

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00953

# TGF- $\beta$ 超家族在软骨发生、发育和维持中的作用

杨冠, 杨晓

军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室, 北京 100071

**摘要:** 转化生长因子 $\beta$ (Transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族包括 TGF- $\beta$ 和骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)两个亚家族。TGF- $\beta$ 超家族信号通路的配体、配体拮抗分子、受体、信号转导分子均在软骨内成骨过程中发挥各自独特的作用, 参与调控软骨细胞的谱系分化、增殖、成熟、凋亡和矿化。BMP信号能起始间充质细胞向软骨细胞分化并维持软骨细胞的特性, 在软骨发生过程中起主导作用; 在生长板发育的过程中, BMP信号促进软骨细胞的成熟, 促进成骨, 而 TGF- $\beta$ 信号抑制软骨细胞的肥大分化, 维持生长板中适量的软骨细胞; TGF- $\beta$ 信号和 BMP信号对于关节软骨的维持和修复都是不可或缺的。因此, TGF- $\beta$ 超家族的重要作用贯穿骨骼发育过程的始终。

**关键词:** 转化生长因子 $\beta$ ; 骨形态发生蛋白; 软骨; 软骨内成骨; 骨骼发育

## Roles of TGF- $\beta$ superfamily in the genesis, development and maintenance of cartilage

YANG Guan, YANG Xiao

Genetic Laboratory of Development and Diseases, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

**Abstract:** The transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily is composed of TGF- $\beta$  subfamily and bone morphogenetic protein (BMP) subfamily. The ligands, ligand antagonists, receptors and intracellular transducers that engage in the TGF- $\beta$  superfamily signaling pathway play their unique roles during endochondral ossification *via* regulating the lineage differentiation, proliferation, maturation, apoptosis and mineralization of chondrocytes. BMP signaling dominates chondrogenesis through initiating the chondrocytic commitment of mesenchymal cells and maintaining the chondrocytic phenotype. During the development of growth plate, BMP signaling promotes the maturation of chondrocytes to facilitate ossification, whereas TGF- $\beta$  signaling inhibits the hypertrophic differentiation to preserve adequate chondrocytes within the growth plate. Both TGF- $\beta$  signaling and BMP signaling are indispensable for the maintenance and repair of articular cartilage. Therefore, it indicates that TGF- $\beta$  superfamily may function essentially all throughout the development of skeletons.

**Keywords:** TGF- $\beta$ ; BMP; cartilage; endochondral ossification; bone development

脊椎动物形成骨骼的方式主要有两种: 膜内成骨和软骨内成骨。后者是脊椎动物成骨的主要方式, 形成除顶骨、额骨、部分锁骨和上、下颌骨以外

几乎所有的骨骼。软骨内成骨包括如下几个步骤: 首先, 在发育为骨组织的部位, 间充质细胞聚集并分化为软骨原细胞, 形成软骨原基; 此后, 软骨原基

收稿日期: 2008-03-23; 修回日期: 2008-04-14

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(编号: 30430350)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30430350)]

作者简介: 杨冠(1980-), 男, 湖南湘乡人, 博士研究生, 研究方向: 发育和疾病的分子遗传学。Tel: 010-66948883; E-mail: yogopop3@163.com

通讯作者: 杨晓(1967-), 女, 四川省都江堰人, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 发育和疾病的分子遗传学。Tel: 010-63895937; E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

发育成称之为生长板的结构,行使发育引擎的作用介导骨骼的生长。根据生长板中软骨细胞不同分化阶段的形态可将生长板分为静息区、增殖区、肥大前区、肥大区和终末肥大区。从静息期直至终末肥大期,软骨细胞经历了一系列的分化、增殖、成熟和凋亡的过程,分泌不同的细胞外基质,并逐步被骨组织所替代。这一过程持续进行,直至成年后生长板软骨细胞耗竭,骨骼才停止生长。而关节软骨细胞则保持未分化状态,维持关节的灵活运转。软骨原基的形成对于骨骼组织的完整性极其重要,而生长板软骨的发育对于形成具有正常功能的骨骼起关键作用。软骨内成骨过程受到多个信号通路的调节,如Indian hedgehog/甲状旁腺激素相关多肽(Indian hedgehog/parathyroid hormone-related peptide, Ihh/PTHrP)反馈环路,成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)信号通路, Wnt信号通路等<sup>[1,2]</sup>。随着研究的深入,转化生长因子 $\beta$ (Transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族信号通路在软骨内成骨过程中的关键作用逐渐被人们所认识。

TGF- $\beta$ 超家族包括TGF- $\beta$ s、骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)、生长分化因子(Growth and differentiation factors, GDFs)、Nodal、活化素(Activin)和抑制素(Inhibin)等30多个成员,大体上可分为TGF- $\beta$ /Activin/Nodal和BMP/GDF/MIS(Muellerian inhibiting substance)两个亚家族,具有调节细胞增殖、谱系分化、迁移、黏附和凋亡等广泛的作用。这些信号分子作用于细胞膜上的I型和II型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体复合物(Type I and type II serine/threonine kinase receptors),可导致两类不同的通路被激活:经典的Smads通路和非经典的有丝分裂原激活的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路。与配体结合后,受体复合物形成异二聚体并使II型受体磷酸化,进而磷酸化激活受体依赖型Smads(R-Smads, 即Smad1、2、3、5、8)。R-Smads招募通用型Smad(Co-Smad, 即Smad4)并与之结合形成异聚体,进入核内调节靶基因的转录。而抑制型Smads(I-Smads, 即Smad6、7)则能阻止R-Smads的磷酸化,或促成受体的降解,从而负向调控Smads通路。BMP信号也能通过同样的受体激活TGF- $\beta$ 激活的激酶I(TGF- $\beta$ -activated kinase 1, TAK1),引起MAPK通路的激活<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta$ 超家族信号通路的调节可发生于多个层面,主要包括:(1)信号通路自身的正、负反馈调节;(2)胞外配体拮抗分

子抑制TGF- $\beta$ 超家族配体成员与受体的结合,这些拮抗分子包括Noggin、Twisted gastrulation (TSG)、Chordin家族和Dan家族等;(3) Smad泛素化调节因子(Smad ubiquitin regulatory factor, Smurf)调节R-Smads与TGF- $\beta$ 受体的稳定性;(4) TGF- $\beta$ 超家族信号通路与其他信号通路之间发生相互作用,如参与调控Ihh-PTHrP、FGF、Wnt等信号通路<sup>[4]</sup>。

TGF- $\beta$ 超家族在软骨内成骨过程中具有重要作用。BMP因为其能在体内诱导异位骨化而被人们所认识;在骨膜附近注射TGF- $\beta$ 分子也可以诱导骨膜细胞分化为软骨细胞,进而发生软骨内成骨。在多种类型的人类遗传性骨软骨发育不良疾病中,人们发现了TGF- $\beta$ 超家族成员的突变,如在短指(趾)畸形C型(Brachydactyly, type C)和Hunter-Thompson型软骨发育不良(Acromesomelic dysplasia, Hunter-Thompson type)中发现了GDF5基因的突变,在近端指(趾)间关节粘连(Proximal symphalangism)和多发性骨发育异常综合征(Multiple dysostoses syndrome)中发现了NOG基因的突变,在短指(趾)畸形A2型(Brachydactyly, type A2)中发现了BMPRII的突变<sup>[5]</sup>。然而,TGF- $\beta$ 超家族信号通路在软骨内成骨过程中的作用是极其复杂的,从间充质细胞聚集到软骨细胞发生凋亡、矿化,各TGF- $\beta$ 超家族分子发挥功能具有时空特异性的特点。随着新技术的发展,尤其是基因打靶和转基因技术的广泛应用,与几年前相比有越来越多具有说服力的实验数据来阐明TGF- $\beta$ 超家族在软骨发生、发育和维持中的作用。本文将尝试从软骨发生到骨骼形成的各个关键阶段来阐述TGF- $\beta$ 超家族在其中的作用。

## 1 TGF- $\beta$ 超家族与软骨发生

软骨发生包括间充质细胞的迁移,在特定部位发生聚集并向软骨细胞分化,继而形成软骨原基等一系列的步骤。在这一过程中,TGF- $\beta$ 超家族信号发挥主导作用。此时发挥作用的主要是BMP信号。BMP信号的I型受体(BMP receptor, type I)BMPRII和BMPRI, BMP信号的配体拮抗分子如TSG、Noggin均表达于聚集的间充质以及早期的软骨原基。在模拟体内间充质聚集的高密度培养实验中,向培养的间充质细胞加入BMP可以诱导N-钙黏蛋白(N-cadherin)的表达,从而加强细胞之间的相互作用,聚集成团并分化为软骨细胞<sup>[6]</sup>。在肢芽形成的过程中过表达Noggin则能完全抑制四肢的形成<sup>[7,8]</sup>。BMP

信号是通过调控 Sox (SRY-related high mobility group-box gene)来诱导软骨发生的。Sox是调控胚胎早期软骨发育和维持软骨细胞特性的一类重要的转录因子,作用于软骨细胞的主要有L-Sox5、Sox6和Sox9。Sox的缺失将导致间充质细胞不能向软骨细胞分化,致使软骨原基形成受损,四肢完全缺失<sup>[9]</sup>。最近有研究人员用标记-示踪的方法在体内跟踪了具有不同细胞特性的软骨原细胞迁移特化形成各个骨骼元件的过程,发现BMP信号对于间充质细胞的聚集和维持紧缩状态,形成软骨原基十分重要。而Sox9缺失后,间充质细胞能在BMP的作用下迁移聚集成团,但是不能进一步分化为软骨原细胞,而是向成纤维样细胞分化。因此,这两类分子在早期软骨发生中的作用具有某种调节关系<sup>[10]</sup>。体外有许多细胞培养实验证明,BMP信号能促进Sox9的表达,促进间充质细胞向软骨细胞分化<sup>[11]</sup>,且这种BMP诱导Sox的关系只有在间充质聚集后才能发生;Sox9对于BMP诱导软骨细胞表达2型胶原及蛋白多糖,维持软骨细胞的特性不可或缺,但Sox表达的维持又依赖于持续的BMP信号<sup>[12]</sup>。此外,骨折愈合的过程可以看作是软骨发生过程的重演,用腺病毒载体介导BMP-2在骨折部位过表达则促进了L-Sox5、Sox6、Sox9的表达及功能,加速了软骨发生和骨折愈合<sup>[13]</sup>。这些体内和体外的实验结果证实了BMP信号在软骨发生的起始阶段占有主导地位。

软骨原基形成后,BMP信号对于软骨原基的维持和继续发育同样不可或缺。BMPRIA和BMPRIB是介导BMP信号最为重要的两种BMP I型受体,BMPRIA、BMPRIB在软骨原基中的高表达提示它们对于此时的软骨原细胞具有重要作用<sup>[14]</sup>。以往的实验证明,在体内过表达激活型的CA-BMPRIA或CA-BMPRIB可以促进软骨原基的发育,而过表达显型负效的BMP型受体可以抑制软骨原基的发育<sup>[15]</sup>。Bmpr1b完全敲除小鼠缺少部分指骨,原因在于形成这些骨骼的软骨原基中的软骨原细胞增殖和分化受损,导致这些软骨原基最终消失所致。但Bmpr1b完全敲除小鼠的其他骨骼并没有受到明显的影响<sup>[16]</sup>。Bmpr1a完全敲除小鼠胚胎早期致死,在软骨细胞中特异性地敲除Bmpr1a,突变小鼠有较为轻微的软骨发育不良表型,但大部分骨骼的形成也没有受损。然而,在Bmpr1b完全敲除小鼠的软骨细胞中再特异性地敲除Bmpr1a之后,双敲除小鼠发生了十分严重的软骨发育不良表型,许多骨骼元件缺

损。研究者发现,Bmpr1a和Bmpr1b双缺失消除了基因冗余现象,较为完全地阻断了BMP信号,导致软骨原细胞增殖下降,凋亡增加,表达软骨特异性的胞外基质减少,最终使软骨原基的维持和发育严重受损,软骨内成骨完全缺失。在这些发育严重不良的软骨原基中,L-Sox5、Sox6、Sox9的表达是缺失的<sup>[14]</sup>,这些结果说明,在软骨原基维持和发育的阶段BMP信号依旧发挥着主导作用。

许多证据表明BMP信号可以通过参与调控MAPK、视黄酸(Retinoid acid, RA)、FGF、Wnt和Sonic hedgehog(Shh)信号通路来调节软骨发生。不同途径的MAPK信号通路对软骨发生具有完全相反的效应,即p38-MAPK通路促进软骨发生而ERK1/2-MAPK通路则相反<sup>[17]</sup>。RA信号通过下调p38-MAPK通路的活性,影响Sox9的表达和转录活性来使软骨原细胞维持在低分化状态,抑制软骨发生<sup>[18]</sup>;BMP信号可通过抑制与视黄酸合成有关的醛脱氢酶1家族,成员A2(Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2, Aldh1a2)的表达来抑制RA信号<sup>[19]</sup>。在软骨发生早期,FGF18通过抑制Noggin的表达来促进BMP通路的功能,促进软骨发生<sup>[20]</sup>。Wnt信号对软骨发生也具有双重作用,经典的Wnt/ $\beta$ -catenin信号抑制软骨发生,而非经典的calcium/ $\beta$ -catenin信号则促进软骨发生<sup>[21,22]</sup>。BMP-2通过激活p38-MAPK通路,下调经典的Wnt-7a/ $\beta$ -catenin信号,抑制了 $\beta$ -catenin诱导的Sox9的降解,从而促进软骨发生<sup>[23]</sup>。在躯干骨发生的过程中,脊索分泌Shh,诱导体节中胚层表达Nkx3.2,在BMP存在的情况下,促进Sox9的表达及活性,诱导体节的软骨发生并促进软骨细胞的增殖和存活<sup>[24]</sup>。

然而与BMP信号相比,TGF- $\beta$ 信号在软骨发生过程中的作用似乎不占主导。TGF- $\beta$ 型受体(Transforming growth factor, beta receptor, TGF $\beta$ R)也表达于早期的软骨原基,然而有意思的是,Tgf $\beta$ r2基因敲除的间充质细胞在体外形成软骨结节的能力反而增强了;在软骨细胞或肢芽中敲除Tgf $\beta$ r2都没有影响早期的软骨内成骨过程,只是导致了出生后小鼠四肢的短小和部分指骨的融合,以及部分颅底骨和椎骨的发育延迟<sup>[25,26]</sup>。以上最近的研究成果证明,BMP信号在软骨发生过程中始终发挥着主导作用。

## 2 TGF- $\beta$ 超家族与生长板发育

软骨发生之后,软骨细胞定向排列,有序增殖

和分化形成生长板。这一阶段对于骨骼充分发育成完整的有功能的器官十分重要。与软骨原基相比,生长板软骨中的软骨细胞类型增多,软骨细胞的成熟分化对于骨组织的生长起支配作用。TGF- $\beta$ 超家族对于生长板的发育成熟同样发挥很重要的作用。BMP信号倾向于诱导软骨细胞分化成熟。在细胞培养中加入BMP-6和BMP-7可以促进软骨细胞表达肥大分化的标志分子 10 型胶原(Type X collagen, ColX)<sup>[27, 28]</sup>。加入BMP-2也可以促进培养的软骨细胞表达成熟的标志分子ColX、Ihh、甲状腺素/甲状旁腺激素相关多肽受体(PTH/PTHrP receptor, PPR)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)<sup>[29]</sup>。在生长板内, BMP-6是肥大软骨细胞的自分泌信号分子,调节肥大软骨细胞自身的成熟分化<sup>[30]</sup>。在软骨细胞内表达激活型的BMP受体CA-ALK1、2、3、6都促进了软骨细胞成熟<sup>[29]</sup>。在转基因小鼠的软骨中过表达激活型的CA-BMPRIA促进了生长板增殖软骨细胞向肥大软骨细胞分化<sup>[31]</sup>,过表达Noggin则很大程度上使肥大分化停滞<sup>[32]</sup>。另外在体内过表达TSG也抑制了软骨细胞表达ColX<sup>[33]</sup>。但也有一些实验结果得出矛盾的结论,如在鸡胚中过表达BMP-2和BMP-4却抑制了软骨细胞的肥大分化;在小鼠幼肢培养中过表达Noggin促进了肥大分化<sup>[34, 35]</sup>。这种结果很可能是由于各种BMP激活不同受体和下游通路的能力不同所造成的,因为有研究证明, BMP-2激活的ERK1/2通路与p38通路在调节软骨细胞肥大分化上的效应相反<sup>[36]</sup>。由Smads通路介导的BMP信号则是促进软骨细胞成熟的。Smad1、5、8特异性地传递BMP信号,在软骨细胞中过表达Smad1、5、8能促进软骨细胞成熟<sup>[29]</sup>,而抑制型Smad6能抑制BMP信号,抑制软骨细胞成熟<sup>[37]</sup>。Smurf1能与Smad6相互作用并导致Runt domain transcription factor 2(Runx2)的降解,并可能通过这种方式抑制软骨细胞的成熟<sup>[38]</sup>。Horiki等<sup>[39]</sup>提供体内证据证实Smad6能与Smurf1协同抑制BMP信号,抑制软骨细胞的肥大分化。这些体内体外的实验结果都证实了BMP信号诱导软骨细胞成熟分化的作用。

TGF- $\beta$ 信号则抑制软骨细胞的成熟分化。向培养的软骨细胞和跖骨加入TGF- $\beta$ 均抑制了软骨细胞的肥大分化<sup>[40, 41]</sup>。潜活相关的TGF- $\beta$ 结合蛋白(Latent TGF- $\beta$  binding protein, LTBP)能与TGF- $\beta$ 作用,促进TGF- $\beta$ 的分泌和提高其生物利用度, *Ltbp-3*敲除导致TGF- $\beta$ 信号通路减弱,软骨肥大分化提

<sup>[42]</sup>。Smad2和Smad3特异性地传递TGF- $\beta$ 信号,由Smads通路介导的TGF- $\beta$ 信号在软骨成熟分化中的作用被基因敲除实验加以确证。*Smad2*完全敲除的小鼠胚胎早期致死,*Smad3*完全敲除小鼠出生后可以存活,其生长板及关节软骨肥大分化加速,说明TGF- $\beta$ 信号确能抑制软骨细胞的肥大和矿化,维持适当数量的未分化软骨细胞<sup>[43]</sup>。Smurf2降解Smad2和Smad3,在生长板中高表达于增殖区,低表达于肥大区,在软骨细胞中过表达Smurf2促进了软骨细胞的肥大分化<sup>[44]</sup>。这些结果证明TGF- $\beta$ 信号对于软骨细胞的成熟分化具有和BMP信号相反的作用。

Smads通路介导的TGF- $\beta$ 超家族信号通路在出生后的生长板软骨发育过程中占据重要作用。*Smad4*作为通用型Smad,是TGF- $\beta$ 信号和BMP信号的枢纽,它在软骨细胞中的敲除似乎可以阐明整个TGF- $\beta$ 超家族信号在软骨内成骨过程中的作用。软骨细胞缺失*Smad4*虽然没有影响早期软骨发生,但严重影响了出生后软骨细胞的分化:静息软骨细胞分化为增殖软骨细胞受阻,肥大分化提前,增殖下降。另外,我们还发现*Smad4*基因敲除的生长板内,软骨细胞的分化方向极度紊乱,导致严重的骨骼发育畸形,这说明TGF- $\beta$ 超家族信号分子可以作为形态发生素调控生长板的有序分化和生长,而且这一作用可能独立于PTHrP<sup>[45]</sup>。

### 3 TGF- $\beta$ 超家族与关节软骨维持

随着软骨内成骨过程的终结,生长板消失,骨骼停止生长,而关节软骨细胞必须终生维持未分化的状态并保持良好的胞外基质分泌功能才能保证关节的灵活运转。关节软骨还必须抵御各种各样的损伤因素,如压力、创伤、炎症、异常代谢等,并自身调整建立新的平衡,修复受损的关节软骨,否则将导致关节软骨的消耗和侵蚀,引起关节炎。TGF- $\beta$ 超家族各成员,尤其是表达于关节软骨细胞中的BMP-2、4、GDF5、6、7、Noggin、TSG、chordin、chordin-like protein、BMPRIA、BMPRIIB等分子,均有可能在关节软骨的维持中发挥重要作用<sup>[16, 33, 46~50]</sup>。

TGF- $\beta$ 信号对于维持关节软骨具有很重要的作用。TGF- $\beta$ 信号能维持软骨细胞处于未分化状态,抑制肥大分化,因此相对BMP信号,TGF- $\beta$ 信号维持关节软骨的作用更容易理解。TGF- $\beta$ 的表达和功能随着年龄在关节软骨中逐渐衰退<sup>[51]</sup>。TGF- $\beta$ 分子确实有望作为药物治疗人类骨关节炎<sup>[40]</sup>。*Ltbp-3*敲除导

致软骨细胞内TGF- $\beta$ 信号减弱, 软骨肥大分化提前, 小鼠关节软骨发生了骨化<sup>[42]</sup>。Smad3 完全敲除小鼠和TGFB2 胞浆区缺失的转基因小鼠中, 由于TGF- $\beta$ 信号缺失, 导致关节软骨肥大分化并被骨组织替代, 发生与人类十分类似的骨关节炎表型<sup>[43, 52]</sup>。我们在32例临床骨关节炎患者中发现1名患者SMAD3 基因发生错义突变, 且该患者血清中的MMP-2, MMP-9 活性高于其他骨关节炎和对照患者, 这表明SMAD3 基因变异与骨关节炎发生有一定关系<sup>[53]</sup>。体外实验发现白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )这些关节炎相关的炎症细胞因子能抑制关节软骨细胞中TGF- $\beta$ 信号的功能, TGF- $\beta$ 的应用则可以对抗IL-1 诱发的关节损伤, 提示TGF- $\beta$ 信号在骨关节炎疾病进程中的联系<sup>[54, 55]</sup>。还有研究发现, TGF- $\beta$ 可抑制软骨细胞胶原的降解, 促进蛋白多糖的合成<sup>[40]</sup>; TGF- $\beta$ 还可通过抑制可降解软骨基质的各类组织蛋白酶的表达来保护软骨, 如可通过PI3K/Akt通路诱导基质金属蛋白酶组织抑制因子(Tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP)的表达来抑制关节软骨的降解<sup>[56]</sup>。这些都有可能是TGF- $\beta$ 信号抑制关节炎发生的机制。

一般来说, BMP信号能诱导软骨细胞的肥大分化, 因此, BMP信号对于关节软骨的维持可能起负面作用, 但事实是, BMP信号对于关节软骨的维持同样不可或缺。关节软骨的损伤修复需要充足的BMP信号; IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 能诱导培养的软骨细胞系和人类骨关节炎软骨细胞表达BMP-2, 使已经受损的关节软骨发生重塑和修复。BMP-6 也具有同样的效应<sup>[50, 57, 58]</sup>。最近的研究发现BMP-13 持续表达在出生后小鼠的关节软骨中, 且在软骨细胞中过表达BMP-13, 能使软骨细胞维持在未分化的状态, 不发生肥大分化<sup>[59]</sup>。用Gdf5-Cre在关节软骨中敲除Bmpr1a, 成年后的基因敲除小鼠关节软骨发生肥大分化, 滑膜肥大并侵入关节腔, 导致明显的骨关节炎表型<sup>[46]</sup>。最近发现低氧是维持关节软骨的一个重要因素, 在关节软骨中Gdf10 既受低氧诱导, 也受Sox9 调节, 暗示了它在关节维持中可能起作用<sup>[60]</sup>。BMP-2 可通过PI3K/Akt激活NF- $\kappa$ B从而抑制软骨细胞的凋亡, 这也有可能是BMP信号维持关节软骨的机制<sup>[61]</sup>。

## 4 结 语

从软骨发生, 生长板发育到形成永久性的关节

软骨, TGF- $\beta$ 超家族信号的作用贯穿始终, 它的重要地位是其他信号分子所不可替代的。与几年前相比, 由于转基因和基因打靶、基因芯片、RNA 干涉等新手段和新技术的发展和应用, 人们对 TGF- $\beta$ 超家族调节骨骼发育的生理功能的认识上升到一个新的层面。大量有说服力的证据正在试图阐明 TGF- $\beta$ 超家族信号在软骨发生、发育和维持中的作用和机制。但 TGF- $\beta$ 超家族的组成庞大, 相互之间的关系甚为复杂, 新的研究方法的巧妙应用可以帮助我们更详尽地认识它与软骨细胞发育和功能的关系。和其他研究手段相比, 基因打靶仍然是最有说服力的工具。不久的将来, 将有更多 TGF- $\beta$  家族成员的基因打靶或条件基因打靶小鼠问世, 结合新的细胞特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠、可诱导表达 Cre 重组酶转基因小鼠的研制, 将帮助我们在生理条件下深入研究 TGF- $\beta$ 信号通路调节软骨内成骨的功能和机制, 促进对软骨发育不良、骨关节炎等相关疾病分子机理的理解和认识, 为这些疾病的预防、诊断和治疗提供新的线索。

## 参考文献(References):

- [1] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, 2002, 2(4): 389–406. [\[DOI\]](#)
- [2] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003, 423(6937): 332–336. [\[DOI\]](#)
- [3] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003, 425(6958): 577–584. [\[DOI\]](#)
- [4] Gazzo E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord*, 2006, 7(1-2): 51–65. [\[DOI\]](#)
- [5] Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*, 2003, 423(6937): 343–348. [\[DOI\]](#)
- [6] Haas AR, Tuan RS. Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of N-cadherin expression and function. *Differentiation*, 1999, 64(2): 77–89. [\[DOI\]](#)
- [7] Pizette S, Niswander L. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol*, 2000, 219(2): 237–249. [\[DOI\]](#)
- [8] Capdevila J, Johnson RL. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev Biol*, 1998, 197(2): 205–217. [\[DOI\]](#)
- [9] Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, Chung UI. Distinct roles of Sox5,

- Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23(5): 337–340. [\[DOI\]](#)
- [10] Barna M, Niswander L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell*, 2007, 12(6): 931–941. [\[DOI\]](#)
- [11] Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol*, 2001, 189(3): 275–284. [\[DOI\]](#)
- [12] Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, Merino R, Hurler JM. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol*, 2003, 257(2): 292–301. [\[DOI\]](#)
- [13] Uusitalo H, Hiltunen A, Ahonen M, Gao TJ, Lefebvre V, Harley V, Kahari VM, Vuorio E. Accelerated up-regulation of L-Sox5, Sox6, and Sox9 by BMP-2 gene transfer during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(10): 1837–1845. [\[DOI\]](#)
- [14] Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(14): 5062–5067. [\[DOI\]](#)
- [15] Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 2004, 93(1): 93–103. [\[DOI\]](#)
- [16] Yi SE, Daluiski A, Pederson R, Rosen V, Lyons KM. The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development (Cambridge, England)*, 2000, 127(3): 621–630.
- [17] Stanton LA, Underhill TM, Beier F. MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev Biol*, 2003, 263(2): 165–175. [\[DOI\]](#)
- [18] Hoffman LM, Weston AD, Underhill TM. Molecular mechanisms regulating chondroblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A Suppl 2: 124–132.
- [19] Hoffman LM, Garcha K, Karamboulas K, Cowan MF, Drysdale LM, Horton WA, Underhill TM. BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling. *J Cell Biol*, 2006, 174(1): 101–113. [\[DOI\]](#)
- [20] Reinhold MI, Abe M, Kapadia RM, Liao Z, Naski MC. FGF18 represses noggin expression and is induced by calcineurin. *J Biol Chem*, 2004, 279(37): 38209–38219. [\[DOI\]](#)
- [21] Kolpakova E, Olsen BR. Wnt/beta-catenin-a canonical tale of cell-fate choice in the vertebrate skeleton. *Dev Cell*, 2005, 8(5): 626–627. [\[DOI\]](#)
- [22] Yates KE, Shortkroff S, Reish RG. Wnt influence on chondrocyte differentiation and cartilage function. *DNA Cell Biol*, 2005, 24(7): 446–457. [\[DOI\]](#)
- [23] Jin EJ, Lee SY, Choi YA, Jung JC, Bang OS, Kang SS. BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway. *Mol Cells*, 2006, 22(3): 353–359.
- [24] Zeng L, Kempf H, Murtaugh LC, Sato ME, Lassar AB. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev*, 2002, 16(15): 1990–2005. [\[DOI\]](#)
- [25] Seo HS, Serra R. Deletion of Tgfb2 in Prx1-cre expressing mesenchyme results in defects in development of the long bones and joints. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 304–316. [\[DOI\]](#)
- [26] Baffi MO, Slattery E, Sohn P, Moses HL, Chytil A, Serra R. Conditional deletion of the TGF-beta type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones. *Dev Biol*, 2004, 276(1): 124–142. [\[DOI\]](#)
- [27] Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Mukudai Y, Kawakami Y, Nohno T, Higuchi Y, Takemoto S, Ohuchi H, Noji S, Kurisu K. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol*, 1998, 140(2): 409–418. [\[DOI\]](#)
- [28] Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *J Orthop Res*, 2001, 19(1): 18–25. [\[DOI\]](#)
- [29] Valcourt U, Gouttenoire J, Moustakas A, Herbage D, Mallein-Gerin F. Functions of transforming growth factor-beta family type I receptors and Smad proteins in the hypertrophic maturation and osteoblastic differentiation of chondrocytes. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 33545–33558. [\[DOI\]](#)
- [30] Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(4): 475–482. [\[DOI\]](#)
- [31] Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(50): 18023–18027. [\[DOI\]](#)
- [32] Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T, Yoshikawa H. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(5): 898–906. [\[DOI\]](#)
- [33] Schmidl M, Adam N, Surmann-Schmitt C, Hattori T, Stock M, Dietz U, de Crombrughe B, Poschl E, von der Mark K. Twisted gastrulation modulates bone morphogenetic protein-induced collagen II and X expression in chondrocytes *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 2006, 281(42): 31790–31800. [\[DOI\]](#)
- [34] Duprez D, Bell EJ, Richardson MK, Archer CW, Wolpert L, Brickell PM, Francis-West PH. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev*, 1996, 57(2): 145–157. [\[DOI\]](#)
- [35] Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 2001, 128(22): 4523–4534.
- [36] Reilly GC, Golden EB, Grasso-Knight G, Leboy PS. Differential effects of ERK and p38 signaling in BMP-2

- stimulated hypertrophy of cultured chick sternal chondrocytes. *Cell Commun Signal*, 2005, 3(1): 3. [\[DOI\]](#)
- [37] Li X, Ionescu AM, Schwarz EM, Zhang X, Drissi H, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ, O'Keefe RJ. Smad6 is induced by BMP-2 and modulates chondrocyte differentiation. *J Orthop Res*, 2003, 21(5): 908–913. [\[DOI\]](#)
- [38] Shen R, Chen M, Wang YJ, Kaneki H, Xing L, O'Keefe R J, Chen D. Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3569–3576. [\[DOI\]](#)
- [39] Horiki M, Imamura T, Okamoto M, Hayashi M, Murai J, Myoui A, Ochi T, Miyazono K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol*, 2004, 165(3): 433–445. [\[DOI\]](#)
- [40] Tchetina EV, Antoniou J, Tanzer M, Zukor DJ, Poole AR. Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol*, 2006, 168(1): 131–140. [\[DOI\]](#)
- [41] Alvarez J, Horton J, Sohn P, Serra R. The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. *Dev Dyn*, 2001, 221(3): 311–321. [\[DOI\]](#)
- [42] Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Zambuto L, Obata H, Rifkin DB. Bone defects in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF-beta presentation. *J Endocrinol*, 2002, 175(1): 129–141. [\[DOI\]](#)
- [43] Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol*, 2001, 153(1): 35–46. [\[DOI\]](#)
- [44] Wu Q, Wang M, Zuscik MJ, Chen D, O'Keefe RJ, Rosier RN. Regulation of embryonic endochondral ossification by Smurf2. *J Orthop Res*, 2008.
- [45] Zhang J, Tan X, Li W, Wang Y, Wang J, Cheng X, Yang X. Smad4 is required for the normal organization of the cartilage growth plate. *Dev Biol*, 2005, 284(2): 311–322. [\[DOI\]](#)
- [46] Rountree RB, Schoor M, Chen H, Marks ME, Harley V, Mishina Y, Kingsley DM. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol*, 2004, 2(11): e355. [\[DOI\]](#)
- [47] Settle SH Jr, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol*, 2003, 254(1): 116–130. [\[DOI\]](#)
- [48] Nakayama N, Han CY, Cam L, Lee JJ, Pretorius J, Fisher S, Rosenfeld R, Scully S, Nishinakamura R, Duryea D, Van G, Bolon B, Yokota T, Zhang K. A novel chordin-like BMP inhibitor, CHL2, expressed preferentially in chondrocytes of developing cartilage and osteoarthritic joint cartilage. *Development (Cambridge, England)*, 2004, 131(1): 229–240.
- [49] Zhang D, Ferguson CM, O'Keefe RJ, Puzas JE, Rosier RN, Reynolds PR. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(2): 293–300. [\[DOI\]](#)
- [50] Lories RJ, Daans M, Derese I, Matthys P, Kasran A, Tylzanowski P, Ceuppens JL, Luyten FP. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(6): 1736–1746. [\[DOI\]](#)
- [51] Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(6): R1338–1347. [\[DOI\]](#)
- [52] Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL. Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol*, 1997, 139(2): 541–552. [\[DOI\]](#)
- [53] Yao JY, Wang Y, An J, Mao CM, Hou N, Lv YX, Wang YL, Cui F, Huang M, Yang X. Mutation analysis of the *Smad3* gene in human osteoarthritis. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11(9): 714–717. [\[DOI\]](#)
- [54] Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, 15(12): 1367–1377. [\[DOI\]](#)
- [55] Lum ZP, Hakala BE, Mort JS, Recklies AD. Modulation of the catabolic effects of interleukin-1 beta on human articular chondrocytes by transforming growth factor-beta. *J Cel Physiol*, 1996, 166(2): 351–359. [\[DOI\]](#)
- [56] Qureshi HY, Ahmad R, Sylvester J, Zafarullah M. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in human chondrocytes. *Cell Signal*, 2007, 19(8): 1643–1651. [\[DOI\]](#)
- [57] Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A Suppl 3: 59–66.
- [58] Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis *in vitro*. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(9): 2501–2508. [\[DOI\]](#)
- [59] Nochi H, Sung JH, Lou J, Adkisson HD, Maloney WJ, Hruska KA. Adenovirus mediated *BMP-13* gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(1): 111–122. [\[DOI\]](#)
- [60] Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, Murphy CL. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4778–4786. [\[DOI\]](#)
- [61] Sugimori K, Matsui K, Motomura H, Tokoro T, Wang J, Higa S, Kimura T, Kitajima I. BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23(6): 411–419. [\[DOI\]](#)