

• 综 述 •

骨质疏松症的生化诊断

薛 延

骨在整个生命过程中都具有新陈代谢的活性,骨形成,骨吸收和静止三个阶段构成了骨再建的全过程。骨再建的速率即骨形成与骨吸收的速率即称为骨转换率,破骨细胞清除旧的矿物质,成骨细胞形成类骨质并进行矿化。因此骨代谢的过程往往能反映破骨细胞与成骨细胞的活动及骨基质,骨矿物质的变化。骨密度及骨组织形态计量学的测定为骨质疏松的诊断治疗提供了可靠的依据,而无创伤性的、灵敏和特异的生化检查对于骨质疏松这种“无声无息”疾病的早期诊断,鉴别诊断,分型,预防和治疗也是不可缺少的。

1 与骨代谢有关的生化检查

1.1 与骨矿有关的生化检查

骨是由骨矿物质与骨基质两大部分组成。由于骨细胞的活动,新骨不断形成,旧骨不断被沉积到骨上,同时又不断地从骨中释放到血液循环中。通过测定血、尿、便中这些矿物质的含量可间接了解骨代谢的状况。

骨矿物质主要是由无定形钙磷混合物和钙磷羟磷灰石晶体构成,而镁、锌、铜、锰、氟、铝、硅、锶等元素也参与骨代谢。最常见的骨矿成份

的生化检查见表1、2。

表1 与骨矿物质有关的生化指标

		参考值	
血清:		mg/dl	mmol/L
离子钙	新生儿	4.3~5.1	1.07~1.27
	成人	4.48~4.92	1.12~1.23
总钙	儿童	8.8~10.8	2.2~2.7
	成人	8.4~10.2	2.1~2.55
无机磷	儿童	4.5~5.5	1.45~1.78
	成人	2.7~4.5	0.87~1.45
	>60岁男	2.3~3.7	0.74~1.2
	女	2.8~4.1	0.9~1.3
铁	1.3~2.1	0.65~1.05	
	(mEq/L)	(mmol/L)	
		mg/d	nmol/d
尿钙		100~300	2.5~7.5
尿磷		406~1313	13~42
尿铁		73~122	3.0~5.0

1.2 与骨形成有关的生化检查

由表3可见,反映骨形成的生化指标主要有总ALP和骨ALP,骨钙素及I型前胶原展开肽等九种。

表2 血清钙调节激素

25 羟维生素 D ₃ 夏季	15~80ng/ml	37~200nmol/L
冬季	14~42ng/ml	35~105nmol/L
1,25 双羟维生素 D ₃	25~45pg/ml	12~46μmol/L
24,25 双羟维生素 D ₃	1~2ng/ml	
甲状旁腺激素	全片段	10~65 pg/ml(美国 Nichols)
	中段	50~330 pg/ml(美国 Nichols)
	N端	8~24 pg/ml(美国 Nichols)
	C端	286±93pg/ml(日本荣研公司),21~50岁
		402±85pg/ml(日本荣研公司),51~70岁
降钙素	男	<38pg/ml(美国 Nichols)
	女	<17pg/ml(美国 Nichols)
	成人	73.9±5.3pg/ml(日本荣研公司)

表 3 与骨代谢有关的生化指标

骨形成	骨吸收
血清	血浆与血清
1. 总碱性酶 (ALP) 和骨碱性磷酸酶 (BALP)	1. 抗酒石酸盐酸性磷酸酶 (TRAP)
2. 骨钙素 (osteocalcin, BCP)	2. γ 羧基谷氨酸 (γ -carboxyglutamic acid, GLA)
3. I 型前胶原羧基端前肽 (PICP)	3. I 型胶原交联羧基末端肽 (Type I Collagen Cross-linked C-telopeptide, ICTP)
4. 骨结合素 (osteonectin)	尿
5. 骨唾液酸蛋白 (Bone specific Sialoproteins, BSP)	4. 尿总及游离羧脯氨酸 (HOP)
6. 骨蛋白聚糖 (Bone Proteoglycans, BPG)	5. 羟赖氨酸糖甙 (HOLG)
7. 基质 γ -羧基谷氨酸蛋白 (Matrix GLA Protein, MGP)	6. 胶原吡啉交联 (Pyridinoline, Pyr) 及脱氧胶原吡啉交联 (D-Pyr)
8. α_2 -HS 糖蛋白 (α_2 -HS glycoprotein)	7. I 型胶原交联氨基末端肽 (Type I Collagen Cross-linked N-telopeptide, NTX)
9. 骨特异性磷蛋白 (Bone specific Phosphoprotein)	8. 钙与肌酐比值 (Ca/Cr)

1.2.1 血清总碱性磷酸酶 (TALP 或 ALP) 和骨碱性磷酸酶 (BALP) ALP 和 BALP 是最常用的评价骨形成和骨转换的指标。总 ALP 由骨、肝、肠、肾、胎盘和 Regan, Nagao 等同工酶组成, 因此特异性不强。血清中 ALP 有 50% 来源于骨。骨 ALP 是由成骨细胞分泌, 其半衰期为 1~2 天; 另一半主要来源于肝脏, 来源于小肠仅占百分之几, 其半衰期为 1 小时, 来源于胎盘的 ALP 半衰期为 7 天。

以对硝基苯磷酸盐作底物血清总 ALP 的参考值, 婴儿为 50~165U/L, 儿童为 20~150U/L, 成人为 20~75U/L。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳和热失活法可测定骨 ALP, 为了提高 ALP 检测的灵敏性和特异性, 目前获得成功的是用单克隆抗体来识别骨 ALP^[2], 健康成人 (20~79 岁) 骨 ALP 为 $11.8 \pm 4.3 \mu\text{g/L}$ ($n=478$)。Delmas 发现绝经后妇女骨 ALP 比总 ALP 明显增高, 富田明夫等发现绝经后妇女腰椎 (L2~4) 骨矿含量与血清 ALP 呈负相关^[3]。

总与骨 ALP 增高见于: 佝偻病, 软骨病, 甲亢, 甲旁亢, 骨转移癌, 畸形性骨炎, 氟骨症及各种肝病患者。但肝胆管疾病时总 ALP 增高, 骨 ALP 正常; 骨折与高转换率的骨质疏松患者, 其改变与尿 HOP 呈正相关, 骨 ALP 可用于骨转移癌患者病程和治疗效果的监测。

1.2.2 血清骨钙素 (osteocalcin 或 Bone Gla protein 简称 BGP) BGP 是由成骨细胞合成, 占

非胶原蛋白的 15~20%, 完整骨钙素由 49 个氨基酸成, 含有三个 (17, 21 和 24 位) 依赖于维生素 K 的 γ -羧基谷氨酸, 其高分子形式分子量为 9.0KD, 占 80%, 低分子形式分子量为 5.8KD 占 20%。骨钙素是骨钙素基因转录和表达的产物。人的完整 BGP 可以用胰蛋白酶水解成三个片段, 即 N 末端 (1~19 氨基酸), 中段 (20~43 氨基酸) 和 C 末端 (44~49 氨基酸)。

Garnero 等采用双位点免疫放射法 (IRMA) 和放射免疫法 (RIA) 分别测定了 309 名 20~90 岁健康成人^[4]血清骨钙素的正常参考值分别为 $23.3 \pm 10.5 \text{ ng/ml}$ 和 $7.5 \pm 3.4 \text{ ng/ml}$ 。我们实验室采用丹麦 OSTEOMETER A/S Intact osteocalcin (ELISA) 试剂盒测定了北京地区 308 名健康人血清 BGP 水平 (年龄 1~81 岁男性 155 名, 女性 153 名), 小于 5 岁为 $14.8 \pm 7.5 \text{ ng/ml}$, 峰值大约在 10 岁左右, 6~15 岁为 $38.6 \pm 18.3 \text{ ng/ml}$, 16~20 岁为 $11.5 \pm 4.0 \text{ ng/ml}$, 21~50 岁为 $5.2 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$, 51~60 岁为 $4.8 \pm 2.2 \text{ ng/ml}$, 61 岁以上为 $3.8 \pm 2.8 \text{ ng/ml}$ 。血清 BGP 水平随年龄增长有下降的趋势, 但女性在绝经后 10 年 (51~60 岁) 增高。

Delmas 认为当骨形成与骨吸收偶联时, 骨钙素是反映骨转换的指标, 当骨形成与骨吸收解偶联时, 骨钙素是反映骨形成的特异指标, 有人认为完整骨钙素反映骨形成, 骨钙素的片段

反映骨吸收,这些看法有待于进一步探讨。

血清骨钙素增高见于:儿童生长期,慢性肾功能不全和血液透析患者,甲旁亢,甲亢,畸形性骨炎,骨折,高转换率的骨质疏松患者,成骨不全,转移癌及低磷血症抗维D佝偻病患者。血清骨钙素降低见于:长期使用糖皮质激素治疗,肝病,甲低,甲旁低患者及孕妇。

1.2.3 血清I型前胶原展开肽(Procollagen I Extension Peptide)或I型前胶原羧基端前肽(Carboxyterminal Propeptide of type I procollagen 简称PICP)I型胶原是骨组织中唯一的胶原,前胶原在成骨细胞中合成,其氨基端和羧基端向前延伸成较大的蛋白分子I型胶原的前体一羧基前肽(PICP),实际上不是肽,而是一种不均一的三聚体蛋白,由两个前 α_1 (I)链和1个前 α_2 (I)链组成,由两个硫键连接成一个球形糖蛋白,其未还原组份分子量为100KD,还原组份分子量为30KD。

血清中PICP的水平是反映成骨细胞活动和骨形成以及反映I型胶原合成速率的特异指标,但受肝功能改变的影响,它可以被肝吸收,通过上皮细胞甘露糖受体结合而被清除。成人血清的正常参考范围为50~200 μ g/L,婴儿可高达2900 μ g/L,四岁左右迅速下降,直到青春期后期保持在两倍于成人的水平,这段时间里PICP浓度与生长速率密切相关,血清PICP有昼夜差异,前半夜比清晨高30%左右^[3]。

血清PICP增高见于:儿童发育期,妊娠最后三个月(可增高两倍),骨肿瘤特别是前腺癌骨转移的患者,畸形性骨炎、酒精性肝炎、肺纤维化患者、腹部外科手术后一周和两个月时有两个明显的峰值,绝经后的骨质疏松患者与年龄匹配的对照组血中PICP没有明显改变,但经雌激素治疗六个月后可降低30%。

1.3 与骨吸收有关的生化检查

由表3可见反映骨吸收的生化指标主要有TRAP, HOP, HOLG及PYr, NTX等八种。

1.3.1 血浆抗酒石酸盐酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, 简称TRAP)酸性磷酸酶(AP)主要存在于骨、前列腺、溶酶

体、红细胞、血小板和脾脏中。血清中AP高于血浆,因凝血中血小板AP释入血中所致。TRAP在酸性环境中发挥作用,因此分离血浆后应立即加入酸性稳定剂,血浆应用肝素作抗凝剂。

TRAP主要由破骨细胞释放,因而血浆中的TRAP水平反映破骨细胞活性和骨吸收的状态。TRAP可用酶动力学及电泳法测定,以L-酒石酸钠作为抑制剂,以4-硝基苯磷酸钠盐作为底物测定TRAP活性,人血浆TRAP参考值为3.1~5.4U/L,最近发展了放射免疫及酶联免疫方法^[6]。TRAP增高见于:原发性甲旁亢,慢性肾功能不全,畸形性骨炎,骨转移癌,卵巢切除术后及高转换率的骨质疏松患者。

1.3.2 尿羟脯氨酸(Hydroxyproline, 简称HOP)HOP是人体胶原蛋白的主要成份,约占10~13%,尿中HOP50%来自骨,亦有皮肤、补体等来源。尿中排出的HOP基本上能反映骨吸收和骨转换的程度,但不特异,胶原降解时可释放出游离HOP和HOP的寡肽,尿中95%以上是以二肽式三肽形式存在,游离HOP大部分被肾小管重吸收。

健康人24小时尿HOP排出量1~14岁为20~180mg(150~1370 μ mol),成人为15~43mg(114~330 μ mol),但24小时尿HOP受饮食影响较大,我们采用清晨第二次空腹尿,受饮食影响小,取样方便,成人参考值为16.6 $\pm$ 6.6mg/g肌酐(n=148)。

尿中HOP增高见于:儿童生长期,甲旁亢,骨转移癌,畸形性骨炎,高转换率的骨质疏松患者以及骨矿化不良的疾病如佝偻病和软骨病。

1.3.3 尿羟赖氨酸糖甙(Hydroxylysine glycoside, 简称HOLG)羟赖氨酸是胶原含的另一种特异氨基酸,它虽然比HOP含量少,由于在骨与软骨组织中半乳糖苷羟赖氨酸(Gal-HL)和葡萄糖半乳糖苷羟赖氨酸(Glu-Gal-HL)的相对比例和总量不同,因此尿中HOLG可能是比尿HOP更灵敏的测定骨吸收的指标,尿中gal-HL随年龄增加而增高,这可能对骨质

疏松患者是一个有用的指标。

1.3.4 尿中胶原吡啶交联(PYr)或I型胶原交联N末端肽(NTX) 成熟胶原有两种不能还原的吡啶交联,即赖酰吡啶并啉(LP主要存在于骨中,牙质中很少,占成熟胶原的21%)和羟赖吡啶并啉(HP,存在于软骨与骨中,是成熟交联的主要成份),吡啶交联是I型胶原(骨)的I型胶原(软骨)分解的标志物,LP是骨的特异标志物,尿中HP和LP有40%以游离形式存在,60%以与肽结合的形式存在,因此尿中HP和LP是比尿HOP更特异和灵敏的反映骨吸收和骨转换的指标。

吡啶交联可用纸层析,HPLC和酶联免疫方法测定^[7]健康人尿中HP含量为 24 ± 13 Pmol/ μ mol肌酐,尿LP含量为 4.4 ± 3.3 Pmol/ μ mol肌酐,男女无显著差异。90年发展起来的用酶联免疫测定尿中吡啶交联,采用多克隆抗体测定尿中游离吡啶交联(PYr)和采用单克隆抗体测定尿中总的吡啶交联,即I型胶原交联N末端肽(NTX)简便、快速、适合临床应用。我们采用美国OSTEX公司的NTX试剂盒测定了北京地区407名健康人尿中NTX含量(Pmol BCE/ μ mol Cr)5~10岁儿童尿中NTX含量最高为 365.4 ± 65.4 ,其次是11~20岁年龄组为 133.2 ± 9.8 ,男性明显高于女性;成年以后男性从21~86岁NTX含量变化不大为 31.3 ± 4.0 ,女性从21~50岁为 30.9 ± 3.1 ,绝经后随年龄增加而增高,51~60岁为 43.5 ± 2.9 ,61~70岁为 50.3 ± 7.8 ,71~86岁为 66.6 ± 18.2 ,表明绝经后骨吸收和骨转换明显增加。

1.3.5 空腹尿钙/肌酐比值是常用的反映骨吸收的指标,我们采用清晨第二次空腹测定尿钙与肌酐比值(Ca/Cr),成人尿Ca/Cr比值为 0.093 ± 0.061 mg/mg,绝经后妇女尿Ca/Cr比值明显增高为 0.163 ± 0.111 mg/mg。

1.4 钙调节激素的有关检查

钙磷代谢和骨再建过程中主要受甲状旁腺激素(PTH)活性维生素D(VitD)及降钙素(CT)三大激素的调节,PTH主要是促进骨吸收,CT抑制骨吸收,而活性VitD代谢产物具

有双向调节作用^[8],它们之间的相互协调,维持了血钙的平衡,保证了骨代谢的正常进行。钙调节激素在血清中参考值见表2。

2 骨代谢生化检查对骨质疏松症诊断、鉴别诊断、预防和治疗的意义

2.1 有助于原发性骨质疏松症的诊断和分型。原发性骨质疏松症诊断的重要依据是骨量减少,低于骨峰值1~2个标准差,骨组织显微结构的退行性变和骨折危险性的增加;临床表现主要是腰背痛,驼背和身长缩短;生化的改变表现为性激素和VitD代谢产物水平的降低,肠钙吸收降低,而血清钙,磷和ALP一般在正常范围。

原发性骨质疏松症分为绝经后(I型)和老年性(II型)骨质疏松症两型,可以从年龄,性别,骨折部位和骨转换的生化指标来进行鉴别诊断。I型骨质疏松患者,多数表现为骨形成与骨吸收的生化指标均增高即高转换型,以女性为主,病因主要与绝经有关,骨折部位多在椎体和桡骨远端,年龄多在50~70岁;II型骨质疏松患者,年龄多在70岁以上,骨折部位主要在椎体和髌部,骨形成与骨吸收的生化指标多为正常范围或降低,为低转换型。血清PTH有升高的趋势,病因主要是与年龄因素有关。

2.2 有助于原发性骨质疏松症与继发性骨质疏松症的鉴别诊断。原发性骨质疏松症是因绝经和年龄增长引起的退行性的骨质疏松症,其血生化的特点主要表现为血清钙,磷和ALP一般在正常范围内;而由内分泌系统疾病,如肾脏疾病,肝脏疾病,骨肿瘤等引起的继发性骨质疏松症血清钙、磷和ALP多数有1~3项异常,或增高或降低,而ALP增高比较常见。高钙血症见于:甲旁亢;维生素D过多症,多发性骨髓瘤,骨转移癌等。低钙血症见于:甲旁低,佝偻病,软骨病,肾病及肾功能不全患者。高磷血症见于:甲旁低,VitD中毒症,肾功不全,多发性骨髓病及骨折愈合期。低磷血症见于:甲旁亢,佝偻病或软骨病等。

2.3 骨代谢生化检查在预防和治疗骨质疏松上的价值。

2.3.1 骨代谢的生化指标是一种快速、灵敏、及时地反映骨转换率的指标,骨组织计量学的方法虽然能直观准确地反映骨转换的状态,但需要取活检,有一定局限性;采用双能 X 线骨密度仪检查骨量比较准确而且能定量,但至少间隔半年到一年才能复查,不利于短期的动态观察。而骨代谢的生化指标具有无创伤,快速及时,灵敏地反映骨转换状态的特点,对骨质疏松症的诊断治疗都是不可缺少的,如绝经后脊柱骨质疏松症患者多数表现为血浆 TRAP、尿 HOP 及 HP、LP 高于年龄匹配的正常人;而髌部骨折的患者骨吸收的增加往往是由继发性甲旁亢引起的,这些患者生化改变表现为尿胶原吡啶交联增加和血清 BGP 降低,说明髌部骨折患者骨量减少主要是由骨吸收增加和骨形成减少所致。

2.3.2 骨代谢生化指标在进行药物预防和治疗骨质疏松上具有重要价值。进行药物预防和治疗骨质疏松的动态观察一般需要一年以上,应用骨代谢的生化指标有以下几方面的作用:

①在绝经时判断是否存在快速骨丢失,是否需要雌激素替代治疗;

②根据骨转换的速率,对腰椎骨质疏松选择最适当的治疗措施;

③治疗时用于评价药物对骨形成和骨吸收的影响,预测对骨量的影响;

④评价原发性甲旁亢患者及糖皮质激素治疗患者用药前后骨转换的情况^[9]以便及时修正治疗方案。

2.3.3 骨代谢生化指标可应用于评价年骨丢失率及预测骨密度和骨质疏松引起的骨折特别是髌部骨折的危险性,绝经后妇女骨转换率明显增加,在卵巢功能停止 1~3 年达高峰,以后 8~10 年逐渐下降,绝经后妇女血清 BGP、尿中 HOP 尿钙和尿 HP、LP 均增加。另外,我们发现尿中 NTX 含量与腰椎(L₂₋₄)骨密度之间存在着非常显著的负相关($r = -0.426, P < 0.01$),说明骨代谢的生化指标可用来预测骨密度。

2.3.4 应用维生素 D 受体(VDR)的等位基因来预测骨密度,这是九十年代 Morrison 和 Els-

man 提出的最新观点^[10]。他们认为成年人早期骨密度低是骨质疏松性骨折危险性的主要决定因素,60%的妇女由于骨密度低而发生了骨质疏松性骨折,他们发现健康人中 75%的基因影响骨密度,等位基因的变异可以用来预测骨密度的不同,超过 60 岁的妇女,74%的 BB 基因型的骨密度都低于骨折阈,而 61%的 bb 基因型的骨密度都高于骨折阈,从 BB、Bb 到 bb 基因型,血清 1,25(OH)₂D₃ 水平是逐渐降低的,人种之间钙代谢内环境及骨密度的不同,可能也可以用不同的 VDR 等位基因来解释,因此有可能用 VDR 等位基因来预测骨密度。

参 考 文 献

- 1 Murray JF. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 2nd ed. New York: Raven press, 1993; 89, 52.
- 2 Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77: 1046.
- 3 富山明夫,根来良材. オステオポロミスの生化学的診断法. 見: オステオポロミス診断と治療. 藤田拓男編, 東京: 三報社印刷株式会社, 1993; 285-293.
- 4 Garnero P, et al. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Min Res* 1992; 7: 1389.
- 5 Risteli L, Risteli J. Carboxyterminal propeptide of type I procollagen. A new direct indicator of bone matrix formation. *Italy Mineral Electrolyte Metab*, 1992; 6: 1-6.
- 6 Kraenzlin M, Lau KHW, Liang L. Development of an immunoassay for human serum tartrate-resistant acid phosphatase. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990; 71: 442.
- 7 Hanson D A, Weis MA, Bollen AM et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I Collagen cross-linked N-telopeptides in Urine. *J Bone Min Res*, 1992; 7: 1251.
- 8 薛延, 维生素 D 及其代谢产物. 见: 骨质疏松症, 刘忠厚主编, 马述仕, 薛延, 王石麟副主编. 北京: 化学工业出版社, 1992; 96-105.
- 9 Delmas PD Biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Res*, 1993; 8(sup2): 5549.
- 10 Morrison NA, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 285.