

酪蛋白激酶-2 相互作用蛋白 1 基于磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路参与绝经后骨质疏松症发生发展过程中细胞自噬的机制

杨依然¹, 刘钟¹, 毛一凡¹, 程晓光², 孙迎春³, 史晓林⁴

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053;

2. 北京积水潭医院, 北京 100035;

3. 中国康复研究中心, 首都医科大学, 北京 100068;

4. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005)

摘要 自噬及自噬相关蛋白在骨代谢平衡中具有十分重要的作用,是当前骨质疏松研究的重要方向。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路是细胞自噬的经典信号通路,不仅对成骨细胞和破骨细胞的功能有间接调节作用,而且直接参与了成骨细胞矿化和破骨细胞褶皱缘形成。酪蛋白激酶-2 相互作用蛋白 (casein kinase 2 interacting protein, CKIP) 1 可通过增强 Smad 泛素化调节因子的泛素连接酶活性抑制成骨,是重要的骨形成负调节因子,也可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。但目前对 CKIP-1 与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与细胞自噬的研究较少,且大多集中在肿瘤方面。对于 CKIP-1 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与绝经后骨质疏松症发生发展过程中细胞自噬的机制,目前仍存在很多值得研究的问题。

关键词 骨质疏松, 绝经后; 自噬; 酪蛋白激酶 II; 磷酸肌醇 3-激酶; 蛋白激酶类; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 综述

绝经后骨质疏松症是原发性骨质疏松症的一种,主要是由绝经后雌激素水平降低造成。自噬及自噬相关蛋白与成骨细胞、骨细胞、破骨细胞的形成和功能都有关系,是当前骨质疏松的研究热点之一。酪蛋白激酶-2 相互作用蛋白 (casein kinase 2 interacting protein, CKIP) 1 通过增强 Smad 泛素化调节因子 (Smad ubiquitin regulatory factor, Smurf) 1 的泛素连接酶活性抑制成骨细胞分化,是重要的骨形成负调节因子^[1],又可抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路^[2],而 PI3K/Akt/mTOR 信号通路是细胞自噬的经典信号通路。本文就 CKIP-1 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与绝经后骨质疏松症发生发展过程中细胞自噬的机制进行综述。

1 mTOR 与细胞自噬的关系

细胞自噬是非功能性蛋白质和细胞器被溶酶体

降解、回收、产生能量的生理机制,可防止不必要的结构和氧化应激的积累^[3]。自噬体的形成是一个多步骤的过程,目前发现有超过 15 种自噬相关基因 (autophagy associated gene, ATG) 参与前自噬体结构的分层次构建过程。自噬的起始反应由 UNC-51 样激酶 (UNC-51-like kinase, ULK) 介导,后者是由 ULK1、ULK2、ATG13、ATG101 和 FIP200 组成的复合物^[4]。哺乳动物体内的 mTOR 是一种结构高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,可以作为营养物质或能量的传感器,是主要的自噬调节蛋白之一^[5]。mTOR 是 mTORC1 复合物的一部分;在营养丰富的条件下, mTORC1 通过磷酸化的 ULK1、ULK2 和 ATG13 负调节 ULK 复合物^[6];在饥饿条件下, mTORC1 被灭活,导致 ULK1 激活,磷酸化 ATG13、FIP200 和诱导细胞自噬发生^[7-9]。除了控制细胞生长和新陈代谢,当营养物质和生长因子丰富的时候, mTOR 可负调节细胞自噬^[10]。因此, mTOR 是一种经典的细胞自噬诱导物。

2 CKIP-1 和自噬对成骨细胞的作用

目前,有关 CKIP-1 和自噬对成骨细胞作用的研究较多。Liu 等^[11]通过研究成骨细胞系 (来自鼠颅骨

成骨细胞或骨髓来源的初代成骨细胞)发现,成骨细胞在分化和矿化过程中自噬均增强;通过消除 FIP200 抑制细胞自噬,可导致鼠的骨量减少。Nollet 等^[12]对早期成骨细胞分化的研究补充了这种观点。他们观察到,从一个较低的稳态开始,成骨细胞的分化中就存在非常高速的自噬活动,这显示自噬在成骨细胞分化过程中扮演着重要的角色;他们用透射电子显微镜分析成骨细胞系和初代鼠成骨细胞,观察到含有针状结构磷灰石的双边结构自噬囊泡在细胞外介质被释放,成骨细胞矿化也由自噬调控,自噬空泡行为可以作为成骨细胞矿化分泌的运载工具,自噬蛋白 siATG7 和 siBECN1 可以明显减少鼠成骨细胞的矿化效率。

CKIP-1 参与多种重要信号通路,控制细胞生长、凋亡、分化、细胞骨架和骨形成。Nie 等^[13]对 CKIP-1 的研究发现,CKIP-1 可以将酪蛋白激酶 2 重新分配到质膜,并调节质膜底物的修饰,能与 Akt 相互作用并抑制 PI3K/Akt 信号传递,其 C 端片段可以移位至细胞核,抑制转录激活因子 AP1 的活性,并能通过激活 Caspase3 增加细胞凋亡,同时也能促进 Smurf1 介导的泛素化和底物降解,控制成骨细胞分化和骨形成。

由此可见,CKIP-1 和自噬都在成骨细胞的分化中具有重要作用,其中 CKIP-1 抑制成骨细胞分化和骨形成,自噬调节并参与成骨细胞分化和矿化。

3 自噬对骨细胞和破骨细胞的作用

骨细胞是成骨细胞的终末分化状态,并嵌入到矿化骨基质。由于骨细胞的长寿命和存在的位置,使其高度依赖于自噬。鼠和人类的皮质骨细胞都有一个能够唤起高水平基础自噬的自噬标志轻链 3 (autophagy marker light chain 3, LC3) 基因分布,在骨细胞处于饥饿和缺氧状态时,自噬会被诱发^[14]。King 等^[15]的研究表明,机械力刺激可以诱导自噬小体形成;哺乳动物细胞对机械力高度敏感,机械力诱导的自噬反应是瞬态的,且依赖 mTOR 蛋白的调节。Jia 等^[16]在糖皮质激素剂量对骨细胞影响的研究中发现,经糖皮质激素处理后,骨细胞自噬的存在与组织蛋白酶 K 的蛋白质含量增加有关,并发现糖皮质激素依赖性治疗剂量可降低抗氧化基因表达,糖皮质激素剂量较低时激活自噬、高剂量时促进细胞凋亡,这表明自噬能缓解糖皮质激素治疗中骨细胞的生存压力。

自噬及部分自噬蛋白在破骨细胞分化和骨吸收

中也有重要作用。诱导破骨细胞分化的单核细胞趋化蛋白 1 和核因子 κ B 受体活化因子配体均已被证明受 Beclin-1 表达的正调节^[17]。包括 Atg5、Atg7、Atg4B 和 LC3 在内的一些自噬蛋白是破骨细胞褶皱缘产生和骨吸收所必需的,破骨细胞褶皱缘膜中 LC3-II 的存在可以促进骨吸收所需的分泌溶酶体的融合^[17]。Cejka 等^[18]的研究表明,mTOR 能够促进破骨细胞生成,而且 mTOR 下调可以抑制破骨细胞的产生和活动。巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子- α 和核因子 κ B 受体活化因子可以通过 mTOR 作为一个共同的目标信号来促进破骨细胞生成。刺激破骨细胞生成的几个条件,如缺氧或微重力刺激均是由自噬介导的^[19-20]。Shi 等^[21]在糖皮质激素剂量对破骨细胞影响的研究中发现,糖皮质激素通过促进自噬诱导破骨细胞产生,导致骨量减少。自噬抑制剂氯喹也可通过抑制自噬来阻止破骨细胞成熟,具有治疗骨质疏松症的作用^[22]。

4 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的细胞自噬与绝经后骨质疏松症的关系

PI3K/Akt/mTOR 通路参与的细胞自噬对于绝经后骨质疏松症的发生发展具有重要意义,但其对成骨细胞和破骨细胞的具体作用尚未完全明确。雌二醇是一种强大的骨吸收抑制剂,可通过刺激基质合成和成骨细胞增殖促进骨形成^[23]。Yang 等^[24]的研究发现,在血清剥夺的情况下,成骨细胞会被诱导发生自噬,而雌二醇则通过 ERs-ERK/mTOR 信号轴增强自噬,减少成骨细胞凋亡,发挥骨保护作用。增强自噬可抑制氧化应激对成骨细胞的损伤,减轻骨质疏松症状。

一项 22 例绝经后骨质疏松症患者与 26 例健康志愿者的比较研究发现,绝经后骨质疏松症患者的骨丢失与自噬蛋白 ULK1 上调有关;在绝经后骨质疏松症患者外周血中,mTOR 和成骨细胞形成基因的水平均降低,转化生长因子 β 1、 β 2 的水平与患者股骨部位的骨密度呈正相关;mTOR 水平的下调与成骨细胞的相关基因表达也有关系;自噬蛋白 ULK1 上调与成骨细胞形成基因的下调有关^[25]。

以往的研究认为,在绝经后骨质疏松症的发生发展过程中,自噬通过抑制破骨细胞骨吸收来减少骨量丢失。2004 年 Kneissel 等^[26]的研究表明,在体外实验中使用依维莫司可以抑制破骨细胞的形成,降低其

活性;体内实验显示,依维莫司可以减少去卵巢动物 60% 的骨质流失,即 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节的自噬在绝经后骨质疏松症的发生发展过程中可以抑制破骨细胞的形成和活性。但是,2012 年 Chung 等^[27]的研究结果显示,破骨细胞 Atg5 基因敲除后,小鼠骨密度增加,可减少卵巢切除术造成的骨流失;破骨细胞的活性与 LC3 - I 和 LC3 - II 转换有关,但自噬活动没有增强,他们认为这是自噬蛋白 LC3 - I 和 LC3 - II 的一种非自噬相关活动。

5 CKIP - 1 与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关系

目前对 CKIP - 1 与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的细胞自噬的研究较少,且大多集中在肿瘤方面。CKIP - 1 对成骨的抑制是通过增强 Smurf1 的泛素连接酶活性实现的^[1]。受此启发,2014 年 Nie 等^[2]对结肠癌的研究发现,在结肠癌 HCT116 和 SW480 细胞中 CKIP - 1 过度表达可以抑制细胞生长和迁移,这种抑制作用与 CKIP - 1 对成骨的抑制作用一样是依赖于调控 Smurf1 来实现的;在细胞周期中,CKIP - 1 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,增强 Smurf1 自动降解,显著降低 Smurf1 蛋白水平,使 Smurf1 在有丝分裂中降解;在结肠癌细胞中,CKIP - 1 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导和增强 Smurf1 自身降解来控制 Smurf1 的水平,而 CKIP - 1 的下调与结肠癌发生中的 Smurf1 上调相关。Prieto - Domínguez 等^[28]在肝癌细胞中也发现 CKIP - 1 可以抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。

6 小 结

PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的自噬活动是成骨细胞和破骨细胞分化所必需的,不仅对成骨细胞和破骨细胞的功能有间接调节作用,而且直接参与了成骨细胞矿化和破骨细胞褶皱缘形成。CKIP - 1 通过增强 Smurf1 的泛素连接酶活性能抑制成骨,绝经后骨质疏松症发生发展过程中增强 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的自噬可以促进成骨,这种观点也已基本成为共识。

绝经后骨质疏松症发生发展过程中,CKIP - 1 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与细胞自噬的机制,目前仍存在很多值得研究的问题:①PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的自噬对破骨细胞的作用仍存在较大争议;②在对绝经后女性外周血的临床研究中,不同

自噬蛋白与包括 CKIP - 1 在内的成骨调节基因表达的关系尚不明确,不同的免疫蛋白之间的关系也不明确,自噬对人体不同部位骨流失的影响也缺乏足够研究;③骨组织中 CKIP - 1 与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关系、CKIP - 1 与 PI3K/Akt/mTOR 通路参与的自噬反应的关系、CKIP - 1 与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的关系对 CKIP - 1 成骨抑制作用的影响,也需要进一步研究;④假设 CKIP - 1 在骨组织中也对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有抑制作用,那么 CKIP - 1 是否可以影响 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的自噬反应? 如果 CKIP - 1 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有抑制作用,并且对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的自噬反应具有调节作用,那么 CKIP - 1 对破骨细胞的作用是否与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与的自噬反应在破骨细胞分化增殖中的作用有关? 这些都需要明确。

7 参考文献

- [1] 胡炯,王博,吴鹏,等. CKIP - 1 与骨质疏松的最新研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2016,22(8):1053 - 1057.
- [2] NIE J, LIU L, XING G, et al. CKIP - 1 acts as a colonic tumor suppressor by repressing oncogenic Smurf1 synthesis and promoting Smurf1 autodegradation [J]. *Oncogene*, 2014,33(28):3677 - 3687.
- [3] TOKUDA E, FUJITA N, OH - HARA T, et al. Casein kinase 2 - interacting protein - 1, a novel Akt pleckstrin homology domain - interacting protein, down - regulates PI3K/Akt signaling and suppresses tumor growth in vivo [J]. *Cancer Res*, 2007,67(20):9666 - 9676.
- [4] FLORENCIO - SILVA R, DA SILVA SASSO GR, SIMOES MJ, et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 10(1155):421746 - 421763.
- [5] HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, et al. Nutrient - dependent mTORC1 association with the ULK1 - Atg13 - FIP200 complex required for autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2009,20(7):1981 - 1991.
- [6] DIBBLE CC, MANNING BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output [J]. *Nat Cell Biol*, 2013,15(6):555 - 564.
- [7] HE C, KLIONSKY DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. *Annu Rev Genet*, 2009,43: 67 - 93.
- [8] GANLEY IG, LAM DU H, WANG J, et al. ULK1. ATG13.

- FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (18): 12297 – 12305.
- [9] HOSOKAWA N, SASAKI T, IEMURA SI, et al. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13 [J]. *Autophagy*, 2009, 5 (7): 973 – 979.
- [10] JUNG HS, CHUNG KW, WON KIM J, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia [J]. *Cell Metab*, 2008, 8 (4): 318 – 324.
- [11] LIU F, FANG F, YUAN H, et al. Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28 (11): 2414 – 2430.
- [12] NOLLET M, SANTUCCI – DARMANIN S, BREUIL V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis [J]. *Autophagy*, 2014, 10 (11): 1965 – 1977.
- [13] NIE J, LIU L, HE FC, et al. CKIP – 1: A scaffold protein and potential therapeutic target integrating multiple signaling pathways and physiological functions [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12 (1, 213): 276 – 281.
- [14] ZAHM AM, BOHENSKY J, ADAMS CS, et al. Bone cell autophagy is regulated by environmental factors [J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 194 (2/4): 274 – 278.
- [15] KING JS, VELTMAN DM, INSALL RH. The induction of autophagy by mechanical stress [J]. *Autophagy*, 2011, 7 (12): 1490 – 1499.
- [16] JIA J, YAO W, GUAN M, et al. Glucocorticoid dose determines osteocyte cell fate [J]. *FASEB J*, 2011, 25 (10): 3366 – 3376.
- [17] DESELM CJ, MILLER BC, ZOU W, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption [J]. *Dev Cell*, 2011, 21 (5): 966 – 974.
- [18] CEJKA D, HAYER S, NIEDERREITER B, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62 (8): 2294 – 2302.
- [19] 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.
- [20] SAMBANDAM Y, TOWNSEND MT, PIERCE JJ, et al. Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis [J]. *Bone*, 2014, 61: 125 – 131.
- [21] SHI J, WANG L, ZHANG H, et al. Glucocorticoids: dose – related effects on osteoclast formation and function via reactive Oxygen species and autophagy [J]. *Bone*, 2015, 79: 222 – 232.
- [22] GLANTSCHNIG H, FISHER JE, WESOLOWSKI G, et al. M – CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10 (10): 1165 – 1177.
- [23] ERNST M, HEATH JK, SCHMID C, et al. Evidence for a direct effect of estrogen on bone cells in vitro [J]. *J Steroid Biochem*, 1989, 34 (1 – 6): 279 – 284.
- [24] YANG YH, CHEN K, LI B, et al. Estradiol inhibits osteoblast apoptosis via promotion of autophagy through the ER – ERK – mTOR pathway [J]. *Apoptosis*, 2013, 18 (11): 1363 – 1375.
- [25] TCHETINA EV, MASLOVA KA, KRYLOV MY, et al. Association of bone loss with the upregulation of survival – related genes and concomitant downregulation of Mammalian target of rapamycin and osteoblast differentiation – related genes in the peripheral blood of late postmenopausal osteoporotic women [J]. *J Osteoporos*, 2015 [2017 – 10 – 11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4338391>.
- [26] KNEISSEL M, LUONG – NGUYEN NH, BAPTIST M, et al. Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts [J]. *Bone*, 2004, 35 (5): 1144 – 1156.
- [27] CHUNG YH, YOON SY, CHOI B, et al. Microtubule – associated protein light chain 3 regulates Cdc42 – dependent actin ring formation in osteoclast [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44 (6): 989 – 997.
- [28] PRIETO – DOMÍNGUEZ N, ORDÓÑEZ R, FERNÁNDEZ A, et al. Modulation of autophagy by sorafenib: effects on treatment response [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 151.

(收稿日期: 2017-11-29 本文编辑: 李晓乐)