

骨转换生化标志物与骨质疏松

葛雪琳 综述 蔡桂英 审核

随着人口老龄化,骨质疏松症(osteoporosis, OP)已成为影响健康的重要问题^[1]。对骨质疏松的研究也越来越深入和广泛,在众多的研究手段,如骨组织形态学观察、骨密度测量、生物力学等方法中,骨代谢生化标志物的检测以其简便、快速、无创伤性的特点,在流行病学调查,长期跟踪监测以及预防性诊断方面独具优势^[2]。近年来,在传统指标的基础上,已寻找到一些更新、更灵敏特异的生化标志物来反映骨重建过程中的变化情况,以下将就此方面的研究进展加以综述。

1 反映骨形成的生化标志物

1.1 血清总碱性磷酸酶和骨碱性磷酸酶

碱性磷酸酶(ALP)是一种磷酸单酯酶,它在体内有4种编码基因,一种是组织非特异基因,定位于1号染色体短臂上,在骨、肝、肾和早期胎盘中表达。另外3种组织特异性基因分别编码小肠、成熟胎盘和胚细胞来源的ALP,它们定位于2号染色体长臂上,相互位置很接近。ALP通过糖基磷酸酯酰肌醇,以四聚体形式结合于细胞膜外表面,进入血循环后解聚成二聚体^[3]。

骨ALP与骨矿化密切相关,因为在碱性环境中骨钙化最活跃,成骨细胞释放的ALP能使无机磷酸盐水解,从而降低焦磷酸盐浓度,有利于骨的矿化。

血中ALP虽然有6种同工酶,但主要来源于骨和肝,所以检测骨ALP的关键是将肝和骨ALP分开,其方法较多,如热失活法^[4]、化学抑

制法^[5]、凝胶电泳法、麦胚凝集素沉淀法等,这些方法主要利用这些同工酶在分子大小、电荷性、理化性能以及生理作用等方面的差异来进行区分的。这些方法大多属于间接法,对于提高指标的特异性效果并不理想,最近由于骨ALP单克隆抗体的制备成功,使直接用免疫法检测血中骨ALP成为可能,Christopher等报道,有一种免疫俘获法(immunocapture)具有更高的特异性和灵敏性^[6]。

1.2 血清骨钙素

骨钙素(Osteocalcin, OC)亦称作依赖维生素K的骨Y-羧基谷氨酸(Y-carboxyglutamic acid, Gla)蛋白(bone gla protein, BGP)。它是一种非胶原蛋白,最早由Hauschka和Price分别从鸡、小牛和人骨中分离提取了此蛋白并鉴定了该结构。1989年,Lian等从大鼠和人骨中克隆出骨钙素基因,它由3个内含子和4个外显子拼接而成,在人是单拷贝基因,位于1号染色体长臂上,在鼠是多拷贝。Price通过新双香豆素抑制实验,得出血中BGP是由成骨细胞合成后分泌入血的,而非骨基质吸收时释放血的^[7]。但他还比较了胎鼠和成年鼠血、骨中的BGP含量,证明了血中存在非骨源性BGP^[8]。

BGP在骨代谢中的功能还不是很清楚,体外实验证明BGP与骨基质矿化有关,而体内实验证明BGP与基质合成有关。体外实验证明,在成骨细胞分化和基质矿化过程中,BGP合成增加,随之ALP分泌增加,矿化完成后,ALP迅速降低,而BGP仍维持较高水平,这提示BGP可限制过度矿化或参与骨转换调节。另一些体内外实验显示BGP还参与骨吸收的调节,它可以募集并激活骨重吸收细胞,当BGP减少

时,破骨细胞样细胞聚集减少^[9]。

检测 BGP 的方法多用免疫方法^[10],第一代放免法用牛 BGP 作为 Ag 和标准,因为牛 BGP 和人 BGP 同源性达 90%,49 个氨基酸中仅 5 个不同,但各实验室测得血清中 BGP 水平相差很大,原因是在循环血中 BGP 存在多种片段^[11]。传统的牛抗血清大多能识别分子的 C-端,因为人和牛的 C-端是相同的,而不同抗体所识别的片段是不同的,所以各实验室的抗血清测出的循环血中的 BGP 的水平相差很大^[12]。循环血中主要是完整的 BGP 片段和 N-端大片段,而在室温下几小时后,完整片段也很快降解成 N-端大片段,所以只有用适当的抗体同时检出完整片段和 N-端大片段才能有效提高方法的灵敏性。最近有实验证明,在体外刺激破骨细胞进行骨吸收时,有 BGP 的 N-端大片段的释放^[13]。

Delmas 认为,当骨形成与骨吸收偶联时,BGP 是反映骨转换的指标。当骨形成与骨吸收解偶联时,BGP 是反映骨形成的特异指标^[14]。

1.3 血清 I 型前胶原 N-端和 C-端前肽

I 型前胶原 N-端和 C-端前肽(PINP, PICP)是在胶原合成过程中从前胶原分子上切下后释放入血的。PICP 分子量为 117kDa,肽内有二硫键存在,分子较稳定,由肝清除,半衰期为 6~8 分钟。PINP 分子量 70kDa,含 Gly-X-Y 结构,X、Y 分别为脯氨酸和羟脯氨酸,由肝内皮细胞上的清道夫受体俘获并清除,一些 PINP 由前胶原分子上切除后可直接沉积到骨基质上^[15]。

由于骨基质中胶原是主要成分,骨合成 I 型胶原的速度较其他组织要快得多,所以可认为血中 PICP、PINP 水平可代表骨胶原合成速度。检测这两个指标常用免疫方法,从人皮肤或肺纤维细胞培养液中分离胶原,再用细菌胶原酶切割得到 C-端肽作抗原,也有用从人胎纤维细胞中纯化得到游离前胶原作为抗原的,这两种来源的检测方法相关性 r 为 0.98,但绝对值相差 25%^[16]。检测 PINP 有通过合成 α_1 链上氨

基端的 7~24 的氨基酸序列作为抗原,也可合成 23~34 的氨基酸序列作抗原^[17]。

成人 PINP 和 PICP 处于等量水平,儿童 PINP 含量比 PICP 高 2~3 倍,说明儿童对 PICP 代谢清除率较快,有结果显示,在转换率较高的骨代谢性疾病中,PINP 作为检测指标比 PICP 灵敏。PICP 与 PIIICP(III 型胶原,来源于软组织)有 20% 的交叉反应,同源性较高。Crofton 检测了 302 名学龄儿童的以下 3 个指标:CTX(胶原吡啶交联羧基末端肽)、PICP、PIIICP,发现它们之间相关性非常高($P < 0.001$),这与儿童生长期软组织和骨发育很快是一致的^[11]。

2 反映骨吸收的生化标志物

2.1 尿钙,羟脯氨酸和糖甙羟赖氨酸

骨组织中含大量钙,当骨被吸收时,钙被释放入血,经肾排至尿中,所以测定晨尿中的钙含量是反映骨吸收的一个方便的指标,但尿钙来源较多,且受钙调激素和雌激素的影响,所以这个指标缺乏特异性。

羟脯氨酸(hydroxyproline)在胶原分子中约占氨基酸残基含量的 13%^[11],而人体内的胶原的一半存在于骨,所以可大致认为尿中羟脯氨酸含量可反映骨吸收的情况,但实际上羟脯氨酸在排入尿中前已大部分降解,尿羟脯氨酸含量仅占胶原代谢产生的羟脯氨酸含量的 10%,所以这个指标也缺乏灵敏性。

羟赖氨酸(hydroxylysine)是胶原降解的另一种产物,它主要有两种糖甙形式:GHYL(糖甙羟赖氨酸)和 Glc. GHYL。羟赖氨酸和它的糖甙产物在尿中含量不如羟脯氨酸高,但由于其含量所占比例固定,且不受食物来源影响,组织特异性高,所以较尿羟脯氨酸有更好的代表性。骨和皮肤中有三分之一的羟赖氨酸是糖基化了的,在皮肤 Glc. GHYL/GHYL 为 1.6:1,而骨中为 1:7^[11]。现在已研制出 GHYL 的单克隆抗体用于临床检测,是反映骨吸收的较为灵敏的指标。

2.2 胶原吡啶交联和 I 型胶原交联末端肽

胶原分子聚集形成胶原纤维是通过分子间交联来完成的,当破骨细胞吸收骨基质时,它们分泌酸性和中性蛋白酶降解胶原纤维,产生大小不等的游离吡啶交联物(Pyr, D-Pyr)或与端肽结合的吡啶交联物(NTX, CTX),其中游离型占 40%,结合型占 60%^[11],Pyr(又称羟赖氨酰吡啶交联(HP))及 D-Pyr(也称赖氨酰吡啶交联(LP))的分布具有一定组织特异性,在骨中含量高于它在其它组织中的含量,在骨中 Pyr:D-Pyr 约为 3.5:1(22%D-Pyr),而其它组织中比例为 10:1,在尿中两者比例与骨中接近,所以认为尿中 Pyr 和 D-Pyr 主要来源于骨^[17]。

吡啶交联物作为骨吸收标志物与尿羟脯氨酸相比具有很大优越性:①它们是胞外胶原纤维结构部分,所以只能由成熟的骨基质降解产生;②胶原降解产生的吡啶交联物入血后不再在体内降解,所以能直接反映基质胶原的降解情况;③在骨中含量远远高于其它组织,所以更具代表性;④吡啶交联物不能从食物中吸收,所以排除了这个较大的混杂因素。

测定吡啶交联物的方法主要有高压液相层析(HPLC)和免疫学方法^[18]。一般将尿水解后用反相 HPLC 法测定总的交联物含量^[17],但目前更倾向于用简便的免疫方法来测定各游离型或结合型吡啶交联物的含量。在绝经后妇女和变形性骨质疏松病人中,游离的 Pyr 与用 HPLC 测出的总的 Pyr 的含量有很高的相关性^[19]。而在骨质疏松病人和一些有骨转换率增高的疾病中,如原发性和继发性甲状旁腺功能亢进,游离的 D-Pyr 含量比 Pyr 增加更明显,可能是因为 D-Pyr 在骨中含量高于其它组织^[20]。在用 ELISA 方法测定中,游离 D-Pyr 的单抗并不与游离的 Pyr 发生交叉反应。结合型的吡啶交联(NTX, CTX)被认为是更特异地反映骨吸收状况的指标,在绝经后妇女的尿样中,NTX 和 CTX 的含量较游离的 Pyr 和 D-Pyr 增加更明显^[21],而在二磷酸盐等抗骨吸收药物治疗后,NTX 和

CYX 的含量有显著降低,游离型的则无太大变化^[21]。

2.3 抗酒石酸酸性磷酸酶

血中的酸性磷酸酶有 6 种同工酶,主要来源于前列腺、肝、肾、红细胞、血小板和骨,电泳可分出 6 条带(Types 0~5),来源于骨的属于 Type 5,处于 Type 5 带上的还包括一些其它来源的酸性磷酸酶,如肺泡细胞、巨噬细胞源性的单核细胞、胎盘和脾^[11]。在 pH 较低的情况下,这些酶均能水解磷酸单酯,但酒石酸具有抑制大部分酸性磷酸酶的能力,处于 Type 5 带上的同工酶却具有抗酒石酸的特性,称为抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP),主要是骨源性的,但也有其它如红细胞来源的。

TRAP 的分子量约为 35 kDa,分子中有两个铁原子,是酶的活性催化部位,免疫组化方法证明,骨 TRAP 存在于重吸收小囊泡中,从破骨细胞分泌入血^[22]。尽管从 1982 年开始,TRAP 就作为反映骨吸收的指标,但其作用机理至今不甚清楚,Zaidi 等认为此酶对骨吸收有促进作用,具有潜在调节破骨细胞与骨结合的功能^[22]。

检测 TRAP 常用对硝基酚磷酸盐(PNPP)法,但这个方法缺乏特异性,而且酶的活性受血清中一些抑制剂的影响,即使是冻干的血清样品中,酶的活性也不稳定^[23]。1998 年 Nadanishi 报道了一种改进测定血中 TRAP 活性的方法,他证明了氟化物对骨源性 TRAP 的抑制达 88%,而对其它几种来源 TRAP 的仅抑制 6%~14%,这个方法与 PNPP 法的相关性为 0.77^[24]。但现在更倾向于用免疫方法来检测酶活性。最初使用的抗原并非来自骨的 TRAP,而是用子宫铁蛋白(uteroferrin)^[25]、脾的 hairy 细胞中提取的酶^[26]或从 cord plasma 中得到的酶作抗原,这些抗原的抗体均能与骨源性 TRAP 产生反应,而不和脾、红细胞、血小板等来源的 TRAP 发生交叉反应^[14]。1998 年, Goran Andersson 等报道了从鼠骨中提取出了

TRAP, 现在已从人骨中提纯了 TRAP^{Di-1}, 并免疫兔得到了仅抗人骨 TRAP 的抗体^[11]。这些改进意味着 TRAP 将成为反映骨代谢情况的很有价值的指标。

3 骨转换生化标志物在骨质疏松症中应用

3.1 诊断及预防骨丢失

是否患骨质疏松取决于两个因素: 峰值骨量和骨量丢失的速度。基线骨量通过骨密度测量确定, 再结合骨转换生化标志物的检测, 可有效预测骨丢失情况。因为在骨重建负平衡的情况下, 骨重建单位越多, 即骨转换率越高, 骨量丢失越快。有研究表明, 在绝经初期检测血清 BGP 水平, 尿羟脯氨酸, 尿 D-Pyr 的含量所预测的骨丢失情况与两年后的骨密度测量结果相关性达 0.77^[27]。基线骨量相同的绝经妇女, 在初期诊断为高转换型的, 12 年内丢失的骨量较低转换型的多 50%^[27]。

3.2 药物疗效的监测

对骨质疏松病人进行治疗的目的是为了防止进一步的骨量丢失, 进而降低发生骨折的危险性, 在用雌激素或二磷酸盐进行抗骨吸收治疗两年后, 腰椎的骨量增加大约 5%~10%, 而股骨颈和前臂的骨量增加不到 5%^[28], 所以如果用骨密度测量的方法来确定某种药物是否有效, 至少要等两年时间。而检测血或尿中的一些骨转换生化标志物, 如果药物有效, 在 3~6 月内这些指标会发生的变化, 骨吸收指标的改变先于骨形成指标^[28]。所以, 通过检测骨转换生化标志物可以判断药物疗效, 从而尽快调整病人的治疗方案。

参 考 文 献

- Maryfran Sowers. Clinical epidemiology and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1997, 26(1):219-231.
- Bente Juel, Glostrup. Biochemical markers of bone turnover in diagnosis and assessment of therapy. *Am J Med*, 1991, 91(Suppl 58):25.
- Low MG, Saltiel AR. Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science*, 1988, 239:268-275.
- Katrine B, Whitaker LG, Whitby. Phosphatases in serum in health and disease. *Clin Chim Acta*, 1977, 80:209-220.
- Chen J, Yam LT, Jankila A. Significance of "high" acid phosphatase activity in the serum of normal children. *Clin Chem* 1979, 25(5):719-722.
- Price CP, Milligan TP, Darte C. Direct comparison of performance characteristics of two immunoassays for bone isoform of alkaline phosphatase in serum. *Clin Chem*, 1997, 43(11):2052-57.
- Price PA, Kaneda Y. Vitamin K counteracts the effect of warfarin in liver but not in bone. *Thromb Res*, 1987, 46:121-131.
- Price PA, Lothrinier JW, Nishimoto SK. Absence of the vitamin K-dependent bone protein in fetal rat mineral. *J Biol Chem*, 1980, 255(7):2038-42.
- Fisher LW, Jetermune JD. Noncollagenous protein influencing the local mechanisms of calcification. *Clin Orthop Relat Res*, 1985, 200:362-385.
- Rosenqvist C, Qvist P. Measurement of more antibodies. *Clin Chem*, 1995, 41:1439-45.
- Garnero P, Delmas PD. Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1997, 26(4):913-937.
- Soubierbielle JC, Marque D, Bonnet P. Simple method to evaluate specificity of osteocalcin immunoassays. *Clin Chem*, 1997, 43(9):1663-1664.
- Kurthara N, Hosoda K, Tatsumi J. The N-terminal fragment of osteocalcin is released during osteoclastic bone resorption *in vitro*. *J Bone Miner Metab*, 1998, 16:11-16.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis. *Am J Med*, 1991, 91(Suppl 58):59-63.
- Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrin Review*, 1996, 17(4):333-368.
- Crofton PM, Wade JC, Taylor MRH. Serum concentrations of carboxyl-terminal propeptide of type I procollagen, amino-terminal propeptide of type III procollagen cross-linked carboxyl-terminal telopeptide of type I collagen, and their interrelationships in school children. *Clin Chem*, 1997, 43(9):1577-1581.
- Editorial. New biomarkers of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 74(3):470A-470C.
- Juha Risteoi, Inkert Elomaa, Seija Niemi. Radioimmunoassay for the pyridinolone cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem*, 1993, 39(4):635-640.
- Bonde M, Qvist P, Fledelius C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem*, 1991, 40(11):2022-2025.
- Ju, HJ, Leung S, Brown B. Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clin Chim* 1997, 43(9):1570-76.

利用度要好于氟化钠溶液,可能是由于氟化钠溶液经过小肠上段的速度过快从而使氟没有得到完全利用,而小肠上段正是氟吸收的主要窗口。

一氟磷酸钠可与钙离子结合,不过生成的一氟磷酸钙是可溶的。因此,当一氟磷酸钠与钙剂或与含钙丰富的食品(如牛奶)同时服用时,其氟的生物利用度不会受到影响。这是一个很重要的优点,因为氟化物疗法增加了对钙的需求,必须同时补钙。此外将一氟磷酸钠与钙盐结合而制成复方制剂,可以满足氟与钙的最佳比例,即 1:30~1:50。

5. 一氟磷酸谷酰氨

最近,一种新的有机氟化物已取得专利,即 $(C_5H_{11}NO_3)_2FPO_3 \cdot 2NaCl$ (一氟磷酸谷酰氨),其中含氟 3.73%。其氟的生物利用度与等摩尔量的氟化钠相同。

表 2 8 名健康志愿者口服一氟磷酸谷酰氨-钙复方咀嚼片剂,观察标准饮食对其氟的血浆药动学常数的影响

常数	饭前服用	饭后服用
血中延迟时间(h)	0.05	0.12
吸收半衰期(h)	0.23	0.71
C_{max} (ng/ml)	369(278~460)	122(106~220)
T_{max} (h)	0.6(0.5~0.7)	2.4(1.6~3.3)
Init. $t_{1/2el}$ (h)	0.12	1.87
Term. $t_{1/2el}$ (h)	12.3	9.0
AUC(mg/1xh)	1.09(0.87~1.36)	1.02(0.74~1.33)
相对生物利用度		1.02(0.54~1.51)

注: C_{max} 为最高血药浓度; T_{max} 为到达最高血浓度的时间;Init. $t_{1/2el}$ 为初始清除半衰期;Term. $t_{1/2el}$ 为终末清除半衰期

一氟磷酸谷酰氨具有一氟磷酸钠所有的在药动学、疗效及耐受性方面的优点。因此它为骨质疏松的氟化物疗法提供了更好的选择。

(上接第 88 页)

21 Clemens JD, Herrick MV, Singer FR. Evidence that serum NTX(collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. Clin Chem, 1997, 43(11):2058-63.

22 Andersson G, Ek-Rylander B. The tartrate-resistant purple acid phosphatase of bone osteoclasts-a protein phosphatase with multivalent substrate specificity and regulation. Acta Orthop Scand, 1995, 66(Suppl 266):189-194.

23 Lau KH, Onishi T, Wergedal J E. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum; potential use to assess bone resorption. Clin Chem, 1987, 33(4):458-462.

24 Nakanishi M, Yoh K, Uchida K. Improved method for measuring tartrate-resistant acid phosphatase activity in

serum. Clin Chem, 1998, 44(2):221-225.

25 Echerebu ZO, Cos TM, Moss DW. Antibodies to porcine uteroferrin used in measurement of human tartrate-resistant acid phosphatase. Clin Chem, 1987, 33:1832-6.

26 Kraenzlin ME, Lau K-HW. Osteoclastic tartrate resistant acid phosphatase. J Clin Endocrinol Metab, 1990, 71:442-451.

27 Uebelhart D, Schlemmer A, Johansen J. Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium crosslinks. J Clin Endocrinol Metab, 1991, 72:367-373.

28 Garnero P, Shih WJ, Gineyts E. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79:1693-1700.