

骨钙素专题

· 综述 ·

骨钙素及其受体对能量代谢的调节机制

金实 赵玉岩 都健

【摘要】 骨钙素主要是由成熟的成骨细胞分泌的特异性的非胶原蛋白,可分为羧化骨钙素和非羧化骨钙素。越来越多的研究显示,骨钙素除了可以调节骨基质矿化和骨形成外,还可以增加胰岛素的分泌和胰岛 β 细胞增殖、减少内脏脂肪、改善胰岛素抵抗,与能量代谢密切相关。G 蛋白耦联受体 C 家族 6 组成员 A (GPCR6A) 为骨钙素的受体,参与了相关的机体生理反应。胰岛素信号通路对骨钙素合成起到了调节作用。骨钙素有望成为治疗 2 型糖尿病、肥胖症等代谢性疾病的新靶点。

【关键词】 骨钙素;非羧化骨钙素;GPCR6A;能量代谢

基金项目:辽宁省教育厅项目(L2015567);辽宁省科技厅公益项目(2014001016)

Regulatory mechanism for energy metabolism by osteocalcin and its receptors Jin Shi*, Zhao Yuyan, Du Jian. * Department of Endocrinology and Metabolism, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China

Corresponding author: Zhao Yuyan, Email: g572@sina.com; Du Jian, Email: dujianbox@126.com

【Abstract】 Osteocalcin is mainly secreted by mature osteoblasts as specific noncollagenprotein, which can be divided into carboxylated osteocalcin and uncarboxylated osteocalcin. More and more studies show that osteocalcin can improve energy metabolism by enhancing insulin secretion, increasing islet β cell proliferation, reducing visceral adipose tissue, and improving insulin resistance besides regulating bone matrix mineralization and bone formation. As the receptor of osteocalcin, G protein coupled receptor C group 6A takes part in the associated body physiological response. The insulin signaling pathway participates in the regulation of osteocalcin synthesis. Osteocalcin is expected to become a new target for the treatment of type 2 diabetes, obesity and other metabolic diseases.

【Key words】 Osteocalcin; Uncarboxylated osteocalcin; GPCR6A; Energy metabolism

Fund program: Project of Educational Commission of Liaoning Province of China(L2015567); Science and Technology Commission Commonweal Project of Liaoning Province of China(2014001016)

骨钙素也称为骨 γ -羧基谷氨酸蛋白或骨依赖维生素 K 蛋白,是由成熟成骨细胞、成牙质细胞及肥大软骨细胞分泌的一种特异性非胶原蛋白,占骨总蛋白的 1%~2%,是反映成骨细胞活性的特异而敏感的标志物。目前越来越多的遗传学及药理学研究证据显示,其还具有类似激素的作用。最新的研究通过骨钙素将骨的能量代谢需求和全身能量代谢平衡联系起来。本文对骨钙素调节能量代谢的最新研究结果进行了总结。

1 骨钙素及其受体概述

1.1 骨钙素的结构 骨钙素根据来源种属的不同,由 46~50 个氨基酸组成。人骨钙素 17、21、24 位上的谷氨酸残基在维生素 K 和二氧化碳依赖性羧化酶的作用下,羧化为羧化谷氨酸。羧化的骨钙素具有很强的结合羟磷灰石的能力,与骨的形成和生长有关;当机体维生素 K 摄入不足时,循环中将出现羧化不全骨钙素即无或有 1 个或 2 个羧化的谷氨酸残基。在酸性环境下,骨钙素分子中的羧化谷氨酸也可以发生脱羧。这种羧化不全或者重新脱羧的骨钙素被称为非羧化骨钙素。近些年的研究显示,非羧化骨钙素分泌到血液中,发挥类激素的作用,与全身的能量代谢有关。

1.2 骨钙素的受体 骨钙素发挥调节全身能量代谢的作用需要有相应受体介导。2004 年 Wellendorph 团

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.06.008

作者单位:110032 沈阳,中国医科大学附属第四医院内分泌代谢内科(金实,都健);110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院内分泌代谢内科(赵玉岩)

通信作者:赵玉岩,Email: g572@sina.com;都健,Email: dujianbox@126.com;

队命名了一种新的受体蛋白——G 蛋白耦联受体 C 家族 6 组成员 A (GPCR6A)。这种蛋白经研究证实,在肺、肝、心、肾、骨、睾丸、脑、骨及白细胞、单核细胞等中均有表达。后续的研究显示, GPCR6A 基因全敲除的小鼠表型与骨钙素缺失的小鼠基本相似,均表现为高血糖、糖耐量减低、体内脂肪堆积及胰岛素抵抗,同时还存在低睾酮水平导致去势,提示 GPCR6A 可能是骨钙素的受体^[1]。而后 Pi 等^[2]通过实验进一步证实了 GPCR6A 是羧化骨钙素及脱羧化骨钙素的受体,参与脱羧化骨钙素调节机体糖代谢的作用。最新的研究结果显示,羧化不全骨钙素可以增加高糖环境下 MC3T3-E1 成骨细胞上 GPCR6A 的表达,同时促进成骨细胞分化,提示羧化不全骨钙素可能通过 GPCR6A 改善高糖环境下外周组织的能量代谢^[3]。

2 骨钙素及其受体对能量代谢的调节作用

2.1 动物实验研究 Lee 等^[4]建立了骨钙素基因敲除(骨钙素^{-/-})小鼠模型,首先发现骨钙素^{-/-}小鼠表现为内脏脂肪堆积、血糖水平升高,且与野生型小鼠相比,骨钙素^{-/-}小鼠胰岛 β 细胞的质量、循环中胰岛素水平、胰岛的大小及胰岛 β 细胞增殖均明显下降,获得了骨钙素与能量代谢密切相关的启示。而后又有学者发现,表达于成骨细胞及睾丸支持细胞的胚胎干细胞磷酸酶(Esp)基因编码了一种受体样跨膜蛋白酪氨酸磷酸酶(osteoblastic protein tyrosine phosphatase, OST-PTP), Esp^{-/-}小鼠及成骨细胞特异性 Esp^{-/-}小鼠的表现与骨钙素^{-/-}小鼠正相反,表现为消瘦、血糖偏低和胰岛素敏感性增加。进一步研究显示,与对照组相比, Esp^{-/-}小鼠骨骼中骨钙素的表达水平及血清总骨钙素浓度无显著变化,但血清中非羧化骨钙素水平明显升高,提示 OST-PTP 抑制了骨钙素的羧化,且非羧化骨钙素是骨钙素调节能量代谢的活化形式。近些年的研究证实,每日腹腔注射或口服重组非羧化骨钙素同样可以改善实验动物血糖升高、胰岛素抵抗、胰岛素分泌下降等不良影响^[5-6]。最新的研究还发现,高脂饮食诱导肥胖的雌性小鼠在妊娠期间如口服非羧化骨钙素,可以有效改善后代的代谢异常^[7]。有科学家通过实验证实,骨钙素可以刺激野生型小鼠胰岛素的分泌,但却不能刺激 GPCR6A^{-/-}小鼠离体的胰岛细胞分泌胰岛素;骨钙素基因全敲除小鼠或胰岛 β 细胞 GPCR6A 基因选择性敲除的小鼠,均出现了胰岛 β 细胞数量及增殖相同程度的受损,提示 GPCR6A 作为骨钙素的受体介导并促进了胰岛 β 细胞增殖和胰岛素分泌,进而调节了机体的糖代谢^[8]。以上研究结果从动物水平证实,骨钙素及其受体可调节能量代谢,同时也为非羧化骨钙素今后

用于治疗肥胖症及 2 型糖尿病的可能性提供了动物实验证据。

2.2 细胞分子实验研究 科学家们进一步试图从细胞分子生物学角度探讨骨钙素调节能量代谢的机制。Sabek 等^[9]通过体外实验发现,非羧化骨钙素可以提高胰岛 β 细胞表面 K_{ATP}通道的 SUR1 亚单位,从而增加胰岛素分泌。Gao 等^[10]研究发现,非羧化骨钙素可以通过磷脂酶 C/蛋白激酶 C/Ras 蛋白/丝裂原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶/电压门控钾通道号通路,改善大鼠胰岛 β 细胞胰岛素的分泌。Mizokami 等^[5-6]发现,羧化不全骨钙素可以作用于小肠内分泌细胞,促进胰高血糖素样肽-1 的表达及分泌,进而促进 β 细胞增殖及胰岛素的分泌。Bcl-2 基因是重要的抗细胞凋亡的基因,硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)是胰岛细胞炎症反应过程的核心分子,在高糖环境下,胰岛细胞的 Bcl-2 基因表达下降, TXNIP 表达明显上调,参与了细胞凋亡,这也是高糖毒性的分子机制。有研究显示,应用羧化不全骨钙素干预,可减少高糖所致的 Bcl-2 基因的下调,显著减少 TXNIP 表达的增加,从而减少高糖所致的胰岛细胞的凋亡,在高糖环境下保护胰岛功能^[11]。最新的研究显示,羧化不全骨钙素可以促进胰岛素诱导的 C2C12 小鼠成肌细胞肌管的葡萄糖摄取。进一步信号通路研究显示,羧化不全骨钙素通过增加蛋白激酶 B 磷酸化,促进肌细胞葡萄糖转运蛋白 4 的转位,从而促进葡萄糖的摄取,改善了骨骼肌组织的胰岛素敏感性^[12-13]。Hill 等^[14]研究证实,无论是羧化骨钙素还是羧化不全骨钙素都能够通过剂量依赖的方式增加小鼠原代脂肪细胞基础状态的(也就是非胰岛素依赖的)葡萄糖摄取,也能够通过同样的方式增加胰岛素依赖的葡萄糖摄取,同时增加葡萄糖的氧化,从而提高了脂肪组织的胰岛素敏感性。由此,细胞分子水平的研究证实了骨钙素可以通过不同途径促进 β 细胞分泌胰岛素,增加胰高血糖素样肽-1 的表达和胰岛 β 细胞的增殖,改善高糖毒性所致的胰岛细胞凋亡,增加外周组织的胰岛素敏感性,从而改善全身的能量代谢。GPCR6A 作为 G 蛋白耦联受体,与配体骨钙素结合后参与上述调节能量代谢的反应。GPCR6A 使其耦联的 G 蛋白活化,然后再激活或抑制不同的下游效应分子,从而引起细胞状态的改变。最新的研究显示,外源性非羧化骨钙素可以增加人脐静脉内皮细胞胰岛素受体底物-1 和蛋白激酶 B 的磷酸化水平,通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/核因子- κ B 信号通路改善胰岛素信号转导,从而改善该细胞的胰岛素敏感性^[15]。但骨钙素与 GPCR6A 结合后,在不同细胞引起不同效应

的具体信号通路目前尚不清楚,需要进一步的实验研究证实。

2.3 流行病学研究 目前,在动物实验及细胞分子实验中已经证实骨钙素具有调节能量代谢的作用,由此推测骨钙素对于人类的相应生理功能可能也存在着调节作用。据此,科学家们进行了大量关于骨钙素的流行病学研究。研究显示,在不同人群中,血清骨钙素水平与空腹血糖、空腹胰岛素、稳态模型评估-胰岛素抵抗指数、体重指数及高脂血症呈负相关,非羧化骨钙素水平与腰臀比、HbA1c、稳态模型评估-胰岛素抵抗指数呈负相关^[15-17]。Sarkar等^[18]发现,未治疗的糖尿病患者及糖尿病前期者血清中的羧化不全骨钙素水平下降;且血清中羧化不全骨钙素水平越高,其稳态模型评估- β 细胞功能指数越高、 β 细胞的功能就越好。一项中国的横断面研究结果提示,低骨钙素水平可能是糖耐量异常及 2 型糖尿病的危险因素^[19]。运动可以增加循环中骨钙素的水平,同时可以增加胰岛素的敏感性和肌肉的力量^[20]。综上所述,在人体中骨钙素与能量代谢密切相关,有望成为预测或治疗糖尿病、肥胖症等代谢性疾病的新手段。

3 调节骨钙素表达及活性的因素及其对能量代谢的影响

3.1 胰岛素调节骨钙素的表达 Fulzele等^[21]发现,在成骨细胞缺乏胰岛素受体的小鼠模型中,骨钙素 mRNA 表达下降,其代谢表型与骨钙素缺乏的小鼠相似,提示胰岛素受体信号通路参与了成骨细胞骨钙素的合成。胰岛素受体可被 OST-PTP 抑制,研究显示, Esp^{-/-}小鼠的 OST-PTP 功能缺失,其抑制胰岛素受体磷酸化的功能减弱,使得胰岛素信号通路增强,增强的胰岛素信号通路会活化破骨细胞,造成骨吸收增加,使细胞外基质酸化,促进骨钙素脱羧活化,并促进脱羧后的骨钙素释放入循环,进一步参与能量代谢。有学者给成骨细胞胰岛素受体或骨钙素表达特异性缺失的小鼠喂以高脂饲料,发现这些小鼠的胰岛素抵抗程度较野生型小鼠更为严重,同时血清非羧化骨钙素的水平更低,提示低非羧化骨钙素水平与胰岛素抵抗密切相关,同时提示胰岛素受体后通路与骨钙素活化密切相关;进一步分子研究显示,高脂饮食所致的高脂肪酸水平导致了成骨细胞胰岛素受体的泛素化,造成成骨细胞的胰岛素抵抗,进而引起骨钙素活化能力的降低,因此,成骨细胞胰岛素受体后信号通路参与了骨钙素的合成和活化^[22]。叉头框转录因子 O 家族 (FoxOs) 是胰岛素作用的主要转录介质。有研究显示,胰岛素在成骨细胞内与受体结合后,通过抑制 FoxO1,减少骨保护

素合成,以及对核因子- κ B 受体活化因子配体-核因子- κ B 受体活化因子通路的阻断效应,促进破骨细胞的产生,使骨基质 pH 值降低,帮助羧化骨钙素脱羧,增加骨钙素的生物活性^[23]。FoxO1 可以与活性转录因子 4 协同促进 Esp 基因表达,上调 OST-PTP 水平,降低活化骨钙素的水平,从而降低小鼠糖耐量。近年有研究显示,雷帕霉素靶蛋白信号通路也对骨钙素的合成起调节作用。在小鼠的成骨细胞上通过消融 Tsc2 基因使雷帕霉素靶蛋白信号通路不受抑制,这时羧化不全骨钙素的水平升高 10 倍,同时也使羧化不全骨钙素变得不敏感。这种情况下的年幼小鼠表现为血糖水平降低,胰岛素水平升高;同情况下的老年小鼠表现为 β 细胞减少,糖耐量下降,血清胰岛素水平下降及 GPRC6A 水平下调^[24]。最新研究显示,在体内及体外实验中非羧化骨钙素均可以促进胰岛 β 细胞分泌 DLK1 (delta like-1 同系物),而 DLK1 通过减少成骨细胞中蛋白激酶 B 第 473 位丝氨酸磷酸化,抑制胰岛素介导的骨钙素活化及成骨细胞分化,提示 DLK1 是骨钙素-胰岛素反馈回路的负调节因子^[25]。以上研究结果提示,胰岛素及其受体后通路可显著调节骨钙素的合成、活化及 GPRC6A 的表达,骨钙素又可显著改善胰岛素的合成与分泌,进一步提示了胰岛素与骨钙素、胰腺和骨之间形成了内分泌循环。

3.2 其他影响骨钙素合成及活化的因素 有研究显示, FOS 相关抗原 2 (Fra-2) 在成骨细胞分化及成骨细胞合成骨钙素过程中扮演十分重要的角色。小鼠的成骨细胞如果过表达 Fra-2,循环中骨钙素的水平就会明显升高,脂联素水平就会下降,小鼠就会表现为体重下降,血糖水平下降,糖耐量及胰岛素水平改善;相反,如果特异性敲除成骨细胞上的 Fra-2 基因,小鼠就会表现出相反的状态^[26]。提示 Fra-2 是成骨细胞合成骨钙素的一个非常重要的转录因子,与骨调节全身能量代谢密切相关。维生素 K 依赖的 γ 谷氨酸羧化酶通过催化骨钙素上的 γ 谷氨酸羧化,调节骨钙素的活性。如在成骨细胞上将其基因敲除,会提高血清羧化不全骨钙素的水平,同时改善糖耐量异常及体内脂质水平^[27]。

4 展望

骨钙素作为成骨细胞分泌的一种蛋白质,参与了机体的能量代谢。骨也不再是以往传统意义上的激素依赖组织,而是具有内分泌功能的组织。目前尚不明确骨钙素在不同细胞改善能量代谢效应的机制及具体信号通路,需要进一步的实验研究证实。骨钙素也有望成为治疗 2 型糖尿病、肥胖症、脂肪肝等代谢性疾病的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Pi M, Chen L, Huang MZ, et al. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome[J]. PLoS One, 2008, 3(12): e3858. DOI:10.1371/journal.pone.0003858.
- [2] Pi M, Kapoor K, Ye R, et al. Evidence for osteocalcin binding and activation of GPRC6A in β -cells[J]. Endocrinology, 2016, 157(5): 1866-1880. DOI:10.1210/en.2015-2010.
- [3] Liu J, Yang J. Uncarboxylated osteocalcin inhibits high glucose-induced ROS production and stimulates osteoblastic differentiation by preventing the activation of PI3K/Akt in MC3T3-E1 cells[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(1): 173-181. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2412.
- [4] Lee NK, Sowa H, Hinoi E, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton[J]. Cell, 2007, 130(3): 456-469. DOI:10.1016/j.cell.2007.05.047.
- [5] Mizokami A, Yasutake Y, Gao J, et al. Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57375. DOI: 10.1371/journal.pone.0057375.
- [6] Mizokami A, Yasutake Y, Higashi S, et al. Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion[J]. Bone, 2014, 69: 68-79. DOI: 10.1016/j.bone.2014.09.006.
- [7] Kawakubo-Yasukochi T, Kondo A, Mizokami A, et al. Maternal oral administration of osteocalcin protects offspring from metabolic impairment in adulthood[J]. Obesity (Silver Spring), 2016, 24(4): 895-907. DOI:10.1002/oby.21447.
- [8] Wei J, Hanna T, Suda N, et al. Osteocalcin promotes β -cell proliferation during development and adulthood through Gprc6a[J]. Diabetes, 2014, 63(3): 1021-1031. DOI:10.2337/db13-0887.
- [9] Sabek OM, Nishimoto SK, Fraga D, et al. Osteocalcin effect on human β -cells mass and function[J]. Endocrinology, 2015, 156(9): 3137-3146. DOI:10.1210/EN.2015-1143.
- [10] Gao J, Bai T, Ren L, et al. The PLC/PKC/Ras/MEK/Kv channel pathway is involved in uncarboxylated osteocalcin-regulated insulin secretion in rats[J]. Peptides, 2016, 86: 72-79. DOI: 10.1016/j.peptides.2016.10.004.
- [11] Kover K, Yan Y, Tong PY, et al. Osteocalcin protects pancreatic beta cell function and survival under high glucose conditions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 462(1): 21-26. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.095.
- [12] Tsuka S, Aonuma F, Higashi S, et al. Promotion of insulin-induced glucose uptake in C2C12 myotubes by osteocalcin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 459(3): 437-442. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.123.
- [13] Levinger I, Lin X, Zhang X, et al. The effects of muscle contraction and recombinant osteocalcin on insulin sensitivity *ex vivo* [J]. Osteoporos Int, 2016, 27(2): 653-663. DOI: 10.1007/s00198-015-3273-0.
- [14] Hill HS, Grams J, Walton RG, et al. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes[J]. Horm Metab Res, 2014, 46(5): 341-347. DOI:10.1055/s-0034-1368709.
- [15] Guo Q, Li H, Xu L, et al. Undercarboxylated osteocalcin reverts insulin resistance induced by endoplasmic reticulum stress in human umbilical vein endothelial cells[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 46. DOI:10.1038/s41598-017-00163-2.
- [16] Chin KY, Ima-Nirwana S, Mohamed IN, et al. Serum osteocalcin is significantly related to indices of obesity and lipid profile in Malaysian men[J]. Int J Med Sci, 2014, 11(2): 151-157. DOI: 10.7150/ijms.7152.
- [17] Redondo MJ, Shirkey BA, Fraga DW, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hemoglobin A1c in children with recently diagnosed pediatric diabetes[J]. Pediatr Diabetes, 2017, [Epub ahead of print]. DOI:10.1111/pedi.12501.
- [18] Sarkar PD, Choudhury AB. Relationships between serum osteocalcin levels versus blood glucose, insulin resistance and markers of systemic inflammation in central Indian type 2 diabetic patients[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(12): 1631-1635.
- [19] Liang Y, Tan A, Liang D, et al. Low osteocalcin level is a risk factor for impaired glucose metabolism in a Chinese male population[J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(4): 522-528. DOI: 10.1111/jdi.12439.
- [20] Kim YS, Nam JS, Yeo DW, et al. The effects of aerobic exercise training on serum osteocalcin, adipocytokines and insulin resistance on obese young males[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2015, 82(5): 686-694. DOI:10.1111/cen.12601.
- [21] Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition[J]. Cell, 2010, 142(2): 309-319. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.002.
- [22] Wei J, Ferron M, Clarke CJ, et al. Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation[J]. J Clin Invest, 2014, 124(4): 1-13. DOI: 10.1172/JCI72323.
- [23] Vijayan V, Khandelwal M, Mangani K, et al. Homocysteine alters the osteoprotegerin/RANKL system in the osteoblast to promote bone loss: pivotal role of the redox regulator forkhead O1[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61: 72-84. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.004.
- [24] Riddle RC, Frey JL, Tomlinson RE, et al. Tsc2 is a molecular checkpoint controlling osteoblast development and glucose homeostasis[J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(10): 1850-1862. DOI: 10.1128/MCB.00075-14.
- [25] Abdallah BM, Ditzel N, Laborda J, et al. DLK1 regulates whole-body glucose metabolism: a negative feedback regulation of the osteocalcin-insulin loop[J]. Diabetes, 2015, 64(9): 3069-3080. DOI:10.2337/db14-1642.
- [26] Bozec A, Bakiri L, Jimenez M, et al. Osteoblast-specific expression of Fra-2/AP-1 controls adiponectin and osteocalcin expression and affects metabolism[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 23): 5432-5440. DOI:10.1242/jcs.134510.
- [27] Ferron M, Lacombe J, Germain A, et al. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions[J]. J Cell Biol, 2015, 208(6): 761-776. DOI:10.1083/jcb.201409111.

(收稿日期:2016-04-02)