

HDAC4 通过成骨作用参与骨愈合的研究进展

陆一凤 徐家宁 唐 昊

摘要 临床上骨折愈合以软骨内成骨和膜内成骨联合进行,新生的成骨细胞通过软骨细胞为中介形成或直接由募集的骨髓间充质干细胞分化而来。组蛋白去乙酰化酶 4(recombinant histone deacetylase 4,HDAC4)通过调控软骨内成骨和膜内成骨中关键基因 Runx2 和 MEF2 调节软骨细胞肥大增生和成骨分化。通过抑制 HDAC4 活性的微小 RNA(miRNA)能有效促进骨髓干细胞的成骨分化和软骨细胞肥大。基于以上组蛋白去乙酰化酶 4 抑制剂有望成为促进骨折愈合的新药。本文总结了 HDAC4 及作用于 HDAC4 的微小 RNA 在软骨内成骨、成骨分化中作用的研究。

关键词 骨折愈合 组蛋白去乙酰化酶 4 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 软骨内成骨 膜内成骨

中图分类号 R68 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.10.004

伴随着社会老龄化的加剧,骨折的发生人数逐年增加。大多数的骨折患者能正常愈合,但仍有 5%~10% 的骨折患者出现骨折延时愈合甚至骨不愈合,给患者带来痛苦的同时还增加额外的经济负担^[1,2]。通过促进骨折愈合的治疗方式能有效减低骨折愈合并发症的发生,同时也是治疗骨不连的有效手段。目前临床已应用的促进骨折愈合的方法包括骨移植、物理辅助疗法、使用促进成骨的生长因子和某些激素等^[3]。但是这些治疗手段也有一定局限性:骨移植可能增加手术感染和排异风险;物理辅助治疗时间久、效果不确切;活性因子和激素价格昂贵。通过认识骨折愈合的方式和分子机制,探索新的促进骨折愈合手段依然是研究热点。通过增强细胞募集、促进成骨细胞形成、促进血管侵袭是加速骨折愈合的关键靶点^[4]。HDAC4 作为已知的能同时促进软骨细胞增生肥大及成骨细胞分化的关键靶点,目前鲜有文献明确支持 HDAC4 在骨折愈合中的作用。

一、骨折愈合的机制与组蛋白去乙酰化酶 4

1. 骨折愈合:骨折愈合的方式包括:软骨内成骨和膜内成骨。膜内成骨见于骨折断端之间稳定时,新生的成骨细胞直接由骨髓干细胞分化;软骨内成骨见于不稳定的骨折,骨髓干细胞首先分化成软骨细胞,形成质地较软的软骨痂临时稳定骨折断端,随后软骨细胞增生肥大转化为成骨细胞、软骨基质被坚硬骨基质替代逐渐形成新骨。

从理论上讲,解剖复位且坚强固定的骨折,通过膜内成骨愈合,而在一些粉碎性、骨折断端复位欠佳、难以作到坚强固定的骨折中需要通过软内成骨来实现骨愈合。在现实中,即使在最简单的骨折中,也存在一定程度的软骨内成骨。同样,即使是大范围移位骨折,复位也有膜内成骨区域^[5]。因此可以认为临床上大多数骨折会介于这两个骨折愈合极端之间,结合膜内成骨和软骨内成骨。

软骨细胞在骨折愈合中发挥着至关重要的作用,在提供生物力学支持的同时软骨细胞能诱导新生血管形成和骨化^[6]。肥大前软骨细胞产生 II 型胶原蛋白作为细胞外基质^[7]。骨折部位的软骨细胞增殖和 II 型胶原基质的产生能降低断端之间的应力,使骨折愈合能够进行^[5]。

当骨折断端间张力达到骨折愈合所需的条件时,肥大前软骨细胞开始肥大,随后产生细胞因子和生长因子促进新生血管侵入和骨化。近年来文献提出,这些细胞释放含有碱性磷酸酶、纳米羟基磷灰石的囊泡。囊泡内容物能与 X 型胶原蛋白一起促进骨骼重要前体 II 型胶原蛋白钙化;还含有高浓度的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2),分别促进血管生成和成骨生成^[8]。

成骨细胞是主要的骨形成细胞,在植入软的愈合组织时,与血管内皮细胞相互作用。在成骨微环境中,成骨细胞会产生 I 型胶原蛋白、羟基磷灰石、BMP-2 和额外的 VEGF,通过促进 I 型胶原蛋白上的微羟基磷灰石沉积,从而促进进一步的血管重建并继续骨化^[9]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82172431)

作者单位:200433 上海,海军军医大学第一附属医院

通信作者:唐昊,副主任医师,硕士生导师,电子信箱:tanghao1978@

163.com

因此软骨细胞增殖肥大和骨髓间充质干细胞成骨分化在骨折愈合中起到重要作用,这两个过程都受到多种因素调节,HDAC4 是其中一个作用因素。

2. 组蛋白去乙酰化酶 4: 组蛋白去乙酰化酶家族主要通过控制组蛋白乙酰化来调节染色质重塑和基因转录。根据基因的同源性,目前把组蛋白去乙酰化酶分为 4 个大类^[10]。

HDAC4 (histone deacetylase 4) 作为 II a 类的组蛋白去乙酰化酶,主要存在于细胞质之间,它可以通过磷酸化状态的改变、与辅助因子的协作和在细胞质和细胞核之间的转移来进行功能调控。相较于其他 HDACs,HDAC4 本身组蛋白去乙酰化酶作用较弱,但能通过与其他组蛋白去乙酰化酶相互作用来增强自身酶的活性,比如:与 HDAC3 和 HDAC5 相互作用^[11]。同时 HDAC4 具有非组蛋白去乙酰化酶作用,通过使组蛋白甲基化来调节基因转录^[12]。此外,HDAC4 可以通过与多种转录因子相互作用来调节基因转录,这些因子包括 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、心肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2)、血清反应因子、异染色质蛋白 1、核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 和激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)^[13]。HDAC4 可以通过组蛋白去乙酰化酶、非组蛋白去乙酰化酶和体内某些关键转录因子的表达参与许多生理和病理过程。

HDAC4 在分化成熟的成骨细胞和增生前的软骨细胞中高度表达^[14]。HDAC4 通过对软骨肥大关键转录因子的表达和核质不同的位置来影响软骨细胞肥大同时 HDAC4 能够抑制成骨分化过程中关键转录因子 Runx2 表达抑制成骨分化。因此 HDAC4 有望成为促进骨折愈合的有效靶点。

二、HDAC4 对软骨内成骨的影响

目前认为在软骨内成骨中新生的骨细胞来源与间充质干细胞分化的软骨细胞转化而来,在这一过程中软骨细胞的肥大是血管侵袭、成骨分化和软骨内成骨的关键步骤。在增生前软骨细胞中高度表达的 HDAC4,通过对软骨肥大关键转录因子的表达和核质不同的位置来影响软骨细胞肥大,从而影响骨愈合的发展。

在软骨内成骨过程中,软骨细胞肥大受到多种细胞因子的影响。目前被广泛认识的有关因子包括刺猬因子 (indian hedgehog signaling molecule, IHH)、甲状旁腺激素相关蛋白、X 型胶原、基质金属蛋白酶 13

(matrix metalloproteinase 13, MMP13)、VEGF、Runx2 和肌细胞特异性增强因子 2C (myocyte enhancer factor 2C, MeF2C)^[15]。HDAC4 主要通过抑制 MEF2C 和 Runx2 的功能抑制软骨内成骨,进而影响骨的发育及愈合^[16]。

MeF2C 是作为 MeF2 的亚型之一,可以通过调节 Col-X、Runx2、IHH 和 VEGF 的功能,在软骨细胞肥大和软骨内成骨中起着重要作用^[17]。研究表明,HDAC4 在体外和体内对 MEF2C 具有亲和力,通过抑制 MEF2C 从而来抑制软骨细胞肥大。研究发现,CaM 与 HDAC4 的结合导致 HDAC4 与 MEF2 分离,从而解除 MEF2 受 HDAC4 诱导的转录抑制^[18]。然而,目前关于 HDAC4 抑制软骨细胞和骨形成中 MEF2C 的机制的研究很少。

Runx2 作为 Runt 基因家族的一员,在调节软骨细胞骨化和成细胞代谢中起重要作用。Runx2 主要对很多骨基质蛋白基因的表达起促进作用,如 I 和 II 型胶原蛋白、骨桥蛋白、骨钙蛋白、纤连蛋白和 MMP13 等^[19]。HDAC4 是 Runx2 的负调节因子,通过与 Runx2 阻遏结构域结合,抑制 Runx2 的基因表达^[20]。HDAC4 通过脱乙酰化使非组蛋白 Runx2 脱乙酰化,并通过泛素蛋白介导的蛋白水解增强其降解^[21]。通过 EGFR 信号通路刺激 HDAC4,直接抑制 Runx2 启动子活性及其蛋白质表达水平^[20]。此外,HDAC4 还通过 TGF- β (transforming growth factor- β) 信号通路抑制 Runx2 功能^[22]。April 等^[23]通过基因插入的方式(在 HDAC4 基因片段的近端外显子和终止子之间)使 HDAC4 在斑马鱼中的功能丧失,结果发现实验鱼中 Runx2A 和 Runx2B 的表达增加且软骨骨化明显,表明 HDAC4 在斑马鱼中通过抑制 Runx2 基因的表达从而抑制软骨的骨化激活。

通过抑制 HDAC4 向细胞核的移位减少 HDAC4 对靶基因的抑制。核质转运被认为是控制 HDAC4 转录抑制功能的一个重要过程,研究人员认为,HDAC4 定位到细胞核是抑制转录所必需的。14-3-3 伴侣蛋白通过 s246、s467 和 s632 磷酸丝氨酸与 HDAC4 相互作用,将磷酸化的 HDAC4 从细胞核护送至细胞质,从而减轻 HDAC4 诱导的对靶蛋白的抑制。钙调素依赖性蛋白激酶优先磷酸化 HDAC4 的 s246、s467 和 s632 位点,以促进其核输出和与 14-3-3 蛋白的相互作用;HDAC4 核内聚集能增加对靶基因转录的抑制能力^[24]。近年来一项研究表明,PTHrP 通过减少 HDAC4 的磷酸化,减少细胞核内的

HDAC4 向细胞质转移,使核内的 HDAC4 与 Mef2 和 Runx2 结合并阻断它们的活动从而抑制软骨细胞肥大^[25]。

三、HDAC4 对成骨分化的影响

骨髓干细胞的成骨分化是膜内成骨中新生骨来源之一。目前发现在成骨细胞分化成熟中起重要的信号通路(例如 Wnt、Notch、IHH、Bmp、Fgf 信号通路),以及众多的转录因子(包括 Runx2、Osterix 等)^[3]。

研究发现,HDAC4 能够抑制成骨分化过程中关键转录因子 Runx2 表达抑制成骨分化,进而影响骨折愈合。通过慢病毒介导的方式使体外培养的骨髓干细胞 Tgif2 (TGF- β induced factor homeobox 2) 过表达,实验发现 Tgif2 通过调节 pSmad3/HDAC4/H4AC/Runx2 信号轴来调节成骨分化;TGF- β 家族成员与 TGF- β 受体 2 结合并募集 TGF- β 受体 1,磷酸化的 TGF- β 受体 1 激活 Smad2 和 Smad3,随后 Smad2/Smad3 磷酸化易位到细胞核中,在细胞核中磷酸化的 Smad 复合物通过与 Tgif2 募集的 HDAC4 相互作用,抑制特异性成骨基因表达从而抑制成骨分化^[22]。在 TMC01 介导的 Ca^{2+} 丢失实验中,研究者发现 TMC01 的缺失,降低了 HDAC4 磷酸化水平,增加了 HDAC4 在细胞核内的积累,这导致 Runx2 的脱乙酰基和降解,实验小鼠表现出骨质疏松症的特征^[26]。

四、miRNA 通过 HDAC4 调节软骨细胞肥大和成骨细胞分化

微小 RNA 属于体内小的单链非编码 RNA 分子家族,由 21~25 个核苷酸组成,能通过复杂的多步骤过程调节人体约 30% 的蛋白质编码基因。miRNA 通过干扰信使 RNA 的翻译对细胞分化和凋亡起调节作用。miRNA 通过与 mRNA 的 3'-UTR 之间的互补性程度和性质决定了基因调节方式:当完全互补是,目标 mRNA 就会降解;如果只是部分的互补,目标 mRNA 翻译被抑制,导致蛋白表达水平降低^[17,20,27-30]。目前已发现多个通过对 HDAC4 表达进行调控的 miRNA 来调节软骨细胞肥大和成骨细胞分化。

在软骨内成骨中,微小 RNA 通过改变 HDAC4 的亚细胞位置从而影响其对于靶基因的表达调控。研究发现在骨骼发育过程中,miR-1 通过靶向抑制 HDAC4 的表达促进软骨细胞分化^[21]。miR-365 通过抑制 HDAC4 而促进软骨细胞增殖和分化^[30]。

微小 RNA 也能通过抑制 HDAC4 的表达来促进骨髓干细胞向成骨细胞分化。在糖皮质激素对骨质内环境影响的研究中,王凤生等研究发现在体外,miR-29a 通过抑制组蛋白去乙酰化酶 4 (HDAC4) 的表达提高了成骨分化能力,抑制了骨髓间充质祖细胞向脂肪细胞分化,同时 miR-29a 能够减少长期使用糖皮质激素引起的骨组织中乙酰化 Runx2 和 β -环蛋白的数量,并降低了 RANKL、瘦素和糖皮质激素受体的表达^[31]。Pan 等^[32] 研究了一种利用 PEI 修饰的金纳米颗粒 (AuNPs) 协同促进成骨细胞分化的 miR-29b 递送系统发现,AuNPs/miR-29b 通过诱导成骨基因 (Runx2、OPN、OCN、ALP) 的表达,促进成骨细胞分化和矿化。但对基因表达调控的机制未做明确说明。随后刘秋玲等^[33] 制备了包含新型细胞穿透肽 R9-LK15 和 miR-29b 的纳米复合物,研究发现 R9-LK15/miR-29b 纳米复合物通过上调碱性磷酸酶表达和下调 HDAC4 表达,促进 BMSCs 的成骨分化和细胞外基质矿化。

五、展 望

HDAC 广泛表达于体内各细胞中,通过对基因转录和翻译的调控在众多疾病的发生、发展中起到重要作用,与此同时越来越多的组蛋白去乙酰化酶抑制成为相关疾病的有效治疗药物。HDAC4 作为 HDACs 家族一员,能对软骨细胞肥大和成骨细胞分化产生抑制作用,微小 RNA 通过抑制 HDAC4 的活性有效促进软骨细胞肥大和成骨细胞分化。软骨肥大和成骨分化是软骨内成骨和膜内成骨的关键步骤,因此有理由认为通过抑制 HDAC4 是有效促进骨折愈合的方式。

目前使用的组蛋白去乙酰化酶抑制均为广谱抑制剂,能同时作用多个组蛋白去乙酰化酶,且选择性弱、毒性较大、有较多不良反应,研究新型的、高选择性的 HDAC4 抑制剂是今后的研究方向。

参 考 文 献

- 1 Van Lieshout EMM, Den HD. Effect of platelet-rich plasma on fracture healing[J/OL]. Injury, 2021, 52: S58-S66
- 2 Nicholson JA, Makaram N, Simpson A, et al. Fracture nonunion in long bones: a literature review of risk factors and surgical management [J/OL]. Injury, 2021, 52(Suppl 2): S3-S11
- 3 Augat P, Simpson H. Enhancement of fracture healing[J/OL]. Injury, 2021, 52 (Suppl 2): S1-S2
- 4 Ding Q, Liu H, Liu L, et al. Deletion of p16 accelerates fracture healing in geriatric mice [J]. Am J Transl Res, 2021, 13 (10): 11107-11125
- 5 Yuasa M, Mignemi NA, Barnett JV, et al. The temporal and spatial development of vascularity in a healing displaced fracture [J/OL].

- Bone, 2014, 67: 208 – 221
- 6 Wong SA, Hu DP, Slocum J, *et al.* Chondrocyte – to – osteoblast transformation in mandibular fracture repair[J/OL]. J Orthop Res, 2021, 39(8): 1622 – 1632
 - 7 何树坤, 秦廷武. 肩袖损伤修复的界面组织工程研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2021, 35(10): 1341 – 1351
 - 8 Hyc A, Moskalewski S, Osiecka – Iwan A. Growth factors in the initial stage of bone formation, analysis of their expression in chondrocytes from epiphyseal cartilage of rat costochondral junction[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2021, 59(3): 178 – 186
 - 9 Nakamura T, Yamashita M, Ikegami K, *et al.* Autophagy facilitates type I collagen synthesis in periodontal ligament cells[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1291
 - 10 吴文梅, 李华琴, 黄源, 等. HDAC1 (Rpd3) 在疾病中的功能研究进展[J/OL]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(6): 849 – 852, 842
 - 11 Lee HA, Song MJ, Seok YM, *et al.* Histone deacetylase 3 and 4 complex stimulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136801
 - 12 宋词, 陈婷, 吴补领. 组蛋白去乙酰化酶在口腔来源成体干细胞成骨向/成牙本向分化的研究进展[J]. 分子影像学杂志, 2019, 42(2): 234 – 237
 - 13 Nishimori S, Wein MN, Kronenberg HM. PTHrP targets salt – inducible kinases, HDAC4 and HDAC5, to repress chondrocyte hypertrophy in the growth plate[J]. Bone, 2021, 142: 115709
 - 14 Sild M, Booij L. Histone deacetylase 4 (HDAC4): a new player in anorexia nervosa? [J]. Mol Psychiatry, 2019, 24(10): 1425 – 1434
 - 15 唐文宝, 谭洪波, 周田华, 等. 间充质干细胞治疗骨关节炎的临床研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2021, 18(3): 87 – 91
 - 16 Nakatani T, Chen T, Johnson J, *et al.* The deletion of hdac4 in mouse osteoblasts influences both catabolic and anabolic effects in bone[J]. J Bone Miner Res, 2018, 33(7): 1362 – 1375
 - 17 Dong C, Yang XZ, Zhang CY, *et al.* Myocyte enhancer factor 2C and its directly – interacting proteins: a review[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2017, 126: 22 – 30
 - 18 Papaioannou G, Mirzamohammadi F, Lisse TS, *et al.* MicroRNA – 140 provides robustness to the regulation of hypertrophic chondrocyte differentiation by the PTHrP – HDAC4 pathway[J]. J Bone Miner Res, 2015, 30(6): 1044 – 1052
 - 19 Hou Z, Wang Z, Tao Y, *et al.* KLF2 regulates osteoblast differentiation by targeting of Runx2[J]. Lab Invest, 2019, 99(2): 271 – 280
 - 29 Malavika D, Shreya S, Raj Priya V, *et al.* miR – 873 – 3p targets HDAC4 to stimulate matrix metalloproteinase – 13 expression upon parathyroid hormone exposure in rat osteoblasts[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 7996 – 8009
 - 21 Li P, Wei X, Guan Y, *et al.* MicroRNA – 1 regulates chondrocyte phenotype by repressing histone deacetylase 4 during growth plate development[J]. FASEB J, 2014, 28(9): 3930 – 3941
 - 22 Yu X, Shen G, Ren H, *et al.* TGFβ – induced factor homeobox 2 blocks osteoblastic differentiation through targeting pSmad3/HDAC4/H4ac/Runx2 axis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 21284 – 21293
 - 23 DeLaurier A, Alvarez CL, Wiggins KJ. hdac4 mediates perichondral ossification and pharyngeal skeleton development in the zebrafish[J]. PeerJ, 2019, 7: e6167
 - 24 Mathias RA, Guise AJ, Cristea IM. Post – translational modifications regulate class IIa histone deacetylase (HDAC) function in health and disease[J]. Mol Cell Proteomics, 2015, 14(3): 456 – 470
 - 25 Nishimori S, Lai F, Shiraishi M, *et al.* PTHrP targets HDAC4 and HDAC5 to repress chondrocyte hypertrophy[J]. JCIInsight, 2019, 4(5): e97903
 - 26 Li J, Liu C, Li Y, *et al.* TMCO1 – mediated Ca²⁺ leak underlies osteoblast functions via CaMKII signaling[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1589
 - 27 Chen R, Qiu H, Tong Y, *et al.* MiRNA – 19a – 3p alleviates the progression of osteoporosis by targeting HDAC4 to promote the osteogenic differentiation of hMSCs[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 516(3): 666 – 672
 - 28 Tan K, Peng YT, Guo P. MiR – 29a promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via targeting HDAC4[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3318 – 3326
 - 29 Lu Z, Wang D, Wang X, *et al.* MiR – 206 regulates the progression of osteoporosis via targeting HDAC4[J]. Eur J Med Res, 2021, 26(1): 8
 - 30 Xu D, Gao Y, Hu N, *et al.* miR – 365 ameliorates dexamethasone – induced suppression of osteogenesis in MC3T3 – E1 cells by targeting HDAC4[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 977
 - 31 Ko JY, Chuang PC, Ke HJ, *et al.* MicroRNA – 29a mitigates glucocorticoid induction of bone loss and fatty marrow by rescuing Runx2 acetylation[J]. Bone, 2015, 81: 80 – 88
 - 32 Pan T, Song W, Gao H, *et al.* miR – 29b – Loaded gold nanoparticles targeting to the endoplasmic reticulum for synergistic promotion of osteogenic differentiation[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(30): 19217 – 19227
 - 33 Liu Q, Lin Z, Liu Y, *et al.* Delivery of miRNA – 29b using R9 – LK15, a novel cell – penetrating peptide, promotes osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3032158

(收稿日期: 2022 – 09 – 08)

(修回日期: 2022 – 09 – 27)