DOI:10.16016/j.2097-0927.202312125

表皮生长因子受体可能通过调控 ABCC1 和 CDC37 的表达促进破骨细胞分化

谭 欣,张子元,刘 星 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院骨科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,重庆市干细胞治疗工程技术研究中心

[**摘要**] **目的** 观察表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在小鼠破骨细胞分化过程中的表达趋势,探究破骨细胞分化过程中 EGFR 相关信号通路及关键基因。**方法** 从 24 只 6~8 周龄健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(体质量 19~21g)中提取骨髓来源巨噬细胞,随后采用 M-CSF 和 RANKL 共刺激构建小鼠破骨细胞分化模型,并用 TRAP 染色法、RT-qPCR 检测破骨细胞分化状况及 EGFR 的表达量变化。通过生物信息学方法系统鉴定破骨细胞分化过程中 EGFR 相关基因,并通过 RT-qPCR 和 EGFR 激活及抑制模型进行验证。**结果** 体外破骨细胞分化模型显示,EGFR 在小鼠破骨细胞分化过程中表达量持续上升($P<0.01$)。RNA-seq 数据表明,EGFR 表达与 MAPK 等多条信号通路呈显著相关($P<0.05$)。通过 WGCNA 及 PPI 分析,鉴定出 ATP 结合盒亚家族 C 成员 1(ATP binding cassette subfamily C member 1, ABCC1)和细胞分裂周期蛋白 37(cell division cycle 37, CDC37)与 EGFR 之间存在共表达及相关性($P<0.01$)。RT-qPCR 检测结果显示,ABCC1($P<0.05$)和 CDC37($P<0.01$)在分化过程中表达量显著上升,且在激活 EGFR 时二者表达水平进一步升高($P<0.01$),抑制 EGFR 时二者表达明显降低($P<0.05$)。**结论** 激活 EGFR 信号可诱导破骨细胞分化,并上调 ABCC1 和 CDC37 的表达水平。

[**关键词**] 表皮生长因子受体;破骨细胞分化;ATP 结合盒亚家族 C 成员 1;细胞分裂周期蛋白 37
[**中图法分类号**] R322.71; R329.28; R394.2 [**文献标志码**] A

Epidermal growth factor receptor promotes osteoclast differentiation probably through regulating ABCC1 and CDC37

TAN Xin, ZHANG Ziyuan, LIU Xing Department of Orthopedics, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression profile of epidermal growth factor receptor (EGFR) during the differentiation of osteoclasts, and to explore EGFR-related signaling pathways and key genes during the process. **Methods** Bone marrow derived macrophages were extracted from 24 healthy SPF-grade male C57BL/6 mice (6-8 weeks old, weighing 19~21 g), and then treated with M-CSF and RANKL co-stimulation to establish a model of mouse osteoclast differentiation. TRAP staining and RT-qPCR were used to detect the differentiation status of osteoclasts and the expression level of EGFR. Bioinformatics were employed to systematically identify EGFR-related genes during osteoclast differentiation, and then RT-qPCR and EGFR activation and inhibition models were applied to validate the genes. **Results** *In vitro* osteoclast differentiation model showed the EGFR expression level was in a continuous increase during the differentiation of mouse osteoclasts ($P<0.01$). RNA-seq data indicated that EGFR expression was significantly associated with multiple signaling pathways, including MAPK pathway ($P<0.05$). Weighted correlation network analysis

[**通信作者**] 刘 星,E-mail:liuxingda@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(WGCNA) and protein-protein interaction (PPI) analysis identified co-expression and correlations of EGFR with ATP binding cassette subfamily C member 1 (ABCC1) and cell division cycle 37 (CDC37) ($P<0.01$). The osteoclast differentiation model showed significant increases in the expression levels of ABCC1 ($P<0.05$) and CDC37 ($P<0.01$) during differentiation, and activation of EGFR further enhanced the levels ($P<0.01$) while EGFR inhibition decreased them ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of EGFR signal induces osteoclast differentiation and up-regulates the expression levels of ABCC1 and CDC37.

[**Key words**] epidermal growth factor receptor; osteoclast differentiation; ATP binding cassette subfamily C member 1; cell division cycle 37

Corresponding author: LIU Xing, E-mail: liuxingda@126.com

骨质疏松(osteoporosis)是一种以骨量丢失和骨微结构破坏为特征的全身代谢性疾病[1]。破骨细胞在骨骼的生理功能和代谢过程中起着关键的调节作用,参与骨吸收、骨重塑、钙平衡和生长因子的释放,从而维持骨骼的健康。破骨细胞过度活跃或功能异常往往导致多种疾病,包括骨质疏松、病理性骨折、骨不连、骨骼畸形等。破骨细胞的分化程度与其功能密切相关,因此,探究破骨细胞分化的分子机制对于开发治疗骨质疏松的药物有重要启示。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种广泛分布于人体多组织细胞膜上的多功能糖蛋白。EGFR 及其配体组成的信号转导网络在骨稳态的维持中发挥着重要作用[2]。近来研究表明,EGFR 能够通过与 RANK 信号通路相互影响,从而参与调控破骨细胞分化[3]。在肿瘤微环境中,EGFR 信号传导也被观察到可以调节骨髓基质细胞产生破骨因子以及维持破骨细胞的活化状态[4]。同时,EGFR 对于成骨细胞增殖至关重要,其缺陷会导致严重的骨组织缺陷[5]。由于 EGFR 对于破骨细胞和成骨细胞的分化和功能都发挥了调控作用,因此,不能仅通过调控 EGFR 来治疗骨质疏松,需要寻找参与破骨细胞分化的特异性蛋白作为治疗骨质疏松的新靶点。本研究旨在寻找 EGFR 调控的参与破骨细胞分化的特异性分子,探究这些分子在破骨细胞分化中的表达模式,并进一步阐明其与 EGFR 及破骨细胞分化的关系。

ABCC1 即 ATP 结合盒亚家族 C 成员 1(ATP binding cassette subfamily C member 1),是 ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白超家族的成员之一,具有多特异性有机阴离子转运蛋白的功能[6],并与多种肿瘤的耐药性相关[7]。CDC37 即细胞分裂周期蛋白 37(cell division cycle 37),是一种分子伴侣,能与 HSP90 以及多种蛋白激酶形成复合物。目前,缺少相关证据提示这两种蛋白参与成骨细胞增殖及分化,也缺乏对 ABCC1 和 CDC37 在破骨细胞分化中的作用进行探索。

本研究采用体外小鼠破骨细胞分化模型和转录组学数据共同探究 EGFR 在破骨细胞分化的作用机制和调控分子,为破骨细胞分化的分子机制提供新的理论依据,并为骨质疏松治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只 SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6 野生型小鼠(体质量为 19~21 g)购自重庆医科大学实验动物中心。实验经过重庆医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC-CQMU-2023-0026),并按照其指导方法实施。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、α-MEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青-链霉素购自美国 Gibco 公司;小鼠重组核因子 κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)蛋白、小鼠巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自中国近岸蛋白公司;TARP 染色试剂盒购自中国索莱宝公司;RNAisoPlus 购自日本 TaKaRa 公司;反转录试剂盒及 Sybr Green qPCR mix 购自中国 Abclonal 公司;红细胞裂解液购自中国碧云天公司;吉非替尼购自美国 MedChemExpress 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代破骨细胞分化模型构建 通过二氧化碳麻醉 C57BL/6 小鼠 2~3 min 后断颈处死,并置于酒精浸泡 30 min。于超净台内分离双侧股骨并剪去两端以暴露骨髓腔,用培养基反复冲洗,冲出所有骨髓,轻轻吹打从而制备为单细胞悬液。800 r/min 离心 5 min 后,去除上清并用 3 倍细胞体积的红细胞裂解液重悬。室温反应 2 min 后,再次 800 r/min 离心 5 min,

弃去上清并用 DMEM 培养基(含 10% FBS 及 10 ng/mL M-CSF)重悬并置于培养皿中。2 d 后可见贴壁细胞呈短梭形,即小鼠骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macrophages,BMMs)。将贴壁细胞消化并调整密度为 2×10^5 个/mL,随后接种于 6 孔板,加入 α-MEM 培养基(含 10%FBS、30 ng/mL M-CSF 和 100 ng/mL RANKL),小鼠按照随机数字表法分为对照组、RANKL 组、EGF 处理组、吉非替尼处理组并提取 BMMs。其中,对照组加入 30 ng/mL M-CSF;RANKL 组进行破骨细胞诱导分化(加入 30 ng/mL M-CSF 和 100 ng/mL RANKL);EGF 处理组在进行破骨细胞诱导分化基础上额外添加 100 ng/mL EGF,持续培养 3~5 d;吉非替尼处理组在进行破骨细胞诱导分化基础上额外添加 4.47 μg/mL 吉非替尼持续培养 3 d。

1.2.2 破骨细胞 TRAP 染色 细胞于加药培养后的第 5 天,按照 TRAP 染色试剂盒说明书进行染色,并放置于倒置荧光显微镜下观察并拍摄,以 TRAP 阳性多核细胞为破骨细胞,每个处理组随机取 6 个视野进行计数,并统计破骨细胞占比。

1.2.3 总 RNA 提取及反转录 RT-qPCR 总 RNA 提取方法参考 RNAisoPlus 说明书进行抽提,并取 2 μg 总 RNA 按照试剂盒说明书进行反转录反应。产物随后稀释 10~20 倍后用于 RT-qPCR 检测,实验中以 *Actb* 基因为内参基因,检测 *EGFR*、*NFATC*1、*CTSK*、*MMP*9、*ABCC*1、*CDC*37 在破骨细胞分化过程和 EGF 刺激情况下的基因表达量变化情况。反应条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,58 ℃ 30 s),40 个循环。本实验所涉及引物均置于表 1。

表 1 RT-qPCR 所用引物序列

基因名	引物序列(5′→3′)
EGFR	上游:CAATGTTCCCATCGCTGTCGT 下游:TGTCTTTGCATGTGGCCTCAT
*NFATC*1	上游:GGAGAGTCCGAGAATCGAGAT 下游:TTGCAGCTAGGAAGTACGTCT
CTSK	上游:ACTGCCTTCCAATACGTGCA 下游:AGCTTGCATCGATGGACACA
*MMP*13	上游:TGTTTGCAGAGCACTACTTGAA 下游:CAGTCACCTCTAAGCCAAAGAAA
*ABCC*1	上游:AAGGGAGTCCAATCCTCGGG 下游:GGAATCTCGAAACACGTCCAC
*CDC*37	上游:GACTACAGCGTTTGGGATCAC 下游:CCCCGGTCCAGTTCCTCTT
ACTB	上游:GTGACGTTGACATCCGTAAAGA 下游:GCCGGACTCATCGTACTCC

1.2.4 破骨细胞分化数据集获取 本研究采用 R 语言(版本为 4.0.0)从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO)数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)下载 GSE176265 基因表达谱芯片原始数据进行分析。芯片平台为 Illumina MouseWG-6 v2.0 expression beadchip,其中包含来自不同时间段由 M-CSF 和 RANKL 蛋白刺激分化为破骨细胞的小鼠骨髓来源巨噬细胞,每组包含 6 个技术重复。探针名称通过制造商提供的注释文件注释为基因名称,对于基因名称重复的探针信号,采用取均值的方法进行处理。

1.2.5 差异表达分析 在 R 软件中采用 limma 包对数据进行标准化并进行差异基因筛选,以 Log 化差异倍数绝对值>1 且矫正 P 值<0.05 表示差异基因具有统计学意义。差异基因通过 ggplot 包绘制火山图进行展示,火山图的颜色反映基因的表达变化情况,黑色代表表达量没有显著差异,红色代表基因表达量显著上升,蓝色则代表基因表达量显著下调。基因表达箱型图采用 ggpubr 包进行绘制,并通过 ggsig 包进行 wilcoxon 检验,检验结果在图中以数值的方式进行标注,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

1.2.6 基因集变异分析及关联分析 基因集变异分析(gene set variation analysis, GSVA)通过 R 软件 GSVA 包进行分析。Reactome 通路基因集通过 msigdb 数据库下载。GSVA 分析可将基因表达矩阵转变为信号通路表达矩阵,因而可以进行通路水平的差异分析。通路差异分析同样采用 limma 包进行,筛选标准为:Log 化差异倍数绝对值>1 且矫正 P 值<0.05。差异表达通路通过 ggplot 包绘制火山图进行展示,其中,火山图的颜色反应通路的改变情况,黑色代表通路改变没有显著差异,红色代表信号通路显著激活,蓝色则代表信号通路显著抑制。*EGFR* 基因表达量和通路上下调情况通过 stat 包计算 Pearson 相关系数并进行统计分析,随后挑选相关系数的绝对值>0.7 且 P<0.05 的通路通过 ggcorplot 包绘制相关性点图。其中红色代表 *EGFR* 基因与相应通路表达量呈现正相关,蓝色代表 *EGFR* 基因与相应通路表达量呈现负相关,相关系数则以黑色字体标注在图中。

1.2.7 加权基因共表达网络分析 挑选基因表达量前 25%的基因(共计 7 723 个)进行加权基因共表达网络分析(weighted gene correlation network analysis, WGCNA)。WGCNA 分析通过 R 软件 WGCNA 包进行,采用 16 为权重值构建无尺度网络分布并进行基因聚类和划分至不同模块。各模块与实验分组的相关性通过 Pearson 相关性进行分析并绘制为热图,并以黑

色字体标注相关系数和 P 值。黄色模块中与 EGFR 共表达的基因随后通过 clusterprofiler 包进行基因本体论(Gene Ontology,GO)富集分析,并且将这些基因通过 STRING 数据库绘制蛋白-蛋白互作网络图并导入 cytoscape 进行可视化。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 或 R 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用 Student's t 检验或单因素方差分析进行,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体外破骨细胞分化模型评估

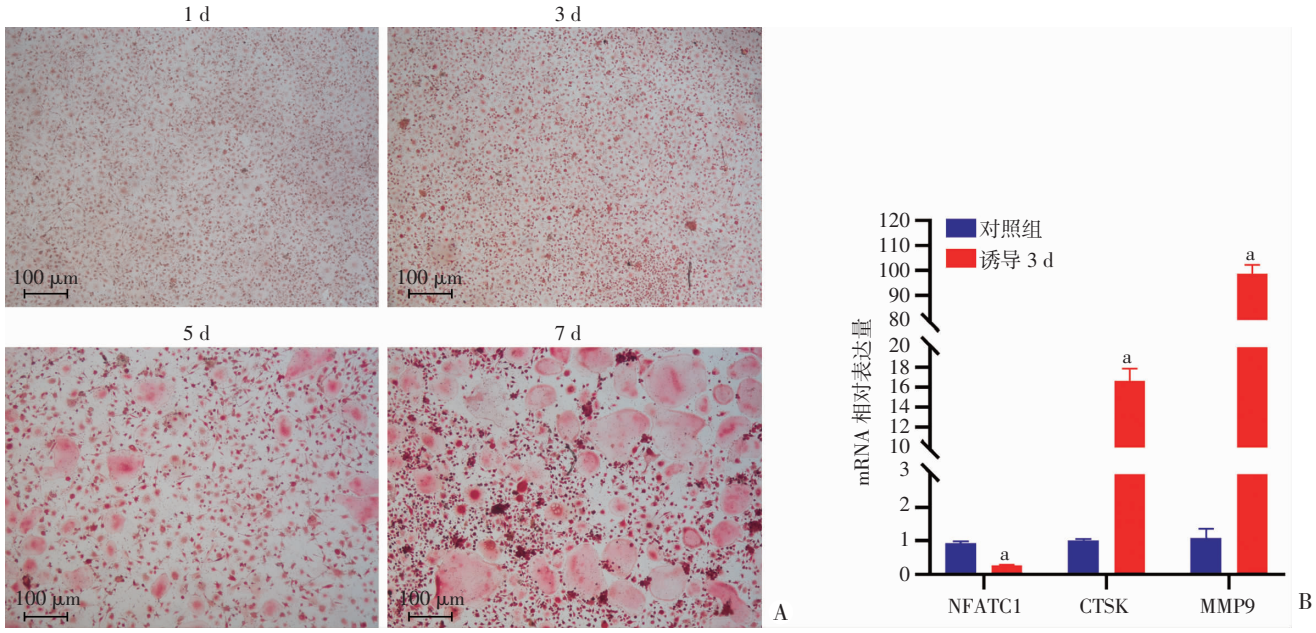
BMMs 细胞在 RANKL 诱导分化的第 3 天,开始呈现不规则状,部分细胞体积变大且有融合的趋势。第 5 天时,可见视野中部分细胞体积变大,相互融合,逐渐形成破骨细胞,细胞边缘可见突起和伪足。第 7 天时,可见视野中大量细胞融合形成 TRAP 染色阳性的成熟破骨细胞,呈圆形或类圆形,体积巨大,细胞内可见数个细胞核(图 1A)。同时,在 RANKL 诱导 3 d 后发现破骨细胞标志基因组织蛋白酶 K(cathepsin K,CTSK)、基质金属蛋白酶 9(matrix metallopeptidase 9,MMP9)显著上升($P<0.01$),而伴随破骨细胞未成熟阶段高表达的活化 T 细胞核因子 1(nuclear factor of activated T cells 1,NFATC1)显著下调($P<0.01$,图 1B),提示小鼠体外破骨细胞分化模型构建成功。

2.2 EGFR 激活对破骨细胞分化的影响

在破骨细胞诱导分化的第 3 天,RT-qPCR 结果显示,EGFR 的表达水平显著升高($P<0.01$,图 2A)。同时,来自 GEO 数据库的转录组芯片数据 GSE176265 也提示 EGFR 在破骨细胞分化过程中表达量有上升的趋势($P<0.01$,图 2B)。采用 EGF 刺激以激活 EGFR 信号,进而观察 EGFR 对破骨细胞分化的影响。在诱导分化 3 d 后,EGF 刺激并未显著改变 EGFR 的表达量(图 2C),但能够引起 NFATC1 表达量显著下调以及 MMP13 的表达量显著上升($P<0.05$,$P<0.01$,图 2D、E)。TRAP 染色结果表明,在 EGF 处理下,破骨细胞占比显著增加,且破骨细胞面积显著增大($P<0.01$,图 2F~H),提示激活 EGFR 能够促进破骨细胞分化。

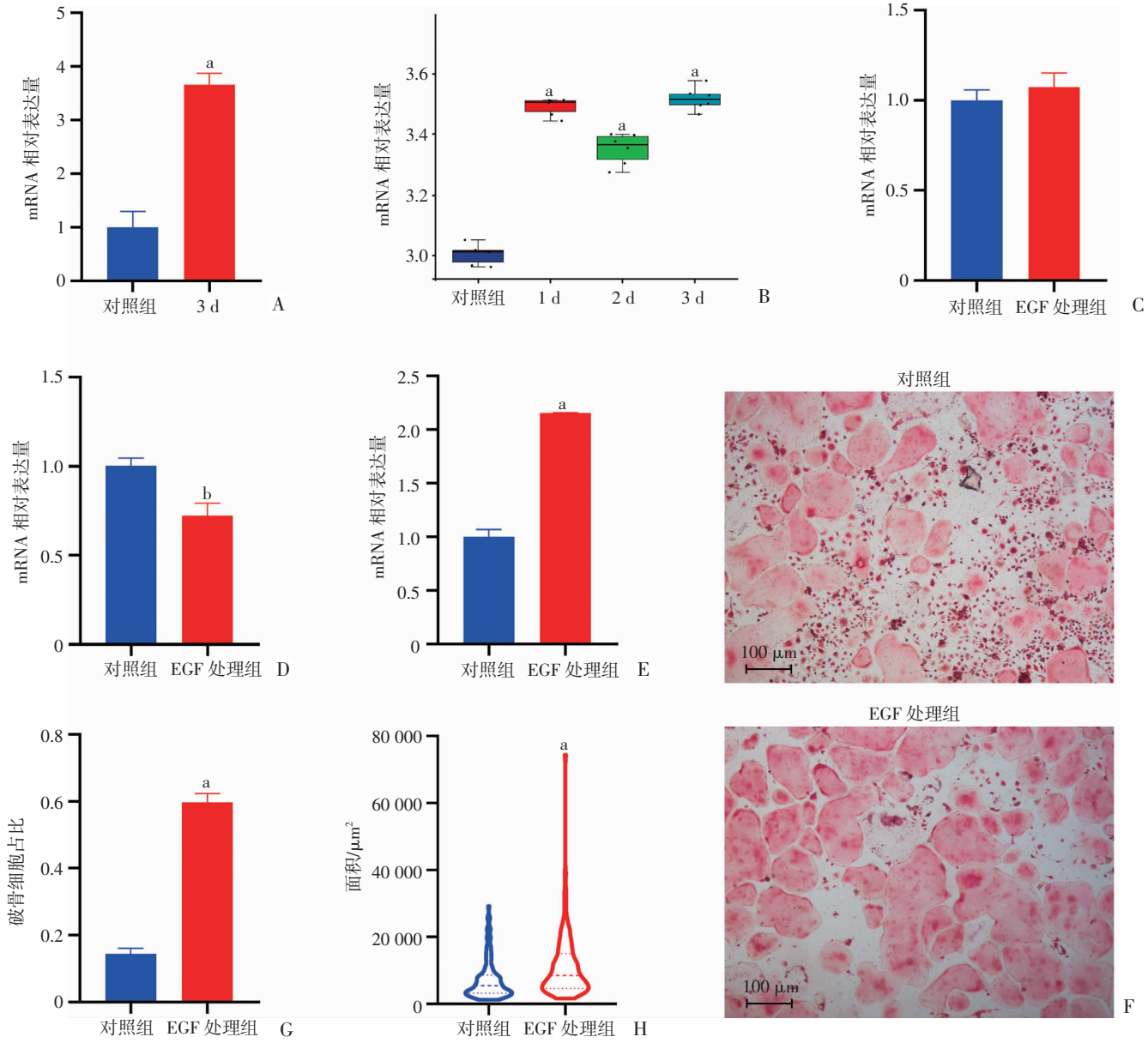
2.3 GO 富集分析 EGFR 与破骨细胞分化的相关性

为进一步探究 EGFR 与破骨细胞分化的相关性,采用 GSVA 的方法对转录组芯片数据 GSE176265 中信号通路进行差异富集分析。GSVA 富集分析结果显示:在 1 251 条通路中,共有 172 条通路表现为显著上调,158 条通路表现为显著下调。通路关联分析表明,EGFR 的表达量变化与 MAPK 信号通路、PINK1-Pakrin 介导的线粒体自噬、dectin-2 等多条通路呈现显著正相关($P<0.05$),而与 HMOX1、CDC20 降解、早期内膜 PIP 合成等多条通路呈现显著负相关($P<0.05$,图 3)。



A:显微镜观察破骨细胞分化期间的形态变化(TRAP 染色);B:RT-qPCR 检测 NFATC1、CTSK、MMP9 在 RANKL 诱导分化 3 d 后的 mRNA 相对表达量 a:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 破骨细胞分化过程 TRAP 染色及破骨细胞分化标志基因检测



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与对照组比较

A:RT-qPCR 检测破骨细胞分化 3 d 后 EGFR mRNA 相对表达量变化;B:测序数据中破骨细胞分化过程中 EGFR mRNA 表达量变化;C:EGF 刺激后 EGFR mRNA 表达量变化;D:EGF 刺激后 NFATC1 mRNA 相对表达量变化;E:EGF 刺激后 MMP13 mRNA 相对表达量变化;F:EGF 刺激下破骨细胞诱导分化 7 d 后的 TRAP 染色情况;G:EGF 刺激下破骨细胞诱导分化 7 d 后破骨细胞占总细胞的比值;H:EGF 刺激下破骨细胞诱导分化 7 d 后破骨细胞的面积分布情况

图 2 EGFR 激活对破骨细胞分化的影响

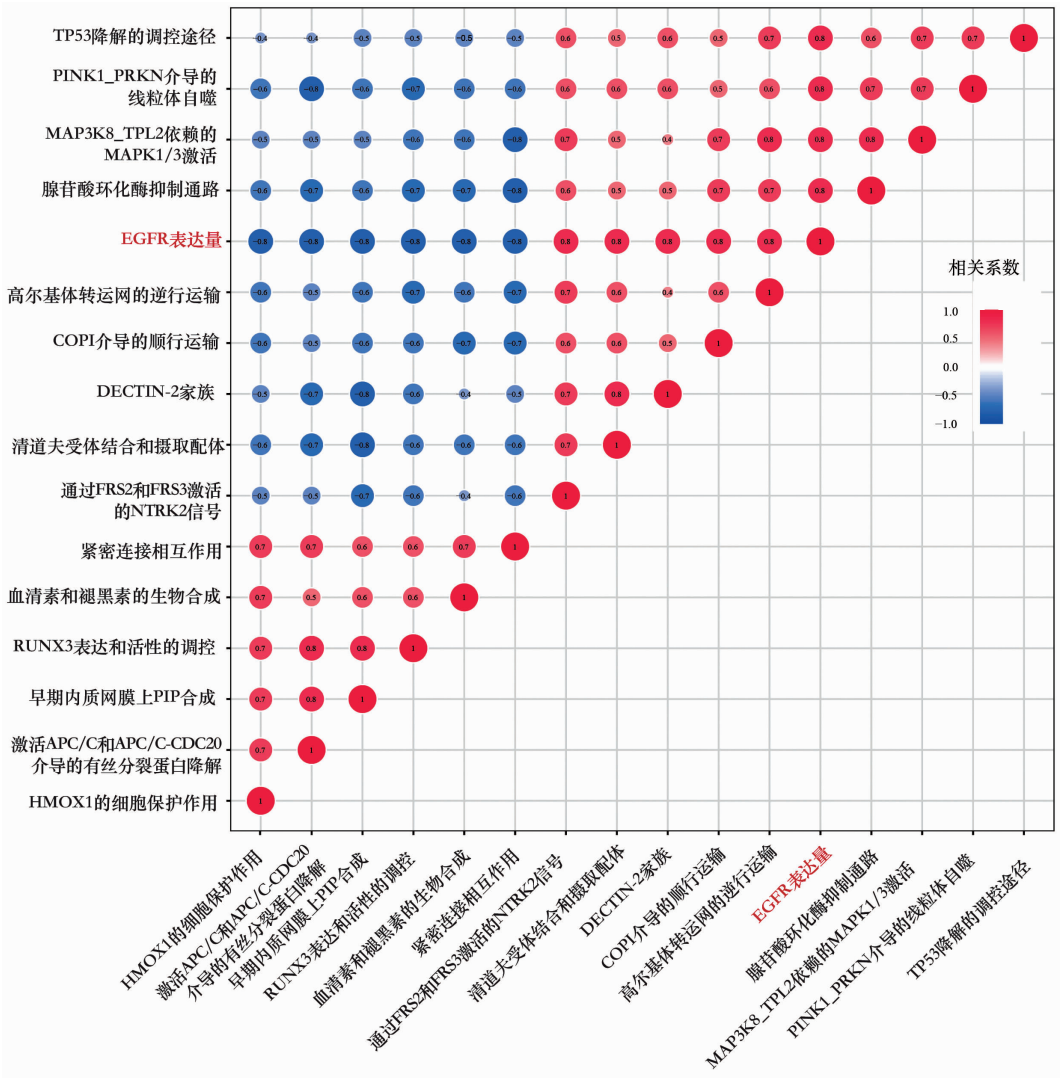


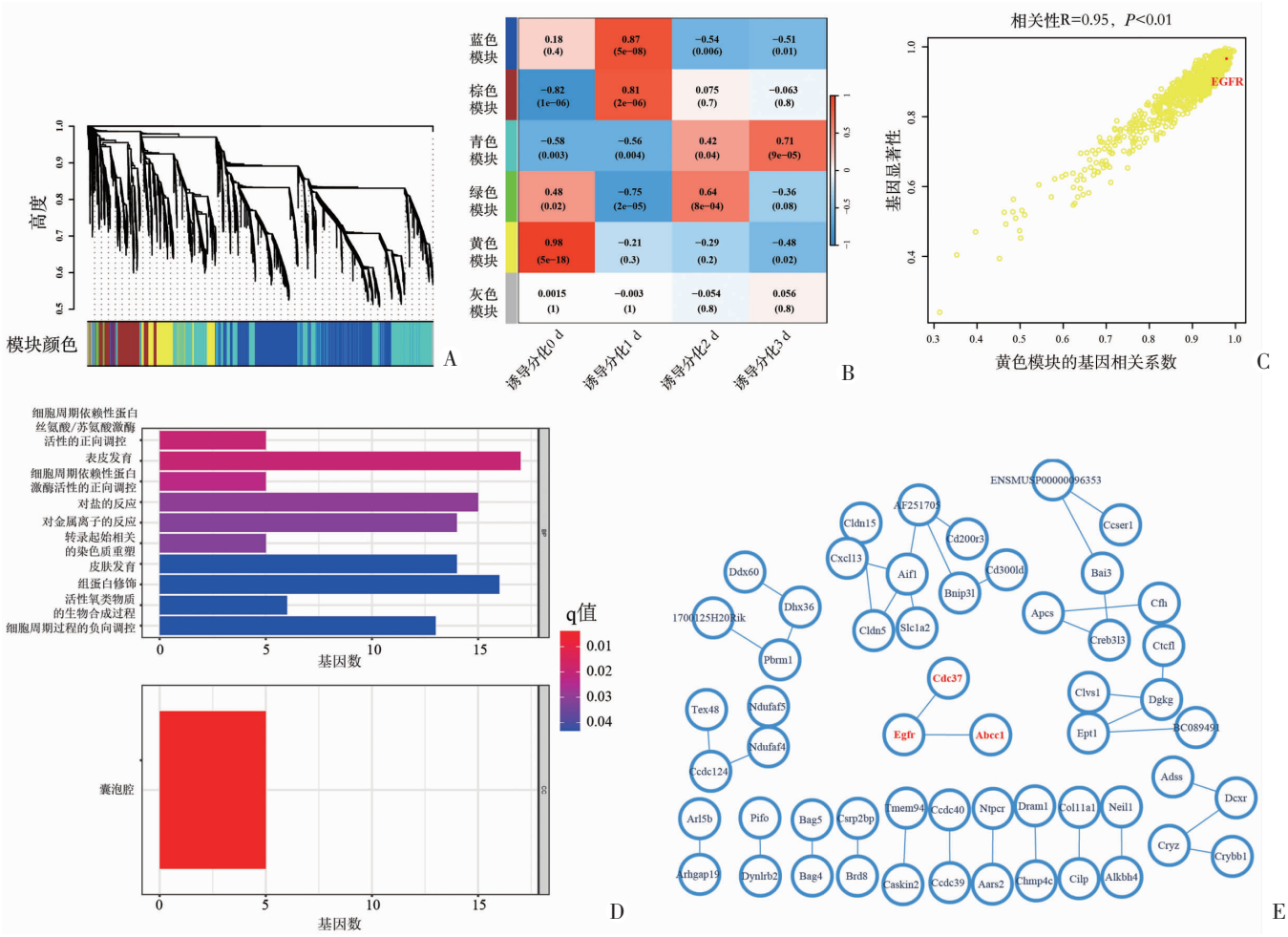
图 3 EGFR 表达量与破骨细胞分化期间相关通路的相关性分析

2.4 加权基因共表达网络结合 PPI 网络鉴定 EGFR 相关基因

为进一步探究 EGFR 在破骨细胞分化中潜在的调控分子,采用 WGCNA 对转录组芯片数据 GSE176265 进行了进一步分析。共表达网络共划分出蓝色、棕色、青色、绿色、黄色 5 个模块,分别包含 2 707、969、3 002、128、855 个基因(图 4A)。模块-表型关联图显示,包含 EGFR 的黄色模块与前破骨细胞时期呈现显著正相关(Pearson 相关系数为 0.98,$P<0.01$,图 4B),而与破骨细胞成熟期呈现显著负相关(Pearson 相关系数为 −0.48,$P<0.05$,图 4B)。黄色模块共包括 855 个基因以及 218 620 个共表达关系线,其中,654 个基因能够与 EGFR 形成基因共表达网络(Pearson 相关系数为 0.95,$P<0.01$,图 4C)。GO 富集分析显示,这些基因主要参与活性氧生物合成,细胞周期调控,盐和金属离子反应等多种生物学功能(图 4D)。随后将这些基因通过 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作网络图,结果显示 CDC37,ABCC1 与 EGFR 之间存在相互作用的关系,提示 EGFR 可能参与调控 CDC37 和 ABCC1(图 4E)。

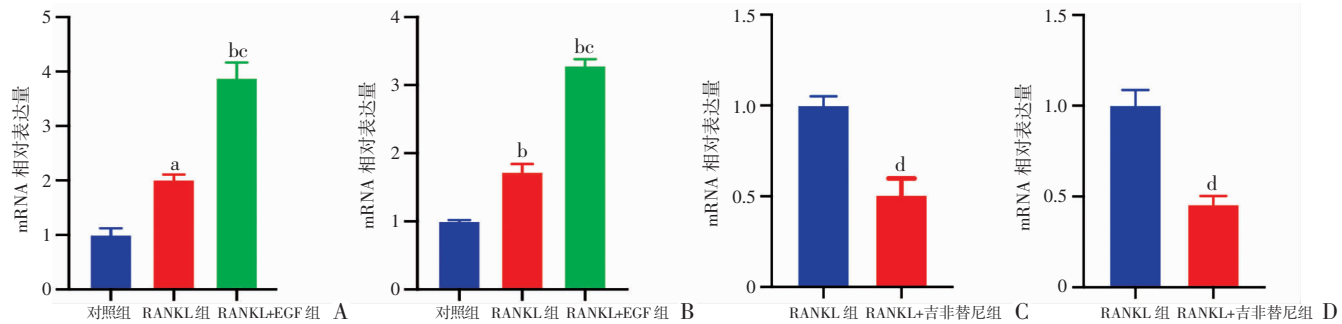
2.5 EGFR 调控破骨细胞分化中 CDC37 和 ABCC1 的表达

为探究 EGFR 对于 ABCC1 和 CDC37 的调控作用,继续在破骨细胞分化模型中进行检测。RT-qPCR 结果显示,ABCC1 和 CDC37 的表达量在 RANKL 诱导 3 d 后显著上升($P<0.05$,$P<0.01$),且外源添加 EGF 能够引起 ABCC1 和 CDC37 的表达量进一步上升($P<0.01$,图 5A、B)。在添加吉非替尼抑制 EGFR 信号后,对 ABCC1 和 CDC37 的表达水平进行检测,结果表明,外源添加吉非替尼显著抑制了 ABCC1 和 CDC37 在破骨细胞分化中的上升趋势($P<0.05$,图 5C、D),进一步证明 ABCC1 和 CDC37 在破骨细胞分化中的表达与 EGFR 信号相关。



A:WGCNA 模块聚类树状图;B:测序数据中各基因模块与诱导分化时间相关性热图;C:黄色模块中各基因与基因显著性分布图;D:黄色模块基因 GO 富集分析图;E:黄色模块 PPI 网络图

图 4　WGCNA 结合 PPI 网络对 EGFR 相关基因的鉴定结果



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与 RANKL 组比较

A:EGF 对破骨细胞分化中 *ABCC1* 的 mRNA 相对表达量的影响;B: EGF 对破骨细胞分化中 *CDC37* 的 mRNA 相对表达量的影响;C:吉非替尼处理对 *ABCC1* 的 mRNA 相对表达量的影响;D:吉非替尼处理对 *CDC37* 的 mRNA 相对表达量的影响

图 5　EGFR 对破骨诱导分化中 ABCC1 和 CDC37 的影响

3 讨论

EGFR 及其配体组成的信号转导网络在破骨细胞分化中具有重要作用。既往研究表明,EGFR 的表达水平在 RANKL 诱导的破骨细胞分化中显著上调,且体外抑制 EGFR 信号和敲低 EGFR 均可抑制破骨细胞分化[3]。而本研究发现,EGFR 的表达量在破骨细胞分化过程中显著上升,且其激活能够促进破骨细胞分化,与既往研究结论基本一致[3]。

综合以往的研究及本次 GSVA 富集分析,发现 EGFR 参与调控 NF-κB、AKT、MAPK 等多种信号通路。MAPK 和 NF-κB 信号通路的激活对于破骨细胞的成熟和分化具有重要的作用[8-9]。在体外模型中,p38 MAPK 能够在 RANKL 的刺激下诱导破骨细胞生成,并且特异性的抑制 p38 MAPK 的活性能够抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化[10]。同时,p38 MAPK 也是破骨细胞分化重要转录因子 NFATC1 和关键酶 CTSK 的主要调控因素。相比巨噬细胞和成骨细胞而言,破骨细胞具有相对较高的线粒体蛋白量和较低的 ATP 含量,提示线粒体在破骨细胞中具有独特的生理意义[11]。此外,EGFR 的同源配体可诱导 EGFR 同二聚化或异二聚化并导致细胞内酪氨酸残基磷酸化,从而激活下游通路 JAK-STAT3[12]。一项研究表明,STAT3 缺陷能够抑制线粒体自噬,并抑制破骨细胞的生成[13]。HONG 等[14]发现 Parkin 能够通过调控 NF-κB 信号通路促进破骨细胞分化,进一步表明线粒体自噬在破骨细胞中发挥了重要作用。

WGCNA 分析结合 PPI 网络分析提示 EGFR 与 CDC37 和 ABCC1 之间存在紧密联系,激活 EGFR 能够引起二者表达量显著上升,反之,抑制 EGFR 可以引起二者表达量显著下降。ABCC1 属于 ABC 转运体家族,该家族主要参与氨基酸、胆固醇、疏水药物等多种物质的跨膜转运,过表达 ABC 转运体能够减少细胞摄取药物和增加药物排出,从而减少药物在细胞质的浓度,最终引起药物抵抗。既往研究表明,ABC 转运体家族在破骨细胞分化中也发挥着重要作用。ABCC5 敲低降低了小鼠乳腺癌的骨转移以及骨损坏,并且伴有破骨细胞数量显著减少[15]。高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)能够通过上调 ABCG1 引起破骨细胞自噬增加,从而抑制破骨细胞分化。ABCC1 属于 ABC 转运体家族的 C 亚家族,其能够介导化疗药物转运出细胞,从而参与了多种肿瘤细胞的耐药过程。有研究表明,ABCC1 能够作为乳腺癌预后和死亡率指标,降低 ABCC1 活性能够引起乳腺癌细胞的增殖和迁移能力减弱[16]。然而,ABCC1 在破骨细胞分化中的作用机制尚不清楚,提示 ABCC1 可能是干预破骨细胞分化的新的潜在靶点。CDC37 是一个分子伴侣蛋白。目前研究发现,CDC37 与 EGFR 之间具有密切的联系。在胶质母细胞瘤中敲低 EGFR 能够引起 CDC37 磷酸化水平降低,进而导致下游信号通路无法正常激活[17]。CDC37 是一种分子伴侣,可以稳定蛋白激酶中的催化结构域,因此是蛋白磷酸化的广谱调节剂。CDC37 能够与 HSP90 形成复合物,辅助诸多蛋白激酶正确折叠为稳定的三维结构,保证其功能的正常发挥[18]。HSP90 是参与 c-Src 去磷酸化的分子伴侣,而 c-Src 在破骨细胞的存活中发挥关键作用[19]。因此,CDC37 可能通过调控 HSP90 进而间接影响破骨细胞分化。

综上所述,本研究发现 EGFR 能够促进破骨细胞分化且与多种信号通路显著相关。并且,通过生物信息学分析和生物学实验,发现 EGFR 在破骨细胞分化过程中上调 CDC37 和 ABCC1 表达水平,2 个分子可能参与 EGFR 对破骨细胞分化的调控,因而有望成为骨质疏松的治疗新靶点。然而,ABCC1 和 CDC37 在破骨细胞分化中发挥怎样的功能,以及 EGFR 如何调控二者表达有待后续更深入的研究阐明,对于三者在破骨细胞分化中所发挥的作用也应需进行进一步研究。

参考文献:

[1] STARK Z, SAVARIRAYAN R. Osteopetrosis[J]. Orphanet J Rare Dis, 2009, 4(1): 5. DOI: 10.1186/1750-1172-4-5.

[2] SCHNEIDER M R, SIBILIA M, ERBEN R G. The EGFR network in bone biology and pathology[J]. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(10): 517-524. DOI: 10.1016/j.tem.2009.06.008.

[3] YI T, LEE H L, CHA J H, *et al*. Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and survival through cross-talking with RANK signaling[J]. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 409-422. DOI: 10.1002/jcp.21511.

[4] DE LUCA A, CAROTENUTO A, RACHIGLIO A, *et al*. The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment[J]. J Cell Physiol, 2008, 214(3): 559-567. DOI: 10.1002/jcp.21260.

[5] LINDER M, HECKING M, GLITZNER E, *et al*. EGFR controls bone development by negatively regulating mTOR-signaling during osteoblast differentiation[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(6): 1094-1106. DOI: 10.1038/s41418-017-0054-7.

[6] MALTBAEK J H, CAMBIER S, SNYDER J M, *et al*. ABCC1 transporter exports the immunostimulatory cyclic dinucleotide cGAMP[J]. Immunity, 2022, 55(10): 1799-

1812.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.08.006.

[7] ROBEY R W, PLUCHINO K M, HALL M D, *et al*. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(7): 452-464. DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8.

[8] WADA T, NAKASHIMA T, HIROSHI N, *et al*. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease[J]. Trends Mol Med, 2006, 12(1): 17-25. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.11.007.

[9] THOUVEREY C, CAVERZASIO J. Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance[J]. Bonekey Rep, 2015, 4: 711. DOI: 10.1038/bonekey.2015.80.

[10] MATSUMOTO M, SUDO T, SAITO T, *et al*. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)[J]. J Biol Chem, 2000, 275(40): 31155-31161. DOI: 10.1074/jbc.M001229200.

[11] MIYAZAKI T, IWASAWA M, NAKASHIMA T, *et al*. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption[J]. J Biol Chem, 2012, 287(45): 37808-37823. DOI: 10.1074/jbc.M112.385369.

[12] HU B Y, ZOU T T, QIN W, *et al*. Inhibition of EGFR overcomes acquired lenvatinib resistance driven by STAT3-ABCB1 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2022, 82(20): 3845-3857. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-4140.

[13] ZHU L X, WANG Z J, SUN X Y, *et al*. STAT3/mitophagy axis coordinates macrophage NLRP3 inflammasome activation and inflammatory bone loss[J]. J Bone Miner Res, 2023, 38(2): 335-353. DOI: 10.1002/jbmr.4756.

[14] HONG S J, JUNG S, JANG J S, *et al*. PARK2 induces osteoclastogenesis through activation of the NF-κB pathway [J]. Mol Cells, 2022, 45(10): 749-760. DOI: 10.14348/molcells.2022.0058.

[15] MOURSKAIA A A, AMIR E, DONG Z F, *et al*. ABCC5 supports osteoclast formation and promotes breast cancer metastasis to bone[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(6): R149. DOI: 10.1186/bcr3361.

[16] LOW F G, SHABIR K, BROWN J E, *et al*. Roles of ABCC1 and ABCC4 in proliferation and migration of breast cancer cell lines[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7664. DOI: 10.3390/ijms21207664.

[17] CHOU S T, PATIL R, GALSTYAN A, *et al*. Simultaneous blockade of interacting CK2 and EGFR pathways by tumor-targeting nanobioconjugates increases therapeutic efficacy against glioblastoma multiforme[J]. J Control Release, 2016, 244(Pt A): 14-23. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.11.001.

[18] CALDERWOOD S K. CDC37 as a co-chaperone to HSP90 [J]. Subcell Biochem, 2015, 78: 103-112. DOI: 10.1007/978-3-319-11731-7_5.

[19] MARUYAMA K, FUKASAKA M, UEMATSU S, *et al*. Azacytidine-induced protein 2 (AZI2) regulates bone mass by fine-tuning osteoclast survival[J]. J Biol Chem, 2015, 290(15): 9377-9386. DOI: 10.1074/jbc.M114.631374.

(**收稿**:2023-12-22;**修回**:2024-06-21)

(编辑 张 维)