

骨代谢的磷化学

夏志道 赵玉芬

磷是体内含量较多,仅次于氧、碳、氢、氮、钙而居第六位的元素,占体重的1%。骨是含磷最为丰富的器官,成人体内含磷约600~700g,其中80~90%在骨骼中,与钙结合成羟基磷灰石(HA)晶体而存在,而且能释放至血液而调节血磷水平。

一般认为,骨基质形成中磷比钙居于更重要的地位。在含磷最为丰富的骨组织内,磷不仅构成了骨骼最主要的无机成分,而且几乎参与了骨无机基质与骨有机基质形成的每一过程,这是由磷在生命化学中的特殊地位决定的。

1 含磷骨基质成分

1.1 含磷骨无机质:主要为磷酸钙,其基本结构为羟基磷灰石 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 和无定型的胶体磷酸钙^[1],占骨无机质的84%,为骨矿物盐的主要成分。

1.2 含磷骨有机质:存在于矿化骨组织的无定型基质中,为非胶原蛋白,包括唾液酸蛋白I,即骨桥(osteopontin)^[2],唾液酸蛋白II^[3]和磷酸化糖蛋白即骨连接素(osteonectin)^[4]。三种磷蛋白均是独特基因的产物,通常仅分布于骨、齿等钙化组织。三者门冬氨酸或谷氨酸的含量均达30~36%,并含有多元磷酰基的涎酰基,与矿化的细胞调控密切相关^[5]。此外在发育的骨组织中尚有一个磷蛋白,称为小磷灰石结合胶原蛋白,为I型胶原的N端前肽,可能为无机盐同胶原纤维之间提供一种连接^[6]。

1.3 与骨基质形成有关的含磷分子:包括储存和提供生物能的分子如ATP、GTP;提供磷酸

酯的分子如ATP、ADP、AMP、5'AMP、PPi、磷酸乙醇胺(phosphoethanolamine)等^[7]与钙结合的含磷分子,如钙结合酸性磷脂磷酸酯^[8]。

2 磷与骨无机基质的形成

骨无机基质的主要成分为羟基磷灰石(hydroxyapatite HA)。在生理Ca、P浓度下,活体 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 不能在任意部位发生沉积,否则机体就不能避免自身的钙化。因此钙沉积是一个十分复杂的过程,其机理至今尚不完全清楚。

已证实HA最早出现于成骨细胞或肥大软骨细胞的基质小泡(matrix vesicles MV)。MV为细胞衍化,膜包裹的颗粒,直径约100~200nm。Anderson指出MV为钙化起始部位基于以下三个原因:(1)MV包含有高浓度的钙结合酸性磷脂而吸附钙离子;(2)MV膜上的碱性磷酸酶(ALP)能水解ATP、ADP、AMP、5'AMP、PPi等释放磷酸二酯而形成磷酸钙矿物质;(3)膜包裹的微环境保护了在形成HA沉积前最早出现的可溶性较大的前晶体,HA核晶形成后HA即不再需要MV保护而可在生理钙、磷浓度下增长^[7]。

磷参与骨无机盐形成包括以下几个方面:首先,磷参与形成骨无机盐的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 的聚集。HA核晶形成的 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 并不是以离子游离于组织液中,其中 PO_4 存在于含磷酸酯的分子如AMP、ADP、PPi等,这些分子浓集于MV中。而Ca则结合于细胞膜的酸性磷脂,构成Ca-磷脂-磷酸酯复合物(Ca-PL-PO_4)^[8];其次,MV中先形成高浓度的 PO_4 而在基质钙化中起决定性的作用^[7]。而 Ca-PL-PO_4 提供 Ca^{2+} 并由生理溶液中持续转移至MV内,而使HA增长,当HA结构完整后即冲破MV膜而吸引

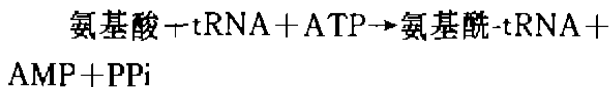
作者单位:430002 武汉,同济医科大学附属协和医院骨科(夏志道);清华大学化学系生命有机磷化学实验室(赵玉芬)

生理 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 的沉积;其三,提高 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 浓度能促进 HA 结晶的继续增长,同时提高 AMP 等单磷酸酯能促进 HA 形成,最后,HA 增长受多磷酸酯如 ATP、PPi 及磷蛋白的抑制^[7]。

3 磷与骨胶原和非胶原蛋白的合成

骨有机成分中 90% 为胶原,其余为各种糖蛋白或称非胶原蛋白(NCPs)如骨钙素、骨桥、骨连接素等^[10]。因此骨有机质合成包括蛋白质、多糖合成及一些重要的含磷 NCPs 的磷酸化,这些过程均需含磷分子的参与。

3.1 蛋白质合成:蛋白质的肽链由氨基酸在细胞内合成。一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基反应生成多肽链,在热力学上是困难的,只有羧基活化后才能进行,而活化能由三磷酸腺苷(ATP)提供:



氨基酰-tRNA 在核糖体上加入肽链而合成蛋白质,这一过程中 ATP 是必不可少的。事实上,一个氨基酸经活化后加入肽链需 4 分子 ATP^[1],所以合成一条有 1000 残基的胶原链需 4000 分子 ATP 参加。

3.2 多糖链合成:葡萄糖是生成多糖链的原料,但从能力学上看单糖不可能直接聚合成糖链。葡萄糖首先形成磷酸酯,即 6 磷酸葡萄糖,消耗一个 ATP,然后与三磷酸苷(GTP)作用生成糖核苷酸衍生物后才能聚合成多糖。而多糖链中重要的硫酸基团则由硫酸与 2 分子 ATP 作用形成 3' 磷酸腺苷 5' 磷酸硫酸酯后才能结合到糖胺多糖^[1],因此增加一个不含硫酸酯的糖基至多糖链需 1 分子 ATP 和 1 分子 GTP。

3.3 磷蛋白的磷酸化:骨基质中主要的酸性磷蛋白主要局限并合成于钙化组织。在进化过程中酸性磷蛋白的多元酸区域和相同的磷酸化区域已得以保留。研究表明,所有种系的骨桥和骨涎蛋白均完全保留有 I 型磷酸化区域(—S—S—E—E—);II 型磷酸化区域也可见很好的保

留,它表现为一组不同的氨基酸顺序,先是单个丝氨酸或苏氨酸,继之以 2~4 个酸基;四个种系的骨桥 C 端都有相同的 II 型磷酸化区域(—S—S—E—)。其优先磷酸化部位是一个丝氨酸或苏氨酸残基,位于几个谷氨酸和/或门冬氨酸残基的 N 端。其进行磷酸化的激酶为三种类型的酪氨酸激酶 II,磷酸化过程均需磷酸基的参与^[5]。磷蛋白的基本肽链磷酸化对其功能具有十分重要的意义,去磷酸化意味着相应功能的失去^[11]。

4 磷与骨矿物盐、骨有机基质的相互作用

骨无机盐与有机基质的相互作用决定骨组织的形成与结构,包括骨无机盐与胶原、非胶原蛋白的相互作用^[12]。

4.1 骨盐与胶原蛋白:胶原成分主要为 I 型胶原,由于 I 型胶原尚存在于皮肤、肌腱等部位而在生理环境下并不发生骨以外的骨盐沉积,因此胶原并不是骨盐形成的决定性因素。

早期研究显示 HA 晶体与胶原纤维呈平行排列。这是由于 HA 的细小晶粒和胶原的定向排列结构。胶原分子长约 300nm,相邻分子彼此错开排列形成 67nm 的重叠区而形成胶原纤维;两个胶原分子在长轴上存在 35nm 的间隙,称为洞区(hole zone),洞区为骨盐沉积的起始部位^[13]。

胶原洞区存在一些至今尚不完全清楚的非胶原大分子。一些资料指出位于矿化骨胶原洞区的为一些性质尚未完全确定的磷酸化蛋白^[14],以及一些非矿化组织中的糖蛋白残基和胶原衍化分子,特别是 N 端磷酸化的分子^[5],骨盐沉积由这些分子所调控。

4.2 骨无机盐与骨非胶原蛋白(NCPs):骨组织中的主要 NCPs 均含有阴离子基团。这些含有负电荷的基团能结合溶液中及 HA 表面的 Ca^{2+} 。在结合 Ca^{2+} 时,NCPs 发生构象变化,能形成富含 β 褶片(β pleated sheets)的区域,而很容易与无机盐结晶界面结合。低浓度时能稳定 HA 核晶形成及延长,高浓度时抑制 HA 的

增长^[12]。

位于胶原纤维洞区的骨磷蛋白为主要的骨NCPs,能调节无机盐结晶形成。这些大分子对HA有高浓度亲和力,如果用酸性磷酸酶进行脱磷酸化处理,HA即从这些大分子上脱落。

体外研究表明,游离的磷蛋白在溶液中是HA核晶形成的强有力的抑制剂,这是由于其与 Ca^{2+} 的高亲和力。而当其固定于表面,或体内与胶原分子结合而浓集时则成为HA沉积的成核剂。由于磷蛋白仅分布于钙化组织且局限于正在矿化的区域,因此有人提出其可能单独或共同参与HA核晶积,尽管尚无这一方面的直接证据^[5,12]。

4.3 骨序列的形成:一般认为骨细胞外液 Ca^{2+} 保持相对恒定并与血钙浓度保持平衡,因此骨基质酸性磷蛋白总是以不完全饱和的钙复合物形式存在。因此,Gorski指出,假定细胞外液 Ca^{2+} 浓度保持恒定,则酸性磷蛋白必须通过特定的蛋白质-蛋白质相互作用发生形态变化,从而使蛋白质活动减少,并将各种配位基团排列至增长所需的分子支架上。已证实磷蛋白能与胶原或其它基质形成共价复合物,而磷蛋白与 Ca^{2+} 结合能发生构象变化形成 β 褶片。推测 Ca^{2+} 首先被磷蛋白带负电的多元酸侧链基团吸引并与之结合,继之与蛋白质磷丝氨酸等磷酸基团形成配体,配体的排列是 Ca^{2+} 、磷和羟基加成反应优于其它离子的决定性因素^[5]。

在生理钙磷浓度下,只有提高磷蛋白的局部浓度才能促进络合,因此活体矿化见于胶原致密区域,那里浓集了磷蛋白分子,因而骨磷蛋白在骨序列形式中起了决定性的作用^[5]。

参 考 文 献

- 1 Albert B, Bray D, Lewis J, et al. Molecular biology of the cell. 2nd ed. New York & London: Garland Publishing Inc. 1989.
- 2 Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 8819.
- 3 Ecarot-Charrier B, Bouchard F, Delloye C. Bone sialoprotein I synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. *J Biol Chem*, 1989, 264: 20049.
- 4 Bolander ME, Young MF, Fisher LW, et al. Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 2919.
- 5 Gorski JP. Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int*, 1992, 50(5): 391.
- 6 Goldberg HA, Macno M, Domenicucci C, et al. Identification of small collagenous protein with properties of procollagen $\alpha 1(1)$ pN-propeptide in fetal porcine calvarial bone. *Collagen Rel Res*, 1988, 8: 187.
- 7 Anderson HC. Biology of disease: mechanism of mineral formation in bone. *Lab Invest*, 1989, 60(3): 320.
- 8 Press NS, Anderson HC, Sajera SW. The lipid of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calcif Tissue Res*, 1974, 14: 275.
- 9 Akisaka T and Cay CU. Ultrastructural demonstration of p-nitrophenylphosphatase (p-NPPase) activity in the epiphyseal growth plate. *Acta Histochem Cytochem*, 1986, 19: 21.
- 10 Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, et al. Structure expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop*, 1992, 281: 275.
- 11 Endo A. Potential role of phosphoprotein in collagen mineralization: an experimental study in vitro. *J Orthop Assoc*, 1987, 61: 653.
- 12 Boskey AL. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop*, 1992, 281: 244.
- 13 Lees S and Prostat K. The locus of mineral crystallites in bone. *Connect Tissue Res*, 1988, 18: 41.
- 14 Glimcher MJ. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Res*, 1989, 224: 139.