

· 综述 ·

骨钙素对青春发育的作用

吴美瑶 夏维波

【摘要】 骨钙素影响睾酮的合成与分泌,因而亦会对男性青春发育的各方面产生影响,如性腺发育、精细胞凋亡及生长激增等,其在间质细胞上的相关受体及下游信号通路已得到了初步阐明。但尚未有证据支持骨钙素会对女性青春发育产生影响。同时,骨骼-睾丸正反馈系统的提出,对传统的下丘脑-垂体-性腺轴系统进行了补充,也为青春期相关疾病的研究和治疗提供了新的思路。

【关键词】 骨钙素;青春发育;下丘脑-垂体-性腺轴

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81670714)

Roles of osteocalcin in the development of puberty Wu Meiyao, Xia Weibo. Department of Endocrinology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Key Laboratory of Endocrinology, Nation of Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, Beijing 100730, China

Corresponding author: Xia Weibo, Email: xiaweibo@medmail.com.cn

【Abstract】 Osteocalcin has been proved to influence the synthesis and secretion of testosterone, and to play a unique role in male puberty development in many aspects, including gonadal development, spermatogenesis apoptosis and growth spurt. The receptor for osteocalcin which is expressed in leydig cells and its downstream signaling pathway have been identified. But there is no evidence to support osteocalcin will affect the female puberty development. The bone-testis positive feedback axis, a supplement to the traditional hypothalamic-pituitary-gonadal axis system, provides a new perspective on the research and treatment of puberty related disease.

【Key words】 Osteocalcin; Adolescent development; Hypothalamic-pituitary-gonadal axis

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81670714)

青春发育期是儿童由性不成熟期转为性成熟期的一个关键阶段,其首要特征是下丘脑-垂体-性腺轴的启动,导致第二性征萌现。对于大多数男孩来说,第二性征的初现体现在睾丸的增大,而乳房萌发则是大多数女孩进入青春期的首要标志,两性的性毛发育通常紧随其后。

在传统观点中,骨骼作为支撑及连结全身各处组织的“钢筋”结构,对各系统的功能维持和内部器官的保护至关重要。虽然已熟知骨骼远非一个静态器官,骨重建时刻在进行,但直到近几十年,研究者们才发现骨骼也是一个极重要的内分泌器官:骨骼产生的大量内分泌因子骨钙素可以促进胰岛素的分泌,并增加外周组织对胰岛素的敏感性,与能量代谢

密切相关^[1-2]。

性激素对骨量的维持作用是很明确的^[3-4]。根据内分泌反馈调节的原则和已知的骨骼内分泌作用猜想:骨亦可能通过某种机制对性腺产生调控作用^[3]。由于骨钙素在骨骼中大量表达,其成为研究者们关注的重点。Ocn基因敲除(Ocn^{-/-})的雄性小鼠表现出生育功能下降,初步证实了骨钙素调控生殖系统的可能^[5]。2011年,Oury等^[6]发现成骨细胞分泌的骨钙素对性腺轴有重要影响,更为骨钙素对性腺轴的调控提供了有力证据。既然青春发育以性腺轴的启动为标志,那么骨钙素又会对青春发育产生怎样的影响呢?现就相关内容综述如下。

1 骨钙素对男性青春发育的影响

1.1 影响间质细胞合成及分泌睾酮 下丘脑-垂体-睾酮轴的启动是男性青春发育的始动因素,如果青春早期缺乏睾酮,会对肌肉的质量、骨骼的强度和性腺成熟、声音、胡须、腋毛等第二性征发育产生不利的影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.06.009

作者单位:100730 北京,中国医学科学院,北京协和医学院,北京协和医院内分泌科,国家卫生和计划生育委员会(卫生部)内分泌重点实验室

通信作者:夏维波,Email:xiaweibo@medmail.com.cn

Oury 等^[6]发现,原始成骨细胞可以生成一种促进睾丸间质细胞分泌睾酮的物质,同时,Ocn 基因表达缺失的成骨细胞会丧失这种能力,补充外源性骨钙素之后可恢复,这些体外实验结果证明了成骨细胞中促睾酮分泌的物质是骨钙素。为了验证体外结果,研究者们又检测了 Ocn^{-/-}小鼠和胚胎干细胞磷酸酶基因敲除小鼠(Esp^{-/-}小鼠,ESP可促进骨钙素羧基化以抑制其作用)中睾酮的含量,与野生型小鼠相比,Ocn^{-/-}小鼠体内的睾酮含量明显下降,而 Esp^{-/-}小鼠体内的睾酮含量明显升高,这些证据明确支持了骨钙素可以影响睾酮分泌,同时这种影响在一定范围内呈剂量依赖性。由于在睾丸局部几乎检测不到 Ocn 基因的表达,研究者们特异性地抑制了成骨细胞表达骨钙素,观察到循环睾酮水平明显下降,而若仅抑制间质细胞表达骨钙素,循环睾酮水平则不受影响,这表明调控睾酮表达的骨钙素来自成骨细胞。

在人群中也观察到了循环骨钙素水平与睾酮含量有明确的相关性,尤其见于青春期中期的男孩^[7]。然而骨钙素缺乏会导致青春期男孩出现何种临床表现尚未见报道。

有趣的是,骨钙素并不影响雄性小鼠分泌雌二醇或孕酮,但 Ocn^{-/-}小鼠体内循环雌二醇含量却有所增加(仍在正常范围内)^[6]。研究者们推测原因可能是 Ocn 基因的失活使脂肪含量增加^[8]。因脂肪细胞含有芳香化酶,增加的睾酮通过芳香化作用转化为更多的雌激素。

另一方面,人们观察到 Ocn^{-/-}小鼠体内黄体生成素(LH)水平升高,可能的原因是骨钙素-睾酮轴与促性腺激素释放激素(GnRH)-LH-睾酮轴独立平行地存在,通过各自的受体协同参与对睾酮的调控^[6]。Kirmani等^[7]测定了 56 名男孩(4~20岁)的睾酮及骨钙素水平,发现他们在骨龄 11 岁时睾酮含量开始增加,骨龄 14 岁时骨钙素含量达到峰值,因此以这两个骨龄为分界将男孩按骨龄分成 3 组。在 11~14 岁年龄组观察到睾酮水平与骨钙素水平明显相关,而在另外两组则没有观察到这种相关性。依据 LH 分泌规律,LH 应在骨龄 11 岁始增加,且具昼夜节律性,至 14 岁达成人水平。因此研究人员作出推论:自骨龄 11 岁起,骨钙素对睾酮的分泌起主导性的调节作用,直至 14 岁左右 LH 达成人水平。进一步的研究证实了这一猜想^[9]。

对正常人群(25~86岁)和骨病人群(18~85岁)的研究,证实了骨钙素与睾酮的相关性^[10]。然而 Schwetz 等^[11]却发现,骨钙素在人体中调控睾酮的

作用并没有像小鼠中那么显著,在不育男性患者中未显示出骨钙素含量与精子质量之间的相关性。这种矛盾的结论可能与骨钙素在不同年龄分泌量的不同有关,具体原因还有待进一步研究。对不育男性人群的研究中只测量了骨钙素与精子质量的相关性,未来的研究中还可通过给予骨钙素治疗观察是否有正向的改善作用。

基于以上研究推测:高骨转换时的高骨钙素水平会导致高睾酮水平,这一推测被未控制的甲状腺功能亢进症人群证实。这类人群的骨转换率非常高,血清学试验证明他们体内睾酮和骨钙素水平升高,且睾酮与骨钙素含量呈现明显的相关性^[12]。另一方面,2 型糖尿病男性患者的骨钙素含量较低,他们的血清游离睾酮含量与未羧化骨钙素含量呈正相关^[13]。因此在疾病人群中,也观察到了骨钙素与睾酮的相关性。

1.2 影响性腺及附属结构的发育 青春期男性睾丸和阴囊体积增大,曲精小管的管壁扩大,精原细胞开始发育,产生精子。青春期开始 3 年左右,阴茎的长度和直径增加,直至性发育成熟。前列腺、精囊腺、尿道球腺等附属腺体在青春发育开始后迅速发育并分泌液体,出现遗精。

研究者们发现在 Ocn^{-/-}小鼠中,睾丸大小及重量下降,附睾及精囊的重量也显著减少;反之, Esp^{-/-}小鼠体内因骨钙素浓度增加,睾丸大小及重量也相应增加,附睾及精囊亦然。且这种降幅或增幅随时间增加而变大^[6]。虽然性腺形态明确受骨钙素的调节,且睾丸间质细胞与间质面积的比值减小,同时伴有睾丸小管上皮细胞体积缩小,但间质细胞的数量不受影响;若体内循环骨钙素增加则会有完全相反的效果^[6]。

由上可见,骨钙素会促进雄性小鼠睾丸及其附属结构的生长和成熟。Ocn^{-/-}小鼠性腺脂肪含量下降,可能是导致性腺体积下降的因素之一,但补充骨钙素之后脂肪含量并没有回升^[14]。提示骨钙素最可能通过影响睾酮含量的变化对青春期性腺及附属结构发育产生影响。

1.3 影响精细胞的凋亡和生育能力 研究者们观察到 Ocn^{-/-}雄性小鼠的睾丸内精细胞数量下降显著,这是由于骨钙素的缺乏使精细胞的凋亡整整增加了 1 倍^[6]。但生殖细胞的增殖、精子的活力及形态、死精比例均不受骨钙素影响。与野生型母鼠杂交实验显示,Ocn^{-/-}公鼠的后代数是野生型公鼠的一半,生育频率也明显下降^[6]。

之前的研究表明,睾酮可抑制精细胞的凋亡。

Oury 等^[6]也发现,在 $Ocn^{-/-}$ 小鼠生精周期的 VI~ VII 期,精细胞凋亡的速度最快,而这一时期正是睾酮发挥抑制凋亡作用最显著的时期。这种抑制精细胞凋亡的作用同时需要支持细胞的参与,因为生殖细胞本身不表达睾酮受体^[15]。

因此,骨钙素可减少青春发育后精细胞的凋亡,维持男性正常的生育能力。

2 骨钙素对女性青春发育的影响

目前没有证据表明,骨钙素会对女性的性腺轴激素、性腺及附属器、生殖能力、第二性征等方面产生影响。Oury 等^[6]发现,骨钙素亦不会促进离体卵巢释放更多的雌二醇、孕酮,抑或睾酮。体内实验中, $Ocn^{-/-}$ 雌性小鼠的生殖能力、卵巢重量、子宫形态、卵泡数量和循环中的性激素含量均正常,卵泡细胞中也尚未发现 G 蛋白耦联受体 C 家族 6 组成员 A(GPRC6A) 基因表达。

3 骨钙素对青春生长激增的影响

青春期生长激增是指生长速度达到峰值,多出现于青春期中期,与终身高密切相关。生长激增的调控,在女孩中主要得益于雌二醇、雄烯二酮及生长激素;在男孩中则是雌二醇、睾酮及生长激素起主要作用。睾酮可增强骨膜与骨的紧密贴合,而雌激素的功能与之相反,这解释了为什么男性在青春期发育时期骨骼会生长得比女性更为粗大,高分辨外周定量计算机断层扫描也证明了睾酮是男孩骨周膜微环境的独立预测因素^[7,16]。

骨钙素可使青春期男性循环睾酮含量增加,而睾酮的增加会促进骨量的增加,进一步增加骨钙素的含量,因此青春期男性的骨-睾酮轴会形成一个正反馈模式,促进生长激增的发生。

Kirmani 等^[7]发现,青春期中期男孩的骨钙素水平主导了睾酮的含量,随着睾酮含量的增加,骨膜周径也在不断增加,直到骨钙素含量达到峰值。使用高分辨外周定量计算机断层扫描观察发现,男孩在青春发育过程中,骨体积分数、小梁骨的数量和厚度明显增加,而女孩在青春发育阶段以上参数未见明显增加,此结果与睾酮及胰岛素样生长因子-1 含量的变化相关^[16]。

这种骨骼-睾丸的正反馈调节是一种新发现的反馈系统,一定程度上决定了不同性别中青春期骨骼发育的差异。

4 骨钙素的受体及下游信号通路

研究发现,骨钙素作用于睾丸间质细胞后,间质细胞中 cAMP 的含量明显增加,而其余常见的第二信使含量均未观察到有意义的变化,于是推测 cAMP 是

骨钙素作用通路上的一员^[6]。因此,间质细胞上的作用靶点很快被锁定在了 GPRC6A 蛋白上。其作为骨钙素的一种受体,目前发现它只存在于睾丸上而在卵巢上无表达;它同时也是氨基酸、钙(Ocn 辅助下)、雄激素、人绒毛膜促性腺激素(hCG)作用的靶点;在雄性 GPRC6A $^{-/-}$ 小鼠中观察到了性腺功能减退的现象^[17-19]。生物化学和基因学方法证实,在人和鼠的睾丸间质细胞上均有 GPRC6A 基因的表达,但在支持细胞、生殖细胞和卵巢的卵泡细胞上没有表达^[6]。

在先前的报道中,cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)可作用于睾丸相关合成酶类固醇合成快速调节蛋白基因、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解基因、3 β -羟基类固醇脱氢酶基因的启动子区域^[20]。CREB 是否为骨钙素下游通路上的成员呢? Oury 等^[6]发现,骨钙素作用于间质细胞后,CREB 蛋白的磷酸化增加,因此推测 CREB 是 cAMP 下游的信号分子。同时,基因敲除实验观察到 CREB $^{-/-}$ 小鼠睾丸内与睾酮合成相关的酶的表达下降^[6]。

促性腺激素调节的睾丸 RNA 解旋酶(GRTH)基因是生精过程中很重要的调节基因。它通过抑制细胞凋亡蛋白酶的活性,抑制精细胞的凋亡,而它在间质细胞和生殖细胞上的表达均受睾酮的调控^[21]。在 $Ocn^{-/-}$ 小鼠和 CREB $^{-/-}$ 小鼠睾丸内,研究者们观察到 GRTH 下降,细胞凋亡蛋白酶含量增加;在 Esp $^{-/-}$ 小鼠中则观察到相反的结果^[6]。

至此,骨钙素影响男性性腺轴发育及生育功能的分子机制渐趋明朗:骨钙素作用于睾丸的间质细胞上的 GPRC6A,通过 cAMP 使 CREB 磷酸化,CREB 再作用于睾酮合成酶表达的启动子区域,增加睾酮的生成;而充足的睾酮又增加了间质细胞上 GRTH 的表达,使细胞凋亡蛋白酶生成减少,从而抑制精细胞的凋亡。

人群研究中发现,外周睾丸功能不全的患者存在 GPRC6A 基因的突变^[9]。但睾丸功能不全是否由该基因突变所致还未得以确认。

骨钙素受体及下游信号通路的阐述为骨钙素在其他部位的作用机制研究打下了良好的基础。

5 总结及展望

目前有明确的证据表明,骨钙素通过影响 GPRC6A 介导的 CREB 磷酸化过程影响间质细胞对睾酮的合成,对男性青春发育产生了重要影响。但尚未有证据支持骨钙素会对女性青春发育的各个方面产生影响。

虽然在男性青春期收集到了骨钙素可调控睾酮

含量的明确证据,但骨钙素在青春发育不同阶段分泌的量的差异仍没有一个定量的结论,因此无法精确地说明骨钙素对青春发育的哪些具体阶段施加了影响。

在骨钙素对睾酮分泌的调节中,传统的下丘脑-垂体-性腺轴发挥着更重要的作用。在成骨细胞活跃及骨量增加的人群中也并不是都能观察到睾酮含量增加的现象。能否通过 Ocn 基因表达缺陷的人群进一步论证骨钙素的作用是下一步研究可以思考的问题。目前也并没有更多的研究关注于骨钙素对第二性征各个表现的影响。既然青春期同时存在两种调节性腺功能的内分泌轴,能否通过抑制性腺轴反馈性地促进骨钙素对性腺功能的影响,以构建更好的疾病研究模型呢?骨钙素会成为一种有前景的新型药物吗?还有许多问题等待优化和解答。因此,骨钙素对人类青春发育的意义还有待进一步的探究。

参 考 文 献

- [1] Kanazawa I, Yamaguchi T, Tada Y, et al. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes [J]. *Bone*, 2011, 48 (4): 720-725. DOI:10.1016/j.bone.2010.12.020.
- [2] Saleem U, Mosley TH Jr, Kullo IJ. Serum osteocalcin is associated with measures of insulin resistance, adipokine levels, and the presence of metabolic syndrome [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (7): 1474-1478. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.204859.
- [3] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts [J]. *Cell*, 2007, 130 (5): 811-823. DOI:10.1016/j.cell.2007.07.025.
- [4] Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, et al. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86 (8): 3555-3561. DOI:10.1210/jcem.86.8.7736.
- [5] Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice [J]. *Nature*, 1996, 382 (6590): 448-452. DOI:10.1038/382448a0.
- [6] Oury F, Sumara G, Sumara O, et al. Endocrine regulation of male fertility by the skeleton [J]. *Cell*, 2011, 144 (5): 796-809. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.004.
- [7] Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ 3rd, et al. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26 (9): 2212-2216. DOI:10.1002/jbmr.421.
- [8] Liu JM, Zhao HY, Zhao L, et al. An independent positive relationship between the serum total osteocalcin level and fat-free mass in healthy premenopausal women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98 (5): 2146-2152. DOI:10.1210/jc.2013-1112.
- [9] Oury F, Ferron M, Huizhen W, et al. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (6): 2421-2433. DOI:10.1172/JCI65952.
- [10] Hannemann A, Breer S, Wallaschofski H, et al. Osteocalcin is associated with testosterone in the general population and selected patients with bone disorders [J]. *Andrology*, 2013, 1 (3): 469-474. DOI:10.1111/j.2047-2927.2012.00044.x.
- [11] Schwetz V, Gumpold R, Graupp M, et al. Osteocalcin is not a strong determinant of serum testosterone and sperm count in men from infertile couples [J]. *Andrology*, 2013, 1 (4): 590-594. DOI:10.1111/j.2047-2927.2013.00095.x.
- [12] Zhong N, Xu B, Cui R, et al. Positive correlation between serum osteocalcin and testosterone in male hyperthyroidism patients with high bone turnover [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124 (7): 452-456. DOI:10.1055/s-0042-107944.
- [13] Kanazawa I, Tanaka K, Ogawa N, et al. Undercarboxylated osteocalcin is positively associated with free testosterone in male patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24 (3): 1115-1119. DOI:10.1007/s00198-012-2017-7.
- [14] Yoshikawa Y, Kode A, Xu L, et al. Genetic evidence points to an osteocalcin-independent influence of osteoblasts on energy metabolism [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26 (9): 2012-2025. DOI: 10.1002/jbmr.417.
- [15] De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, et al. A sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (5): 1327-1332. DOI:10.1073/pnas.0308114100.
- [16] Kirmani S, Christen D, van Lenthe GH, et al. Bone structure at the distal radius during adolescent growth [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24 (6): 1033-1042. DOI:10.1359/jbmr.081255.
- [17] 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.
- [18] Pi M, Parrill AL, Quarles LD. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (51): 39953-39964. DOI:10.1074/jbc.M110.158063.
- [19] Wellendorph P, Hansen KB, Balsgaard A, et al. Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-alpha-amino acid receptor with preference for basic amino acids [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67 (3): 589-597. DOI:10.1124/mol.104.007559.
- [20] Zhang X, Odom DT, Koo SH, et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (12): 4459-4464. DOI:10.1073/pnas.0501076102.
- [21] Tsai-Morris CH, Sheng Y, Gutti R, et al. Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) gene: cell-specific expression and transcriptional regulation by androgen in transgenic mouse testis [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109 (6): 1142-1147. DOI:10.1002/jcb.22493.

(收稿日期:2016-09-14)