止Runx2基因与骨钙素启动子位点结合^[19]。FoxO1与核心结合因子-α1 (core binding factor α1, CBFA1) 相互作用抑制其转录活性来抑制骨钙素的表达^[7]。胚胎干细胞磷酸酶 (embryonic stem cell phosphatase, Esp) 基因在成骨细胞中表达, 其编码产物蛋白酪氨酸磷酸酶导致成骨细胞的胰岛素受体去磷酸化, 参与骨钙素的羧基化修饰过程^[8]。另一方面, FoxO1还可间接通过下调Esp表达, 进而对骨钙素的生物活性进行调节。当同时敲除小鼠成骨细胞内FoxO1和骨钙素基因单链时, 胰岛素抵抗、葡萄糖不耐受现象得到了明显的

改善。

不仅成骨细胞表达的FoxO1可以调控胰岛素产生和敏感性, 它也是胰岛素在成骨细胞上的效应器。胰岛素通过磷脂酰肌醇-3激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶B (protein kinase B, PKB) 途径抑制成骨细胞上FoxO1活性, 从而促进骨钙素活性^[7]。一方面, 下调Esp表达从而促进骨钙素脱羧; 另一方面, 减少骨保护素产生, 促进破骨细胞生成和骨吸收^[18]。

通过这样的反馈途径, FoxO1和骨钙素实现了骨骼和胰岛之间的紧密联系, 调节能量代谢。氧化应激和胰岛素代谢对FoxO1的调控并非两个相对独立的过程, 这两方面相互影响、共同制衡了FoxO1在成骨细胞中的活性^[20]。在机体衰老早期, 适当地增加氧化应激可以增加骨内FoxO1的活性, 从而保持成骨细胞数量和功能, 利于血糖的利用。在代谢应激增加的情况下, 又可以减少胰岛素的水平, 导致骨内FoxO1活性增加, 从而升高血糖, 为大脑提供营养。因此, 除了胰岛和肝, 骨骼也是一个可以调控能量代谢的重要器官。

FoxO1可在成骨细胞内细胞核和细胞质之间穿梭。FoxO1入核, 与ATF4相互作用。这一过程可提高FoxO1转录活性。FoxO1可通过调控蛋白质合成, 抑制p19ARF/P16/P53和P66shc途径, 合成防御蛋白, 防止细胞周期阻滞。FoxO1可以抑制骨钙素转录活性, 下调Esp表达, 抑制骨钙素活性, 减少β细胞增殖和功能, 降低胰岛素分泌。抑制胰岛素靶器官的敏感性, 从而升高血糖。

2 FoxO1在破骨细胞中的作用

破骨细胞可再吸收矿化的骨基质, 在骨发育和重塑以及骨骼病理过程中发挥着重要作用。异常的破骨细胞增生或寿命改变可导致各种良性和恶性的骨骼疾病^[21-23]。

H₂O₂的堆积是破骨细胞分化的必要条件, 对维持破骨细胞生存起着重要的调节作用。Bartell等^[24]通过条件性增强或抑制小鼠破骨细胞内FoxO的功能, 发现FoxO1可通过增加过氧化氢酶水平, 减少H₂O₂堆积, 抑制破骨细胞前体细胞增殖和减少成熟破骨细胞寿命, 减少破骨细胞数量。当敲除FoxO1时, 破骨细胞的数量和活性都增加, 骨小梁的数量减少、间距增加, 骨密质厚度减少, 骨松质密度和骨体积减小。

2015年, Wang等^[25]提出了相反的结论, 通过敲除小鼠破骨细胞前体细胞和破骨细胞内FoxO1发现,

核因子 κ B受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 诱导的破骨细胞生成和活性均降低。Wang等^[25]认为两种相悖的结论与观察的时间和角度有关。重点关注于FoxO1和其调控的下游通路, 在直接刺激作用下, FoxO1促进巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) /RANKL诱导的骨吸收过程, 促进破骨细胞前体分化为破骨细胞。然而在长期、间接的交互作用下, FoxO1表现出其他学者^[24]观察到的结果。笔者认为, 两项研究的结果差异可能与开始药物刺激时小鼠周龄相差较大 (分别为第4周龄和10周龄) 有关。

FoxO1是否促进破骨细胞生成和活性尚存在争议, 相关机制研究仍欠缺, 有待进一步研究证实和补充。

3 FoxO1对骨向分化的作用

不仅成骨细胞、破骨细胞在骨形成过程中发挥重要作用, 作为成骨细胞来源的间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 也参与了骨形成的过程。MSC随着发育依次分化为骨干细胞、成骨前体细胞、成骨细胞、骨细胞。研究^[26]表明, FoxO1在干细胞和成骨细胞前体细胞的成骨向分化中发挥着重要的作用。在体内, FoxO1在小鼠胚胎的骨骼发育时表达, 在体外MSC分化为骨细胞时表达增加。骨骼形成早期, 降低小鼠胚胎中FoxO1基因表达, 会对小鼠骨骼的发生产生重大的影响, 影响小鼠骨骼系统的发育。

Siqueira等^[27]在对前成骨细胞分化模型的观察中发现, 在细胞系形成矿化结节的过程中, FoxO1的DNA结合区域活性和mRNA水平均上调。当FoxO1基因敲除后矿化结节产生减少。然而, 在该细胞系中过度表达FoxO1基因, 会导致MC3T3-E1细胞数量减少, 增殖细胞核抗原阳性细胞数量也有所下降。Almeida等^[28]在体外实验中, 氧化应激条件下刺激成骨细胞前体细胞发现, β -链蛋白从原来的Wnt/T细胞因子 (T cell factor, TCF) 改而结合到了FoxO1, 减少了体外的成骨细胞形成过程。该课题组随后进行体内试验, 敲除成骨细胞和脂肪细胞共同的多能前体—MSC细胞中的FoxO1基因, 观察到 β -链蛋白/TCF转录明显下调, 进一步证实FoxO1通过抑制Wnt/ β -链蛋白/TCF信号通路, 减少成骨细胞数量和骨量^[29]。上述研究显示, FoxO1是前成骨细胞分化的重要因子, 通过与RUNX2启动子相互作用, 调控Wnt信号通路等途径发挥作用。

4 结束语

FoxO1在骨骼中的调控作用会随细胞种类的改变而有所不同。在前成骨细胞的分化、增殖过程中发挥着重要作用, 调控成骨细胞的数量。在成熟成骨细胞行使功能的过程中, FoxO1蛋白能够通过ATF4的相互作用促进蛋白质的合成来对抗骨骼内的氧化应激反应, 维持成骨细胞的正常增殖, 而且对糖代谢进行调节。对破骨细胞作用尚存在争议, 这些分歧缘于研究对象、观察时长和侧重点不一致, 有待进一步研究证实。毋庸置疑的是, FoxO1在骨代谢中功能的发现和机制的完善, 认识到除了胰岛和肝, 骨骼也是一个可以调控能量代谢的重要器官^[20]。

骨骼和胰岛之间联系紧密, 骨骼通过FoxO1促进 β 细胞增殖、胰岛素分泌和能量消耗, 调控全身的糖代谢。不仅如此, 胰岛素信号通路也可以调控成骨细胞FoxO1从而调控骨代谢。或许由于FoxO1在不同组织中引发了相同的代谢作用, 可为研究不同代谢性疾病间的内在联系提供新的思路。骨代谢是口腔种植的基础, 通过对FoxO1在骨代谢中的作用进行深入的探究, 可以为其在口腔种植领域的研究提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 6):973-976.
- [2] Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation[J]. Cell, 2004, 117(4):421-426.
- [3] Rached MT, Kode A, Xu L, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts[J]. Cell Metab, 2010, 11(2):147-160.
- [4] Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass[J]. Nature, 2003, 423(6937):349-355.
- [5] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937):337-342.
- [6] Kode A, Mosialou I, Silva BC, et al. FoxO1 protein cooperates with ATF4 protein in osteoblasts to control glucose homeostasis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(12):8757-8768.
- [7] Rached MT, Kode A, Silva BC, et al. FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice[J]. J Clin Invest, 2010, 120(1):357-

- 368.
- [8] Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(4):677-680.
- [9] Ambrogini E, Almeida M, Martin-Millan M, et al. FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(2):136-146.
- [10] Satyanarayana A, Rudolph KL. p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(9):1237-1240.
- [11] Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals[J]. *Nature*, 1999, 402(6759):309-313.
- [12] Yang X, Matsuda K, Bialek P, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome[J]. *Cell*, 2004, 117(3):387-398.
- [13] Saleem U, Mosley TH Jr, Kullo IJ. Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(7):1474-1478.
- [14] Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, et al. Serum osteocalcin/bone-specific alkaline phosphatase ratio is a predictor for the presence of vertebral fractures in men with type 2 diabetes[J]. *Calcif Tissue Int*, 2009, 85(3):228-234.
- [15] Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(5):785-791.
- [16] Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition[J]. *Cell*, 2010, 142(2):309-319.
- [17] Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton[J]. *Cell*, 2007, 130(3):456-469.
- [18] Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism[J]. *Cell*, 2010, 142(2):296-308.
- [19] Yang S, Xu H, Yu S, et al. Foxo1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF1)/insulin regulation of osteocalcin expression by antagonizing Runx2 in osteoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21):19149-19158.
- [20] Kousteni S. FoxO1: a molecule for all seasons[J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(5):912-917.
- [21] Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function[J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(8):638-649.
- [22] Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression[J]. *Bone*, 2002, 30(1):5-7.
- [23] Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis[J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(2):115-137.
- [24] Bartell SM, Kim HN, Ambrogini E, et al. FoxO proteins restrain osteoclastogenesis and bone resorption by attenuating H₂O₂ accumulation[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3773.
- [25] Wang Y, Dong G, Jeon HH, et al. FOXO1 mediates RANKL-induced osteoclast formation and activity[J]. *J Immunol*, 2015, 194(6):2878-2887.
- [26] Teixeira CC, Liu Y, Thant LM, et al. Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40):31055-31065.
- [27] Siqueira MF, Flowers S, Bhattacharya R, et al. FOXO1 modulates osteoblast differentiation[J]. *Bone*, 2011, 48(5):1043-1051.
- [28] Almeida M, Han L, Martin-Millan M, et al. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor-to forkhead box O-mediated transcription[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(37):27298-27305.
- [29] Iyer S, Ambrogini E, Bartell SM, et al. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8):3409-3419.

(本文编辑 杜冰)