

免疫活性细胞对骨代谢的调控作用

王 凌 李大金 (复旦大学附属妇产科医院研究所,上海 200011)

中国图书分类号 R68 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2006)03-0287-04

1 骨免疫学的概念

骨形成和骨吸收之间的平衡调节着骨内环境稳定,这包括有成骨细胞(Osteoblasts,OB)和破骨细胞(Osteoclasts,OC)间相互的协调作用。OB是骨形成细胞,可分泌骨基质分子;而来源于造血前体细胞的OC则吸收骨基质。尽管OB和OC是骨代谢主要的调节细胞,但它们本身又受到局部微环境调节。近来有学者提出骨免疫学的概念,即免疫系统和骨系统间的相互作用^[1]。免疫功能异常将影响骨内环境稳定,反之亦然。例如:在类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis,RA)中的骨破坏特征就是“免疫系统对骨代谢控制缺陷”,炎症状态下观察到的一些病理性骨吸收的部分机制是由于活化T细胞对OC的直接和间接效应所致^[2]。T、B、树突状细胞(Dendritic cell,DC)细胞作为主要的免疫细胞群体在调节骨代谢中具有重要作用,本文对其作简要的综述。

2 T细胞和OB/OC细胞间的相互作用

越来越多的动物实验表明T细胞通过多种途径调控OC生成,但人T细胞在调节OC生成中的确切机制尚不清楚。T细胞对OC生成可能同时具有刺激和抑制效应,这依赖于活化程度和产生的细胞因子种类。如在体外迅速去除T细胞可刺激OC分化并增加体内非骨性部位的新骨形成。而T细胞产生的粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)又可动员正常人外周血单核细胞向OC分化潜能增加^[3]。

人类疾病的实验模型证实活化的T细胞可分泌多种促OC生成的细胞因子,包括两个特有的OC生成刺激因子:NF- κ B受体活化因子配基(Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand,RANKL)和M-CSF来调节骨代谢。在体外活化的T细胞(CD4⁺和CD8⁺)可刺激人OC形成。尽管活化T细胞上清中

可检测到可溶性M-CSF和RANKL,但M-CSF的存在对于巨噬细胞的存活或RANKL依赖的OC形成并不是必需的,提示其他T细胞来源的可溶性细胞因子可代替M-CSF。活化T细胞通过RANKL依赖和非依赖途径诱导人OC生成^[4]。

RANKL是TNF家族型膜蛋白,RANKL及其受体NF- κ B受体活化因子(Receptor activator of nuclear factor kappaB,RANK)是骨重建的关键调节分子,在调节OC生成中起关键作用。OB及基质细胞表达的RANKL促进造血前体细胞向OC分化。RANKL也表达于免疫细胞,包括T细胞和DC。有趣的是RANKL与RANK的相互作用不但可调节T细胞和DC间的细胞通讯、DC存活、淋巴结形成;而且来源于T细胞的RANKL可介导骨丢失^[5]。有实验报道抗CD3抗体可诱导T细胞杂交瘤A1.1细胞和脾T细胞中RANKL的表达。T细胞上RANKL的表达可有效诱导鼠脾细胞群体分化形成OC。诱导RANKL表达是依赖TCR活化所诱导的Ca²⁺内流,该表达可被Ca²⁺抑制剂环孢霉素A和TMB-8阻滞,TGF- β 可极大地增加抗CD3诱导的RANKL表达。除了对免疫应答潜在的作用,活化T细胞上表达的RANKL可能提供了免疫和骨代谢间某种对话的机制^[6]。

另一TNF家族分子护骨素(Osteoprotegerin,OPG)及其配体(Osteoprotegerin ligand,OPGL)之间的平衡也调控着骨重建。在免疫系统中OPGL可调节淋巴结器官发生,淋巴细胞发育及T细胞和DC的相互作用。OPGL受体RANK表达于软骨细胞、OC前体细胞和成熟OC。抗原刺激可诱导T细胞表达OPGL,系统及局部活化的T细胞可通过OPGL直接促进OC生成^[7]。有实验发现在RAW264.7细胞中活化的T细胞通过钙调磷酸酶激活T细胞核因子(NFAT)信号转导途径调节OC生成^[8]。

也有研究报道Th1和Th2型T细胞及相关细胞因子直接和间接诱导骨吸收。Th1型T细胞上调促炎性细胞因子L-1和TNF- α 的产生;后者可促进OC前体细胞分化并激活OC,间接诱导骨吸收,这种OC分化依赖OB产生的OPGL刺激。活化的T细胞主要是Th1型细胞,也可直接表达OPGL,直接促

作者简介:王 凌(1977年-),女,妇产科学博士;

指导教师:李大金(1957年-),男,教授,博士生导师,主要从事生殖免疫研究。

进 OC 分化。T 细胞直接和间接促进骨吸收依赖于 Th1 型 T 细胞募集至炎症部位的程度。T 细胞募集受黏附分子、趋化因子及其受体的调节。有关的黏附分子包括整合素 4 和 6, LFA-1 和 ICAM-1。在炎症部位 Th1 型细胞表达的 CCR5 和 CXCR3 显著增加, 而只检测到很少量 Th2 型细胞表达的 CCR4。在炎症部位趋化因子配体 RANTES, MIP-1 (CCR5 配体) 和 IP-10 (CXCR3 配体) 也同时增加, 这一 T 细胞特征存在于牙周组织疾病和类风湿性关节炎^[9]。有实验报道, 可诱导活化的 CD4⁺ T 细胞凋亡, 而抑制 OC 生成。在体外将活化的 CD4⁺ T 细胞和外周血单核细胞共培养可诱导 OC 生成。活化的 CD4⁺ T 细胞给予 R-125224 处理后 TRAP 阳性的多形核细胞数目减少。在 RA 滑膜组织中抗人 Fas-mAb 通过诱导 T 细胞凋亡也抑制了 OC 生成, 故诱导浸润的淋巴细胞凋亡可抑制局部炎症和骨吸收^[10]。

并不是所有的学者都认同上述“T 细胞促进 OC 生成”的观点, 也有研究者认为对骨代谢的调节主要通过 RANKL 和 IFN γ 间的对话。T 细胞通过 IFN- γ 介导对 OC 生成的抑制。T 细胞通过 RANKL 和 IFN- γ 之间信号的相互作用介导 OC 生成的调节。用 Transwell 培养表明该抑制不需要细胞与细胞间的直接相互作用, 提示 T 细胞产生的细胞因子导致 OC 生成的抑制效应。静止的 T 细胞通过 CD4⁺ T 细胞产生的 GM-CSF 和 IFN- γ 负调节 OC 生成, CsA 通过抑制这些细胞因子的产生刺激 OC 生成^[11]。T 细胞表达 RANKL 可能参与了病理状态如自身免疫性关节炎的发病。另一方面 T 细胞产生 IFN- γ 妨碍 RANKL-RANK 信号途径, 从而强烈抑制 OC 生成。IFN- γ 诱导 RANK 衔接蛋白 TRAF6 快速降解, 导致对 RANKL 诱导的转录因子 NF- κ B 和 JNK 活化的强烈抑制。前体细胞过表达 TRAF6 可逆转受抑制的 OC 生成, TRAF6 是 IFN- γ 作用的关键靶点。TRAF6 的加速降解需要 RANKL 启动泛素化和 IFN- γ 诱导泛素蛋白酶体系统活化, IFN- γ 通过上述途径提供了 T 细胞活化和骨吸收间的负向调节^[12]。

近来 T 细胞在 OC 生成中的作用受到了密切关注, 而 T 细胞对 OB 形成与活性的研究甚少。T 细胞产生可溶性细胞因子诱导骨髓基质细胞的碱性磷酸酶活性并提高 Runx2 和骨钙素 mRNA 表达, 刺激骨髓基质细胞分化为 OB 表型。活化的 T 细胞迅速诱导人骨髓基质细胞分化为成熟 OB, 加速骨更新^[13]。另一方面 TNF- α 和 IFN- γ 活化的 OB 通过 CD54 (ICAM-1) 和 CD106 (VCAM-1) 黏附分子和

CXCR3 趋化因子受体促进 T 细胞的募集和增生。炎症时 OB 与 T 细胞相互作用及 OB 调节 T 细胞的具体机制尚不明了^[14]。有实验观察到培养的肿瘤浸润淋巴细胞 (Tumor infiltrating lymphocyte, TILs) 在没有外来抗原刺激下自发黏附于 OB 和 BMSCs, 趋化因子 MIP-1 和 MIP-1 α 可进一步加强这种黏附。同时 TILs 表面检测到 LFA-1 自发活化现象, 推测 TILs 通过 LFA-1 黏附于 OB 和 BMSCs, TILs 表面整合素以 MIP-1 和 MIP-1 α 自分泌方式活化, 由此认为组成性上调整合素介导 TILs 与 OB 以及来源于骨髓的基质细胞的黏连。TILs 和 OB/基质细胞的相互作用导致了后者分泌促 OC 生成的细胞因子 L-6^[15]。

3 B 细胞和 OB/OC 细胞间的相互作用

B 淋巴细胞与骨细胞关系更为密切, 有研究提出 B 细胞生成需要与 OB/基质细胞的密切接触。反之, 雌激素作为骨代谢强有力的调节剂也参与了 B 淋巴细胞系的分化。B 细胞的祖细胞可分化为具有功能的 OC^[16]。多发性骨髓瘤细胞 (Multiple myeloma cell, MMC) 和人 OC 系细胞在形态学和细胞表面标志上有许多共同处。MMC 在浆细胞形态上与培养的人 OC 样细胞几乎没有差别^[17]。B 淋巴细胞与 OC 分化途径存在千丝万缕的联系。OC 来自骨髓造血微环境单核细胞/巨噬细胞谱系, 经典的理论认为 OC 分化主要通过 OC 前体细胞与基质/OB 细胞相互作用。而 OC 分化另一途径与 B 细胞分化紧密连接。T 和 B 细胞可能都通过 RANKL/RANK/OPG 系统起作用。这些细胞因子在 OC、DC、T 和 B 细胞的发育和功能及胸腺和淋巴结发生中起决定性作用。B 淋巴系细胞是骨髓中内源性 ODF/RANKL 主要来源, 并在体外支持 OC 分化。在体外, B 淋巴系细胞早期发育阶段受到 M-CSF 和可溶性的 ODF/RANKL 刺激, 具有分化为 OC 的潜能, 故可认为 B 淋巴系细胞通过以下两种途径参与 OC 生成: (1) 表达 ODF/RANKL 支持 OC 分化; (2) 本身作为 OC 前体细胞。与体外观察相一致, OC 减少与 klotho 突变型小鼠 (KL - / -) B 淋巴样细胞减少有关^[18]。

但也有学者报道 B 细胞可促进骨形成。如关节炎时皮质骨屏障破坏, 骨髓暴露于滑膜组织。临近关节炎损害的骨髓呈现 B 淋巴细胞富集浸润; 后者表达 BMPs 并刺激骨内膜骨形成, 从而得出骨髓炎症浸润促进骨形成的结论。认为 B 细胞表达的 BMP-6 和 -7 是新骨生成重要的刺激因子。骨髓通过在损害部位产生富含 B 细胞的骨髓并诱导骨内

膜骨形成,积极参与关节炎病程^[19]。

4 DC和OB/OC细胞间的关系

流式细胞仪分析发现,培养的OB样细胞CD10、CD44、CD54、CD80、CD86和HLA-DR阳性。这些抗原表型与滤泡状树突状细胞FDC相似。OB样细胞的表面抗原正常情况下也表达于共同来源于骨髓的其他细胞如某些DC,提示OB在功能上可能与某些DC相关,在骨组织中发挥一些除经典的成骨作用以外的其他作用^[20]。既然人OB样细胞的抗原表型提示与其他细胞群体相关,那么也可能具有共同的免疫功能。实验证实人OB样细胞在体外可吞噬不同质地、不同大小的颗粒,并可刺激同种异体T细胞增殖活化^[21]。研究表明人OB样细胞可执行免疫功能并充当抗原呈递细胞。与其他细胞的吞噬不同的是,OB对碎屑的吞噬作用可能降低胶原合成,而纤维母细胞的吞噬作用可能诱导趋化因子而扩大炎症^[22]。

OC和DC来自共同的祖先,即单核细胞/巨噬细胞前体细胞。有研究发现GM-CSF处理的OC前体细胞表达c-Fos和RANK以及低水平的CD11c和DEC205,后者可在DC上检测到。加入GM-CSF同时也使c-Fos和Fra-1表达减少,这对抑制OC生成很重要,故认为加入GM-CSF可使前体细胞向DC分化,抑制OC生成。但即使GM-CSF存在的条件下,转染逆转录病毒或在转基因鼠中诱导c-Fos过表达则可逆转OC分化的抑制。在分化的早期阶段表达c-Fos也可抑制DC成熟,促进OC分化,故可认为c-Fos是OC和DC之间谱系定型关键的调节因子。OC前体细胞的谱系定型似乎由GM-CSF通过调节c-Fos表达的功能决定;而M-CSF则抑制DC分化,促进前体细胞向OC分化。M-CSF和GM-CSF这两种细胞因子在调节DC和OC细胞的分化上起着相反的作用^[23]。

有研究者自FDC样细胞系克隆TNFR家族成员FDC-1,发现FDC-1的受体(FDCR-1)与OPG(调节OC分化的可溶性细胞因子)完全相同。OPG/FDCR-1可与细胞膜表面的FDC-1结合,淋巴样细胞限制性表达OPG/FDCR-1,特别是B细胞和DCs。CD40刺激可上调B细胞和DCs的OPG/FDCR-1表达。OPG/FDCR-1与RANK具有某些共同特性,后者是RANKL/TRANCE的第一受体;而OPG/FDCR-1被认为是RANKL/TRANCE的第二受体。RANK和OPG/FDCR-1表达之间的平衡可影响免疫应答,最终影响生发中心的形成^[24]。TRANCE(肿瘤坏死

因子相关的活化诱导的细胞因子)是TNF超家族成员,诱导造血微环境前体细胞向OC分化,促进DC存活并扩大DC效应。TRANCE是OB介导的OC活化的必要条件。TRANCE可导致并扩散OC动力的巨大变化,抑制其凋亡。长久以来人们认为一些因子通过激素如PTH与OB的相互作用兴奋OC,并由此活化OC。对PTH反应迟钝的OC群体,TRANCE引起的骨吸收活化与PTH引起的OB效应相等。可溶性TRANCE受体和可溶性OPG受体可去除OB介导的促进骨吸收效应。OPG可中和TRANCE对单个OC的刺激。OB表达TRANCE似乎是激素介导成熟OC活化的必要条件,TRANCE-R可能是活化OC信号传导的受体^[25]。

5 协同刺激信号与骨代谢

协同刺激信号为免疫细胞的活化所必需。近来越有学者将协同刺激信号的作用引入了骨代谢领域。长期以来人们一直认为在M-CSF存在下,RANKL调节骨吸收细胞OC的分化。但最近有实验发现缺乏ITAM衔接子Fc受体共同亚单位(FcR)和DNAX活化蛋白(DAP)12的小鼠由于OC分化受损,呈现严重的骨硬化病。在OC前体细胞中FcR和DAP12与多种免疫受体相联并通过磷脂酶C活化钙信号,故认为多种免疫受体活化依赖的ITAM协同刺激信号对维持骨内环境稳定是必需的,RANKL和M-CSF不足以激活OC生成所必需的全部信号^[26]。

有学者对此做了进一步研究后认为DAP12和FcR是通过Syk酪氨酸激酶调节功能性OC的发育。免疫系统的多种受体采用共同的信号模式,即磷酸化的ITAMs利用受体相关的接头蛋白募集Syk酪氨酸激酶从而传递信号。功能性OC的发育需要类似的机制。缺乏两个ITAM连接适配器DAP12和FcR的小鼠发生严重的骨硬化病,DAP12(-/-)FcR(-/-)骨髓细胞不能分化为多核OC或在体外骨吸收阻碍,显示Syk酪氨酸激酶的磷酸化作用受损,syk(-/-)祖细胞OC发育和骨吸收同样缺陷,syk(-/-)OC功能恢复必需用逆转录病毒转导使Syk的SH2区域完整,而完整的ITAM的DAP12区域对DAP12(-/-)FcR(-/-)细胞恢复功能是必需的,提示磷酸化的ITAMs募集Syk对OC生成极为重要。尽管DAP12是M-CSF和RANKL直接刺激OC分化的主要细胞内信号转导分子,DAP12和FcR在OB-OC共培养中支持OC发育上有重叠效应,这反映出体内的重叠功能^[27]。

6 小结

骨免疫学作为一门跨学科的研究领域,其主要研究内容为骨和免疫系统间的相互对话。理解骨和免疫细胞在正常或病理状态下的相互作用,为治疗骨代谢性疾病提供新的线索。目前研究大多集中在免疫细胞分泌可溶性分子作用于 OB/OC,从而介导相应效应,而几乎没有文献正面研究免疫细胞和 OB/OC通过细胞-细胞直接接触方式传导细胞间信号。免疫细胞和骨细胞之间,是否存在细胞-细胞直接接触传导胞内信号?如果存在,那么介导这种细胞-细胞直接接触的表面分子有哪些?传递着什么样的胞内信号?这种细胞-细胞直接接触在免疫细胞和骨细胞相互调节的具体机制中起着什么样的作用?这种细胞-细胞直接接触是否也参与了骨代谢及其调控机制?这许多的问题尚待进一步研究阐明。

7 参考文献

- Rho J, Takami M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems [J]. *Mol Cells*, 2004; 17 (1): 1-9.
- Takayanagi H. Cross-talk between immune and skeletal systems [J]. *Nippon Rinsho*, 2002; 60 (12): 2287-2295.
- Purton L E, Lee M Y, Torok-Storb B. Normal human peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte colony-stimulating factor have increased osteoclastogenic potential compared to nonmobilized blood [J]. *Blood*, 1996; 87 (5): 1802-1808.
- Weitzmann M N, Cenci S, Rifas L *et al* T cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Bone Miner Res*, 2001; 16 (2): 328-337.
- Theill L E, Boyle W J, Penninger J M. RANKL and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002; 20: 795-823.
- Wang R, Zhang L, Zhang X *et al* Regulation of activation-induced receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression in T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2002; 32 (4): 1090-1098.
- Kong Y Y, Feige U, Sarosi I *et al* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand [J]. *Nature*, 1999; 402 (6759): 304-309.
- Hirota H, Tuohy N A, Woo J T *et al* The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [J]. *J Biol Chem*, 2004; 279 (14): 13984-13992.
- Taubman M A, Kawai T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001; 12 (2): 125-135.
- Ogawa Y, Ohtsuki M, Uzuki M *et al* Suppression of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis by induction of apoptosis in activated CD4⁺ T cells [J]. *Arthritis Rheum*, 2003; 48 (12): 3350-3358.
- Shinoda K, Sugiyama E, Taki H *et al* Resting T cells negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes [J]. *Bone*, 2003; 33 (4): 711-720.
- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S *et al* T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma [J]. *Nature*, 2000; 408 (6812): 600-605.
- Rifas L, A rackal S, Weitzmann M N. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2003; 88 (4): 650-659.
- Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacentini A *et al* Recruitment and proliferation of T lymphocytes is supported by IFN gamma- and TNF alpha-activated human osteoblasts: involvement of CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) adhesion molecules and CXCR3 chemokine receptor [J]. *J Cell Physiol*, 2004; 198 (3): 388-398.
- Tanaka Y, Mine S, Hanagiri T *et al* Constitutive up-regulation of integrin-mediated adhesion of tumor-infiltrating lymphocytes to osteoblasts and bone marrow-derived stromal cells [J]. *Cancer Res*, 1998; 58 (18): 4138-4145.
- Grevic D, Katavic V, Lukic I K *et al* Cellular and molecular interactions between immune system and bone [J]. *Croat Med J*, 2001; 42 (4): 384-392.
- Faust J, Hunt P, Scully S *et al* Multiple myeloma cells and cells of the human osteoclast lineage share morphological and cell surface markers [J]. *J Cell Biochem*, 1998; 71 (4): 559-568.
- Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H *et al* Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways [J]. *J Immunol*, 2001; 167 (5): 2625-2631.
- Gortz B, Hayer S, Redlich K *et al* Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation [J]. *J Bone Miner Res*, 2004; 19 (6): 990-998.
- Reyes-Botella C, Montes M J, Vallecillo-Capilla M F *et al* Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2002; 12 (5-6): 359-364.
- Ruiz C, Perez E, Vallecillo-Capilla M *et al* Phagocytosis and allogeneic T cell stimulation by cultured human osteoblast-like cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2003; 13 (5): 309-314.
- Bauer T W. Particles and perimplant bone resorption [J]. *Clin Orthop*, 2002; (405): 138-143.
- Miyamoto T, Ohneda O, Arai F *et al* Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors [J]. *Blood*, 2001; 98 (8): 2544-2554.
- Yun T J, Chaudhary P M, Shu G L *et al* OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40 [J]. *J Immunol*, 1998; 161 (11): 6113-6121.
- Fuller K, Wong B, Fox S *et al* TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts [J]. *J Exp Med*, 1998; 188 (5): 997-1001.
- Koga T, Inui M, Inoue K *et al* Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis [J]. *Nature*, 2004; 428 (6984): 758-763.
- Mocsai A, Humphrey M B, Van Ziffle J A *et al* The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcR-gamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101 (16): 6158-6163.

[收稿 2005-06-29 修回 2005-11-29]

(编辑 许四平)

邮政代号 12-89 半年价 60.00 元 单价 10.00 元