

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00767

• 综述 •

P2X₇ 受体与骨代谢研究进展

李 喆^{1,2}, 马 蓓^{3*}, 陈爱民^{2*}

1. 解放军 73018 部队卫生队, 镇江 212416
2. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003
3. 第二军医大学基础医学实验教学中心, 上海 200433

[摘要] P2X₇ 受体是 ATP-门控的阳离子通道, 具有广泛的生物学效应, 在多种组织细胞中均有表达, 包括成骨细胞和破骨细胞, 参与骨代谢, 在骨形成和骨吸收过程中发挥重要作用。本文着重对 P2X₇ 受体及其相关信号通路对骨代谢影响的相关研究进展作一综述。

[关键词] P2X₇ 受体; 骨代谢; 成骨细胞; 破骨细胞

[中图分类号] R 336 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)07-0767-04

Relationship between P2X₇ receptor and bone metabolism: recent progress

LI Zhe^{1,2}, MA Bei^{3*}, CHEN Ai-ming^{2*}

1. Medical Team, No. 73018 Troop of PLA, Zhenjiang 212416, Jiangsu, China
2. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
3. Experimental Training Center for Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] P2X₇ receptor, an ATP-gated ion channel, is widely found in various tissues and possesses multiple physiological functions. Recent reports have implicated expression of P2X₇ receptor in both osteoblasts and osteoclasts, participating in both bone formation and resorption. This paper reviews the recent progresses on the influence of P2X₇ receptor and its related pathways on bone metabolism.

[Key words] P2X₇ receptor; bone metabolism; osteoblasts; osteoclasts

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(7): 767-770]

ATP 存在于所有细胞, 组织损伤、肿瘤、炎症以及神经损伤都可诱导 ATP 释放, 通过胞吐作用或细胞溶解释放 ATP, 具有广泛的生物学效应^[1-3]。ATP 作为重要的细胞外调节分子, 主要通过 P2 受体结合后发挥信号转导作用。

P2 受体可以分为 P2Y 受体和 P2X 受体两类, P2Y 受体是 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体, P2X 受体是 ATP-门控的阳离子通道, 具有非选择性, 对 Ca²⁺ 有很强的通透性, 同时对 Na⁺、K⁺ 也具有一定的通透性^[1-2]。

P2X₇ 受体是 P2X 受体众多亚型中的 1 种, 在多种组织中广泛表达, 在细胞中有多种生理作用^[1]。骨细胞表达的 P2X₇ 受体与骨细胞信号转导机制有关, 参与骨形成与吸收, 具有重要意义。

1 P2X₇ 受体及其在骨细胞中的表达

1.1 P2X₇ 受体概述 P2X₇ 受体蛋白是含约 595 个氨基酸残基的多肽, 与 P2X 受体家族的其他成员结构相似, 其有 1 个大的胞外环连接着 2 个跨膜区, 该环由半胱氨酸、赖氨酸、甘氨酸残基和许多 N-糖基化位点组成, 共同构成了 ATP 结合位点。P2X₇ 受体的 C 端比 P2X 受体家族的其他成员长约 120 个氨基酸残基, 这个长 C 端(约 240 个氨基酸残基)用于调节 P2X₇ 受体功能, 缺失 C 端的变异体不能促进细胞膜成孔, 第 551~581 位氨基酸缺失则不能在细胞膜上表达^[2]。与其他 P2X 受体相比, 激活 P2X 受体需要更高浓度的 ATP, 苯甲酰苯甲酸 ATP(BzATP)是其最强的激动剂。P2X₇ 受体在不

[收稿日期] 2014-08-24 **[接受日期]** 2015-03-10

[作者简介] 李 喆, 硕士生. E-mail: drlizhe0202@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871050, E-mail: mabei08@aliyun.com; Tel: 021-81885625, E-mail: aiminchen@aliyun.com

同条件下被激活后的功能也有所不同:通常情况下它在被 ATP 激活后,可形成非选择性阳离子通道,对 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 等阳离子均可通透;但在 ATP 持续刺激下或在胞外二价阳离子浓度较低的环境中, P2X_7 受体可促进质膜形成非选择性膜孔,除对以上各阳离子通透外还对相对分子质量较大的有机阳离子通透^[1]。

1.2 骨细胞中 P2X_7 受体表达

1.2.1 成骨细胞 P2X_7 受体的表达

Gartland 等^[3]发现人的成骨细胞亚群可表达 P2X_7 受体。Nakamura 等^[4]证明在人成骨样细胞株(MG-63)中有 P2X_7 转录物表达。2003年,小鼠颅骨细胞被发现可表达 P2X_7 受体转录物^[5]。此后,免疫印迹法分析证明小鼠颅骨成骨细胞和人骨源性干细胞亚群(MC3T3-E1 成骨样细胞)表达 P2X_7 受体蛋白^[6]。Alqallaf 等^[7]随后也证明了人类成骨样细胞表达 P2X_7 受体。

1.2.2 破骨细胞 P2X_7 受体表达

RT-PCR 证明来源于人骨髓单核细胞的破骨细胞有 P2X_7 转录物表达^[8]。免疫细胞化学方法证明兔和大鼠破骨细胞上有 P2X_7 受体表达^[9]。Gartland 等^[10]在体外研究和体内研究都证明了人破骨细胞可表达 P2X_7 受体。

2 P2X_7 受体信号转导通路在骨代谢中的作用

2.1 P2X_7 受体在骨细胞中介导的信号转导

成骨细胞与破骨细胞间的信号对于骨内环境稳态至关重要。Jørgensen 等^[8]证明了 P2X_7 受体的激活是钙信号在成骨细胞和破骨细胞间转导的新机制, P2X_7 受体激活后可通过旁分泌或自分泌核苷类物质来改变骨微环境内的钙信号,这是成骨细胞调节破骨细胞功能的重要途径。BzATP 可使细胞质内钙离子一过性增多,从而引起 PKC 向破骨细胞基底外侧膜迁移,去除细胞外钙离子后 PKC 迁移将消失。而 $\text{P2X}_7^{-/-}$ 小鼠(基因敲除小鼠)模型中, BzATP 不能激活骨髓破骨细胞的 PKC 迁移,这说明 P2X_7 受体具有特异性,即激活 P2X_7 受体可诱导破骨细胞内 Ca^{2+} 依赖的 PKC 迁移至基底外侧膜^[11]。 P2X_7 受体在破骨细胞内的活化还与 NF- κ B 因子相偶联,因此在炎症或机械刺激情况下释放的核苷类似物可通过 NF- κ B 来调节破骨细胞的成熟与活性以及成骨细胞的功能^[12-13]。 P2X_7 受体还与 T 细胞激活的核

因子(NFAT)有关,参与了细胞增殖和生长^[14]。 P2X_7 受体相关的其他通路还包括 PI3K-Akt-mTOR 途径,以及 rho-相关蛋白酶(ROCK)^[14],提示 P2X_7 受体对破骨细胞的凋亡和细胞的动力调节均有作用。

2.2 ATP 通过 P2X_7 受体对骨代谢的影响

正常生理条件下,ATP 在细胞内以较高的浓度存在,但在细胞外浓度非常低。ATP 从细胞内被释放后迅速被核苷酸酶分解,并可激活多种 P2 受体。低浓度 ATP 可抑制炎症和免疫偏差(deviation),而高浓度 ATP 与组织应激和损伤有关^[15]。ATP 在感染、炎症以及肿瘤形成时大量被释放^[16]。在骨组织,ATP 在出现骨裂或骨折时,组织或细胞损伤时胞外也会大量积聚^[15]。因此,由于骨组织和免疫系统 P2X_7 受体的激活需要高浓度 ATP,而在炎症和组织损伤时 ATP 被大量释放,因此很有可能在这些情况下 ATP 释放后的作用是由 P2X_7 受体来完成的。此外, Panupinthu 等^[17]证明机械刺激可导致 ATP 释放,ATP 作用于成骨细胞 P2X_7 受体,产生前列腺素及溶血磷脂酸(LPA),这些脂质调节分子通过自分泌或旁分泌的方式提高骨生成。

2.3 P2X_7 受体对成骨细胞的影响

Gabel^[18]发现,用不同浓度的 P2X_7 受体拮抗剂培养的成骨细胞,骨矿化作用均可增加,说明 P2X_7 受体可抑制成骨细胞的骨矿化作用。而 P2X_7 受体激活后触发 ATP 的释放,为骨矿化作用提供了磷酸盐^[19]。成骨细胞上的 P2X_7 受体还可能与细胞因子的合成与释放有关^[20]。此外,成骨细胞上 P2X_7 受体的激活还可引起 ATP 介导的细胞凋亡^[3]。而 Panupinthu 等^[17]发现, BzATP 介导的小鼠颅骨细胞膜泡状突起可在去除激动剂后被逆转,说明 P2X_7 受体介导的不是急性细胞凋亡。

2.4 P2X_7 受体对破骨细胞的影响

Penolazzi 等^[21]的研究发现特殊的 P2X_7 受体的阻断剂可诱导人破骨样细胞凋亡,用氧化 ATP(oxATP)阻断 P2X_7 受体或用 P2X_7 受体拮抗剂的单克隆抗体都可显著抑制破骨细胞前体形成多核破骨细胞^[10]。这表明 P2X_7 受体对调节破骨细胞的形成和凋亡都有重要作用。此外,缺乏功能性 P2X_7 受体的 RAW 264.7 细胞也未能形成多核破骨细胞^[22]。对 $\text{P2X}_7^{-/-}$ 小鼠模型的研究发现了 P2X_7 受体在破骨细胞成熟上

的作用表现不同, P2X₇^{-/-}小鼠骨髓中仍然出现了多核破骨细胞, 说明在破骨细胞前体融合时 P2X₇受体并不是必需的^[5]。P2X₇^{-/-}小鼠上还发现了小梁骨体积的减少和骨小梁表面破骨细胞的增加, 这个发现提示 P2X₇受体参与介导了骨吸收^[5]。在体外实验中, 也发现了 P2X₇受体拮抗剂导致骨吸收减少并增加了破骨细胞凋亡^[10]。

2.5 P2X₇受体对成骨及骨密度的影响 P2X₇受体对维持和调节成骨量发挥了至关重要的作用。研究发现, P2X₇^{+/+}小鼠(野生型小鼠)成骨量与皮质骨含量均高于 P2X₇^{-/-}小鼠(基因敲除小鼠), 此外 P2X₇^{-/-}小鼠骨的纵向生长并未改变。P2X₇^{-/-}小鼠骨形成率低于正常小鼠, 且胫骨干切面的骨膜表面距离短于正常小鼠。P2X₇^{-/-}小鼠还出现了骨膜骨形成不足和小梁骨过度吸收的独特表现^[5]。Gartland 等^[23]报道了 P2X₇受体基因失去 c. 946A (Arg307Gln)单核苷酸多态性与失去其他单核苷酸多态性的 P2X₇受体相比, 具有更低的骨矿化密度。Syberg 等^[24]发现 P2X₇受体基因 P451 突变的小鼠与 C57BL/6 (B6)小鼠和 DBA/2J 小鼠相比有更强壮的股骨以及更高的骨矿物质密度。

2.6 P2X₇受体对骨丢失的影响 P2X₇受体与骨重建和吸收有很重要的关系, 因而 P2X₇受体的功能可以影响到骨质疏松所致骨折的发病率。Ohlendorff 等^[25]研究发现, 绝经 10 年后的女性骨折风险以及激素替代治疗的效果同 P2X₇受体的 Glu496Ala 和 Lle568Asn 单核苷酸片段有关。体外研究发现 Glu496Ala 片段严重影响破骨细胞凋亡, 这大大增加了骨折风险。对因骨质疏松症而骨折的患者的研究发现, P2X₇受体功能的基因变异与骨矿物质密度(BMD)以及骨质疏松症的风险相关^[26]。Jørgensen 等^[27]报道了不同变种 P2X₇受体间有相关性, 即 P2X₇受体的功能越低, 骨丢失率越高, 脊椎骨折的发病率也越高。Kvist 等^[28]认为, P2X₇受体是自然免疫应答激活的关键分子, 在骨更新过程中起重要调节作用, 因而 ATP 介导的嘌呤信号可能是炎症介导骨丢失的关键。

3 小结及展望

在炎症反应及机械刺激时, 释放到细胞外的 ATP 作用于 P2X₇受体可促进成骨细胞形成并同时

诱导破骨细胞凋亡, 从而增强骨形成而抑制骨吸收, 因此 P2X₇受体在今后可作为药物治疗的新靶点。绝经后女性的骨质疏松症发病率明显增高, P2X₇受体多变异体可以预判女性患骨质疏松症的风险, 并且可评估雌激素替代的疗效。然而, 绝经后女性的雌激素水平明显降低, 雌激素对 P2X₇受体的影响也将成为今后研究的方向。

[参考文献]

- [1] North R A. Molecular physiology of P2X receptors [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82:1013-1067.
- [2] Smart M L, Gu B, Panchal R G, Wiley J, Cromer B, Williams D A, et al. P2X₇ receptor cell surface expression and cytolitic pore formation are regulated by a distal C-terminal region [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 8853-8860.
- [3] Gartland A, Hipskind R A, Gallagher J A, Bowler W B. Expression of a P2X₇ receptor by a subpopulation of human osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 846-856.
- [4] Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K, Shibuya I, Oishi Y, Tanaka M, et al. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279:C510-C519.
- [5] Ke H Z, Qi H, Weidema A F, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford D T, et al. Deletion of the P2X₇ nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption [J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17: 1356-1367.
- [6] Li J, Liu D, Ke H Z, Duncan R L, Turner C H. The P2X₇ nucleotide receptor mediates skeletal mechanotransduction [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 42952-42959.
- [7] Alqallaf S M, Evans B A, Kidd E J. Atypical P2X receptor pharmacology in two human osteoblast-like cell lines [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156:1124-1135.
- [8] Jørgensen N R, Henriksen Z, Sørensen O H, Eriksen E F, Civitelli R, Steinberg T H. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X₇ receptors [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:7574-7580.
- [9] Naemsch L N, Dixon S J, Sims S M. Activity-dependent development of P2X₇ current and Ca²⁺ entry in rabbit osteoclasts [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 39107-

- 39114.
- [10] Gartland A, Buckley K A, Bowler W B, Gallagher J A. Blockade of the pore-forming P2X₇ receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 2003, 73:361-369.
- [11] Armstrong S, Pereverzev A, Dixon S J, Sims S M. Activation of P2X₇ receptors causes isoform-specific translocation of protein kinase C in osteoclasts [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 1):136-144.
- [12] Korcok J, Raimundo L N, Ke H Z, Sims S M, Dixon S J. Extracellular nucleotides act through P2X₇ receptors to activate NF-kappaB in osteoclasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 642-651.
- [13] Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-kappaB [J]. *Nat Med*, 2009, 15:682-689.
- [14] Grol M W, Zelner I, Dixon S J. P2X₇-mediated calcium influx triggers a sustained, PI3K-dependent increase in metabolic acid production by osteoblast-like cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302: E561-E575.
- [15] la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73:339-343.
- [16] Wesselius A, Bours M J, Agrawal A, Gartland A, Dagnelie P C, Schwarz P, et al. Role of purinergic receptor polymorphisms in human bone [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011, 16:2572-2585.
- [17] Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke H Z, Sims S M, Dixon S J. P2X₇ nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 3403-3412.
- [18] Gabel C A. P2 purinergic receptor modulation of cytokine production [J]. *Purinergic Signal*, 2007, 3 (1-2): 27-38.
- [19] Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F. A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16:3659-3665.
- [20] Orriss I R, Key M L, Hajjawi M O, Arnett T R. Extracellular ATP released by osteoblasts is a key local inhibitor of bone mineralization [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e69057.
- [21] Penolazzi L, Bianchini E, Lambertini E, Baraldi P G, Romagnoli R, Piva R, et al. N-Arylpiperazine modified analogues of the P2X₇ receptor KN-62 antagonist are potent inducers of apoptosis of human primary osteoclasts [J]. *J Biomed Sci*, 2005, 12:1013-1020.
- [22] Hiken J F, Steinberg T H. ATP downregulates P2X₇ and inhibits osteoclast formation in RAW cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287:C403-C412.
- [23] Gartland A, Skarratt K K, Hocking L J, Parsons C, Stokes L, Jørgensen N R, et al. Polymorphisms in the P2X₇ receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal women [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20:559-564.
- [24] Syberg S, Schwarz P, Petersen S, Steinberg T H, Jensen J E, Teilmann J, et al. Association between P2X₇ receptor polymorphisms and bone status in mice [J]. *J Osteoporos*, 2012, 2012: 637986.
- [25] Ohlendorff S D, Tofteng C L, Jensen J E, Petersen S, Civitelli R, Fenger M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the P2X₇ gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17:555-567.
- [26] Wesselius A, Bours M J, Henriksen Z, Syberg S, Petersen S, Schwarz P, et al. Association of P2X₇ receptor polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24:1235-1246.
- [27] Jørgensen N R, Husted L B, Skarratt K K, Stokes L, Tofteng C L, Kvist T, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the P2X₇ receptor gene are associated with post-menopausal bone loss and vertebral fractures [J]. *Eur J Hum Genet*, 2012, 20:675-681.
- [28] Kvist T M, Schwarz P, Jørgensen N R. The P2X₇ receptor: a key player in immune-mediated bone loss? [J]. *ScientificWorldJournal*, 2014, 2014:954530.