

# 血清骨唾液酸蛋白的生物变异性研究

李裕明 HW. Woitge R. Ziegler MJ. Seibel

**摘要 目的** 骨唾液酸蛋白(Bone sialoprotein,简称 BSP)是由成骨细胞分泌的一种非胶原蛋白,反映骨转换和骨形成的指标。最近研究认为:血清 BSP 浓度可反映破骨细胞活性和骨吸收过程,也可能是一个骨吸收指标。本实验测定了血清 BSP 在人体内的生物变异性。**方法** 采用 RIA 法测定了 290 例不同性别和年龄的正常人血清 BSP 的正常值,血清 BSP 的天-天变异性及 24 h 生物周期。**结果** 在儿童组血清 BSP 正常水平明显高于成人组,其最高值在新生儿期和青春期。绝经后妇女其血清浓度比绝经前妇女水平明显升高( $P < 0.05$ )。血清 BSP 在每天同一时间的波动范围在 7.3%至 17.7%(平均 11.7%)。24 h 内有一个明显的生物周期性变化,表现为峰值在凌晨 4~8 时,然后逐渐下降直到午后 14 时为最低,其生物周期的最大波幅为 $\pm 20\%$ , (平均血浓度为 10.5 ng/ml)。**结论** 血清 BSP 反映了骨转换的生理变化与年龄有明显相关性,其血清水平 24 h 内有一个明显的生物周期,而天与天之间变异性较小。

**关键词** 骨唾液酸蛋白 年龄 天-天变异性 生物周期

## Biological variability of serum immunoreactive bone sialoprotein

Li Yuming<sup>1</sup> H. W. Woitge<sup>2</sup>, R. Ziegler<sup>2</sup> and M. J. Seibel<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Xiehe Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022, China

<sup>2</sup> Department of Internal Medicine I, Dept. of Endocrinology and Metabolism,  
University of Heidelberg, Germany

**Abstract Objective** Serum immunoreactive bone sialoprotein(sBSP) accounts for approximately 10% of the non-collagenous proteins of bone. Recent findings suggest that its serum concentrations reflect processes linked to osteoclast activity and bone resorption. **Methods** In order to determine the biological variability of serum BSP, the following studies have been performed: i) measurements of serum BSP in different genders and age groups in healthy subjects ( $n = 290$ ); ii) day-to-day variation ( $n = 9$ ); and iii) diurnal variation ( $n = 10$ ). Serum BSP values were quantified using a newly developed polyclonal RIA for human BSP. **Results** Serum BSP levels were significantly higher in children and adolescents, with highest values during early childhood and during puberty. In postmenopausal women, serum BSP levels were significantly higher, compared with premenopausal women ( $P < 0.05$ ). Day-to-day variability ranged between 7.3 and 17.7% (mean: 11.7%). Diurnal variation showed a peak between 04:00 and 08:00 a. m., followed by a steady decline until noon. The maximum amplitude of this diurnal change was ap-

作者单位: 430022 武汉, 同济医科大学附属协和医院内分泌科(李裕明); 德国海德堡大学医学院内科 I 医院(HW. Woitge, R. Ziegler, MJ. Seibel)

作者简历: 李裕明, 1962 年生, 1985 年毕业于同济医科大学。1996~1998 在德国海德堡大学从事骨质疏松症方面的研究, 获博士学位。现为同济医科大学协和医院内分泌科主治医师、讲师

proximately  $\pm 20\%$  (mean BSP concentration 10.5 ng/ml). **Conclusions** Serum BSP concentrations indicate increased bone turnover soon after the menopause, reflect the pubertal growth spurt, show little day-to-day variability, and exhibit significant diurnal variation.

**Key words** Bone sialoprotein (BSP) Age Day-to-day variation Diurnal variation

骨唾液酸蛋白 (Bone sialoprotein, 简称 BSP) 是一个大的糖基化和磷酸化蛋白质, 其平均分子量是 70~80 kDa (蛋白质部分 34 kDa), 其含量约占骨细胞外基质中非胶原蛋白质的 5%~10%<sup>[1]</sup>。大量的 BSP 主要存在于活性成骨细胞内, 在成牙质细胞和破骨细胞中也有少量 BSP<sup>[2]</sup>。与其他非胶原蛋白质比较, BSP 的组织分布相对局限, 其蛋白质或它的 mRNA 主要分布在矿化组织 (如骨、牙齿) 和钙化的软骨与骨的交界区。另外, BSP 的相关免疫活性也能够在胎盘滋养层和血小板中被测出<sup>[3]</sup>。

BSP 中含有一个精-甘-天(门)冬(RGD)氨基酸结构, 这种结构具有细胞连接作用。通过 BSP 的这个结构可提高成骨细胞和破骨细胞附着于基质表面的能力, 并优先连接到胶原的  $\alpha_2$  链上<sup>[4]</sup>。

BSP 的功能目前还没有完全搞清楚, 离体研究显示: BSP 可刺激羟磷灰石的合成, 并可提高破骨细胞介导的骨分解过程<sup>[5]</sup>, 因此, 认为 BSP 在细胞基质的粘附过程和矿化组织细胞外基质的细胞有机化方面具有重要作用。地塞米松可刺激 BSP 的表达, 而  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  可抑制其表达。

利用放射免疫方法可在人体体液中 (如血液, 关节腔液) 测定到 BSP。为了了解血清 BSP 在正常人群的正常值及生物变异性, 我们进行了以下研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

#### 1.1.1 年龄和性别

236 例健康成人, 年龄 20~82 岁, 全部病例来源于德国海德堡大学医学院内分泌医院及儿童医院门诊病人, 入选前全部病例均排除了各种骨代谢性疾病 (如骨质疏松症, 甲状旁腺机

能亢进症, Paget's 病, 肿瘤骨转移等), 未使用过可影响骨代谢的药品。其中, 男性 74 例, 年龄 21~81 岁, 平均  $48.7 \pm 15.2$  岁。绝经前女性 91 例, 年龄 20~52 岁, 平均  $35.3 \pm 8.5$  岁。绝经后女性 71 例, 年龄 43~82 岁, 平均  $62.3 \pm 10.2$  岁。

54 例健康儿童, 年龄 0~19 岁, 平均  $8.6 \pm 6.9$  岁, 男:女=22:32。

#### 1.1.2 天-天变异

9 例健康成人, 年龄 23~39 岁, 男:女=4:5, 连续 10 天每天中午 12 时抽血测定血清 BSP。

#### 1.1.3 生物周期

10 例健康成人, 年龄 23~39 岁, 男:女=5:5。在一天中的 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00, 20:00, 22:00, 24:00, 2:00, 4:00, 6:00 等 10 个时间点抽血测定血清 BSP。

### 1.2 标本的处理

血液在指定时间采集后, 在室温下放置 30~45 分钟, 使血液完全凝固, 然后在  $4^\circ\text{C}$  3000/min 条件下离心 15 min, 取出血清于 Nunc 试管中于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存直至测定。

### 1.3 血清 BSP 的测定

血清 BSP 免疫活性的测定由德国 Immunodiagnostik 公司提供试剂盒 (RIA 法)<sup>[6]</sup>。方法简述如下:  $100\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$  标记的 BSP (1.5 ng/ml) 和  $100\mu\text{l}$  鸡抗人 BSP 抗体 (1:200) 分别加入同样容积的血清标本、对照和标准液中, 在  $4^\circ\text{C}$  环境中孵化 24 h, 然后加入  $100\mu\text{l}$  的第二抗体 (抗鸡 IgY), 在  $4^\circ\text{C}$  环境中继续孵化 2 h, 将抗体结合后的免疫复合物在 2000 g 条件下离心 10 分钟, 丢弃上清液, 其沉积物用  $250\mu\text{l}$  缓冲液清洗后再离心 10 分钟 (2000 g), 然后, 放于  $\gamma$ -计数器中测定 1 分钟, 结果通过标准曲线来计算。

所有结果用 *t* 检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 年龄和性别的影响

通过对 236 例健康成人测定,其血清 BSP 的正常范围为  $11.2 \pm 4.7$  ng/ml (平均值为  $10.5$  ng/ml)。在儿童组,血清 BSP 为  $30.8 \pm 19.4$  ng/ml (平均  $23.6$  ng/ml) 明显高于成人组 ( $P < 0.001$ ) (表 1)。血清 BSP 的最高值在新生儿期和青春期(图 1)。在绝经后妇女,血清

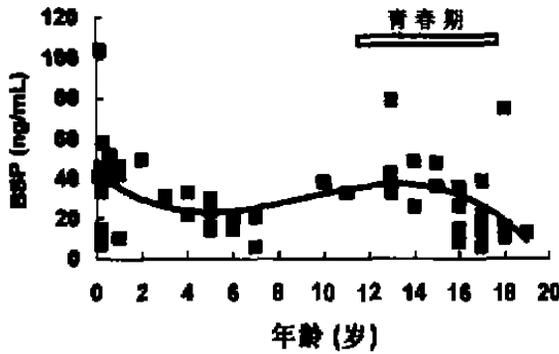


图 1 血清 BSP 在儿童组的分布情况

BSP 与年龄比较无相关性 ( $r = 0.01$ ), 在绝经前妇女,其血清 BSP 与年龄比较呈负相关 ( $r = -0.4$ ) 且绝经后妇女血清 BSP 明显高于绝经前妇女, ( $9.2 \pm 4.9$  vs  $7.3 \pm 3.3$ ,  $P < 0.05$ )。在男性,其血清 BSP 高于绝经前妇女 ( $9.3 \pm 6.0$  vs  $7.3 \pm 3.3$ ,  $P < 0.05$ ), 但与绝经后妇女比较没有显著性改变。在男性组,血清 BSP 与年龄比较没有相关性 ( $r = 0.2$ )。

表 1 年龄对血清 BSP 的影响

	n	年龄	sBSP (ng/ml)
儿童	54	$8.6 \pm 6.9$	$30.1 \pm 19.3^*$
男性	74	$48.7 \pm 15.2$	$9.3 \pm 6.0$
绝经前女性	91	$35.3 \pm 8.5$	$7.3 \pm 3.3$
绝经后女性	71	$62.3 \pm 10.2$	$9.2 \pm 4.9$

注:与成人比较 \* $P < 0.01$

### 2.2 天-天变异性

血清 BSP 个体的天-天变化波动振幅为  $7.3\%$  至  $17.7\%$  之间,平均  $11.7\%$  (图 2)。

### 2.3 生物周期性

血清 BSP 显示有一明显的生理周期性改

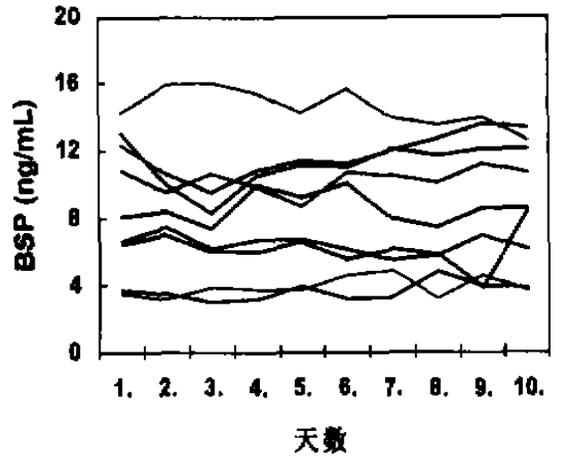


图 2 血清 BSP 的天-天变异性(个体值)

变,凌晨 4 时至 8 时水平达最高峰,然后逐渐下降至午后 14 时左右为最低值。最大波动范围在  $\pm 20\%$ , 平均血清浓度为  $10.5$  ng/ml, (图 3)。

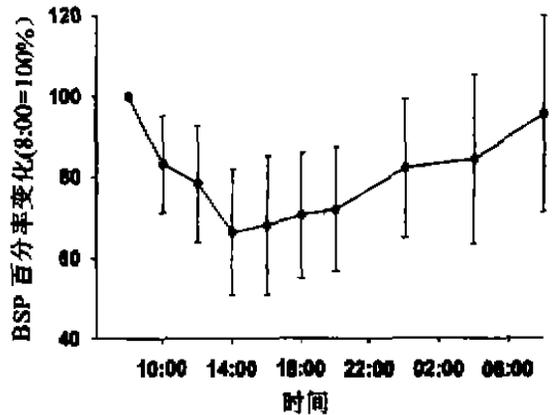


图 3 血清 BSP 的生物周期性变化

## 3 讨论

骨唾液酸蛋白(BSP)是一种细胞基质中的非胶原蛋白质,与其它非胶原蛋白质比较,BSP 的组织分布相对较局限,主要分布在骨和牙齿以及钙化的软骨与骨的交界处,虽然 BSP 不只是仅分布在骨组织中,但血 BSP 仍可作为一个非常有潜力的反映骨转换的骨代谢指标。在国外,血清免疫活性的 BSP 水平已经被作为一个新的骨吸收代谢指标用于临床研究。在一些骨代谢性疾病,如多发性骨髓瘤(MM)无症状或良性甲状旁腺机能亢进症(PHPT)。Paget 病,以及骨转移瘤病人,血清 BSP 水平明显升

高<sup>[7]</sup>。据最新研究显示,在原发性乳腺癌病人,血清 BSP 升高可提示早期骨转移,Diel 通过对 388 例乳腺癌病人研究表明,血清 BSP 浓度高于 24 ng/ml 的病人比血清 BSP 浓度低于 24 ng/ml 的病人肿瘤骨转移的发病率高 94 倍<sup>18</sup>。

大多数骨代谢生化指标,如骨钙素(OC),骨特异性碱性磷酸酶(BAP),尿吡啶酚(Pyr),脱氧吡啶酚(Dpyr)都显示一个明显的年龄相关性<sup>[9,10]</sup>。即在儿童和青年时期其血清水平明显高于成人。本研究显示,血清 BSP 水平在儿童期高于成人约 2 倍以上,在新生儿期和青春期出现两个明显的高峰值,说明在这时期人的骨转换速度最高,在青春期后,血清浓度逐渐恢复到成人水平,这与其他骨代谢指标结果一样。长期以来,骨代谢指标一直是作为儿童青春期发育障碍的临床诊断依据和对这类病人进行激素治疗的疗效观察指标,并且利用骨代谢指标可以估价儿童的骨生长发育速度。本研究提示,血清 BSP 在儿童骨生长发育障碍诊断及治疗方面具有重要的临床使用价值。

在成人,年龄对血清 BSP 水平的影响不明显。在女性,月经状况对血清浓度具有明显影响。本文显示,在绝经后妇女其血清 BSP 水平明显高于绝经前妇女。这主要是由于绝经后妇女体内雌激素水平明显下降而对骨吸收作用抑制减弱,导致骨吸收过程增强,最后导致整个骨转换过程增强所致。

骨生化代谢指标具有明显的生物周期已被许多研究证实,如脱氧吡啶酚(Dpyr),I型胶原交联氨基末端肽(NTX),I型胶原交联羧基末端肽(CTX)等<sup>[11]</sup>。在本研究中,血清 BSP 也表现出一个明显的生物周期性,即凌晨 4 时至 8 时血清水平为最高,然后出现持续性下降至午后 14 时左右为最低。但血清 BSP 的天-天变异性较小,每天同一时刻平均血清浓度变化为 11.7%,变化不是很明显。骨代谢指标生物变异性的机理还不清楚,估计与体内激素调节有关,

一些影响骨代谢的激素,如甲状旁腺素 PTH,糖皮质激素都存在明显的生物周期。通过骨代谢指标生物变异性的了解,在临床研究中可避免因生物变异性而导致的检查误差。

### 参 考 文 献

- 1 Fisher LW, Whitson SW, Avioli LW, et al. Matrix sialoproteins of developing bone. *J Biol Chem*, 1983, 258: 12723.
- 2 Bellahcene A, Merville MP, Castronovo VTI. Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein in human breast cancer. *Cancer Res*, 1994, 54: 2823.
- 3 Chenu C, Delmas PD. Platelets contribute to circulating levels of bone sialoprotein in human. *J Bone Miner Res*, 1992, 7: 47.
- 4 Fujisawa R, Nodasaka Y, Kuboki Y. Further characterization of interaction between bone sialoprotein and the collagen. *Calcif Tissue Int*, 1995, 56: 140.
- 5 Ross FP, Chappel J, Alvarez JJ, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, 1993, 268: 9901.
- 6 Karmatschek M, Maier I, Seibel MJ, et al. Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay. *Clin Chem*, 1997, 43: 2076.
- 7 Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, et al. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 3289.
- 8 Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, et al. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *New Engl J Med*, 1998, 339: 357.
- 9 Magnusson P, Hager A, Larsson L. Serum osteocalcin and bone and liver alkaline phosphatase isoforms in healthy children and adolescents. *Pediatr Res*, 1995, 38: 955.
- 10 Fujimoto S, Kubo T, Tanaka H, et al. Urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy children and children with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80: 1922.
- 11 Ju HS, Leung S, Brown B, et al. Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clin Chem*, 1997, 43: 1570.