

转录因子 Sox9 调控软骨发育的研究进展

唐君仪 周冠楠 谢志芳

骨的发育主要有膜内成骨和软骨内成骨两种形式,其中软骨内成骨是体内大部分骨骼包括四肢骨、脊椎骨、颅底骨和一部分锁骨的发育形式。软骨内成骨包括软骨发生和生长板发育阶段。在软骨发生阶段,间充质干细胞分化为软骨细胞形成软骨原基。软骨原基是未来骨骼的雏形,原基内的软骨细胞有序分化、增殖和排列形成典型的生长板结构。软骨生长板在结构上包含4个分区:即静息区、增殖区、前肥大区和肥大区。静息区软骨细胞体积小呈圆形,细胞排列紧密,增殖少而且分化不成熟,表达Ⅱ型胶原蛋白(Col2a1)。增殖区软骨细胞分裂旺盛,细胞扁平呈柱状排列。前肥大区为软骨细胞由增殖区向肥大区的过渡阶段。肥大区软骨细胞停止增殖进入终末分化阶段,细胞体积变大分泌一些特定的软骨基质如X型胶原蛋白(ColX)等。终末分化的软骨细胞最后发生生理性死亡,同时伴有成骨细胞、破骨细胞和血管侵入,成骨细胞分泌的骨基质最终取代软骨基质实现骨化。一系列的研究表明软骨内成骨受到多因素、多层次严格有序的调控,如全身性的生长激素和甲状腺素;软骨细胞分泌的 Wnts、BMP、FGF、IGF 和 *lhh* - PTHrP 等信号^[1]。这些信号通过激活多种转录因子启动一系列基因表达,最终使软骨内成骨协调有序进行。近年来的研究表明,转录因子 Sox9 参与调控软骨内成骨的多个阶段的发育过程,包括软骨发生、生长板内软骨细胞的成熟、肥大等过程,本文就 Sox9 基因调控软骨发育的最新研究进展进行综述。

一、Sox9 蛋白在软骨发育过程中的表达特征

Sox9 是 SRY 相关基因家族中的转录因子。人类的 Sox9 基因位于染色体 17q 上, cDNA 全长约为 2.2kb, 编码 509 个氨基酸。而小鼠的 Sox9 基因位于 11 号染色体上, 小鼠 Sox9 cDNA 全长约 2.2kb, 编码 507 个氨基酸, 与人的 Sox9 蛋白同源性达 96%。Sox9 蛋白的 N 端含有一个能与 DNA 结合的 HMG -

box (SRY - related high - mobility group box), 在其 C 端含有一段富含脯氨酸、谷氨酰胺和丝氨酸的转录激活区域。原位杂交技术显示 Sox9 mRNA 在小鼠软骨发生阶段(胚胎 E9 ~ 13 天)高表达于凝缩的间充质干细胞以及分化的软骨细胞。在软骨的生长板发育阶段(E14 天后), 在生长板的静息区、增殖区和前肥大区软骨细胞中可以检测到高表达的 Sox9 mRNA 和蛋白。而肥大区就几乎检测不到其 mRNA 表达, 但通过免疫组化还能检测到微弱的蛋白表达, 但终末分化的肥大软骨细胞则完全不表达^[2]。

二、Sox9 在软骨发生中的作用

Sox9 在软骨发生和发育过程中极其重要, 被认为是软骨发生的“主调控因子”。大量研究表明人类 Sox9 单个等位基因的突变可以导致全身骨骼发育不良及性别反转综合征 (campomelic dysplasia)。用人工嵌合体小鼠和畸胎瘤实验体系证明 Sox9 基因纯合缺陷的胚胎干细胞无法发育分化成软骨细胞, 而 Sox9 杂合基因敲除小鼠则表现为严重骨骼发育不良和胚胎致死现象^[3]。

在软骨发生过程中, 间充质干细胞必须先凝集形成原基, 然后分化为软骨细胞, 表达软骨特有的分子如: Col2a1、Col11a2、Aggrecan 等。利用条件基因敲除研究手段使 Sox9 基因在间充质干细胞凝集前的肢芽中缺失, 导致四肢软骨和骨的完全缺失。而在间充质干细胞凝集阶段 Sox9 基因的缺失则导致严重软骨发育障碍, 大部分间充质细胞停留在凝集阶段, 不能分化成软骨细胞。说明在软骨发生过程中, Sox9 参与了间充质干细胞的凝集以及其后的分化过程^[4]。研究表明 Sox9 蛋白与 L - Sox5 和 Sox6 形成复合物直接激活 Col2a1、Aggrecans 和 Col11a2 等软骨特异性分子的转录, 促使间充质干细胞向软骨细胞方向分化^[5]。近年来, Sox9 还被发现能通过激活 microRNA miR - 140 在软骨细胞中的特异性表达而调控软骨细胞的增殖^[6]。另一方面, Sox9 调控软骨发生和分化的分子机制还与其能促进 β - catenin 和 Runx2 的降解有关^[7,8]。前者是 Wnt 信号通路中的重要分子, 而后者是成骨细胞及软骨细胞发育中重要转录因子。

基金项目:第二军医大学大学生创新基金资助项目(ZD2012031)

作者单位:200433 上海,第二军医大学研究生管理大队(唐君仪、周冠楠);第二军医大学基础部细胞生物学教研室(谢志芳)

通讯作者:谢志芳,电子邮箱:xiezf@smmu.edu.cn

三、Sox9 在软骨生长板发育阶段的生物学作用

Sox9 除了调控软骨的发生,在软骨生长板发育阶段也具有重要的生物学作用。将 Sox9 基因选择性地幼稚的圆形软骨细胞中敲除后导致其 Col2a1 表达低下和凋亡,说明 Sox9 对这些软骨细胞的分化状态的维持和生存必不可少^[9]。此外,Sox9 对软骨细胞的成熟与肥大也具有重要的调控作用。将邻近肥大区的数层扁平软骨细胞中的 Sox9 敲除后会导致细胞在未肥大的状态下直接进入终末分化阶段并凋亡,提示 Sox9 参与调控软骨细胞的肥大与成熟过程。其分子机制可能与 Sox9 激活 PI₃KCA 的表达,从而促使其下游的 AKT 磷酸化有关^[9]。进一步的研究表明,Sox9 可以结合 ColX 基因的启动子直接激活该基因的表达,而 ColX 是肥大软骨细胞特异性表达的分子。因此,Sox9 也是软骨细胞肥大所必须的^[2]。

在小鼠出生后将 Sox9 基因在软骨细胞中敲除会引起软骨增殖能力下降、凋亡增加,而且出现去分化现象,表现为软骨细胞分泌的硫酸蛋白多糖和 Aggrecan 迅速减少,但 Col2a1 仍然表达,该小鼠会发生椎间盘压缩并退化,但不会产生关节炎。这些结果提示 Sox9 同样是维持出生后软骨细胞的分化状态所必须的^[10]。以上研究结果均基于 Sox9 基因在软骨发育不同阶段缺失后的表型分析。而过表达模型研究中发现 Sox9 在软骨细胞中过表达后也可抑制软骨细胞的肥大、延缓其终末分化以及其后的骨化过程^[11]。这提示 Sox9 的表达量必须维持在适当的范围内,过高或过低均会影响软骨细胞的进一步成熟。

生理条件下终末分化的肥大软骨细胞完全不表达 Sox9。这些终末分化的肥大软骨细胞会分泌 VEGF α (血管内皮生长因子 α),诱导新生血管的侵入,这对成骨是至关重要的。在肥大软骨细胞中特异性过表达 Sox9 不仅会影响其终末分化,还会影响骨化过程中血管的侵入,导致第一成骨中心的发育延缓和新生小鼠四肢骨的短小与骨髓形成延缓。这是由于 Sox9 蛋白能够结合 VEGF α 基因的第一外显子的 SRY 位点而直接抑制其转录^[12]。

四、Sox9 转录活性的调控机制

近年来的研究表明,Sox9 的转录活性受到多种转录激活因子和抑制因子的精确调控。在软骨发生过程中,Sox9 能上调 L-Sox5 和 Sox6 的表达,并必须与 L-Sox5/Sox6 形成复合物才能高效转录 Col2a1 和 Aggrecan^[4]。L-Sox5/Sox6 能与编码 Col2a1 和 Aggrecan 的基因的上游序列结合,保护 Sox9 与增强子

的结合而大大增强其转录激活能力^[5]。除了需要 L-Sox5 和 Sox6 外,Sox9 的转录活性还受其他共激活因子的调控。主要包括 Tip60、PGC-1、CBP/p300、Arid5a、转录因子 znf219、P54nrb 等^[13-16]。其中 Tip60 能与 Sox9 共结合于增强子区,可能通过改变染色质结构来增强 Sox9 的转录活性^[13]。Arid5a 能与 Col2a1 的启动子区结合,刺激该区域的组蛋白 3 的乙酰化,从而增强 Sox9 的转录激活作用^[16]。P54nrb 能偶联 Sox9 对 Col2a1 的转录激活与转录后 mRNA 的剪切。另外,转录因子 Twist1 能与 Sox9 的 HMG-box 结合抑制其转录活性^[17]。

除了上述转录共激活因子和抑制因子外,Sox9 的转录活性还受到其自身蛋白的修饰影响。如:蛋白激酶 A 能磷酸化 Sox9 而加强其与 DNA 的结合能力从而增强其转录活性。Sox9 被 SUMO 化修饰后导致其在细胞核内的亚分布改变,转录活性增强。这些研究表明,在软骨发生过程中 Sox9 的转录活性受到精确的调控。

五、展 望

综上所述,Sox9 不仅作为“主调控因子”在软骨发生过程中其关键作用,而且参与调控生长板内软骨细胞的分化状态维持、软骨细胞成熟和肥大等多个相关过程,其转录活性受到多种转录激活因子和抑制因子以及自身蛋白修饰的精确调控。然而,目前对 Sox9 基因表达的上游调控机制尚不明确,深入研究其表达激活调控机制将对揭示软骨发育分子机制具有重要意义。

参考文献

- Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(1):a008334
- Dy P, Wang W, Bhattaram P, et al. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes[J]. Dev Cell, 2012, 22(3):597-609
- Akiyama H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9[J]. Mod Rheumatol, 2008, 18(3):213-219
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J]. Genes Dev, 2002, 16(21):2813-2828
- Han Y, Lefebvre V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(16):4999-5013
- Yamashita S, Miyaki S, Kato Y, et al. L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity[J]. J Biol Chem, 2012, 287(26):22206-22215

(下转第 164 页)