

·综述·

骨桥蛋白与骨代谢

高艳虹 王洪复

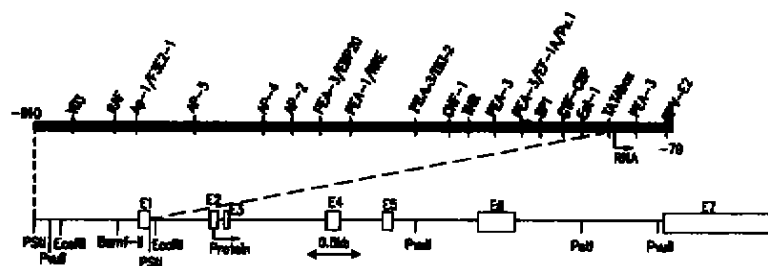
骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)作为一种分泌型的磷酸化蛋白,它有着广泛的组织分布。近些年来的研究显示它在体外具有调节细胞粘附、浸润与迁移的功能,参与到多种生命现象中,如骨代谢,肿瘤的生长、转移,抗感染免疫等^[1],故受到人们的重视。在骨代谢中 OPN 通过它的 RGD 顺序与整合素受体家族,识别调节破骨细胞与骨基质之间的粘附,从而影响骨吸收。本文作者就骨桥蛋白与骨代谢的关系做一综述。

一、OPN 的结构特点

骨基质蛋白由胶原和非胶原蛋白组成,OPN 是非胶原蛋白的重要成分之一。它是含有多个糖基化位点的磷酸化蛋白,富含丝氨酸、天冬氨酸和谷氨酸基团。一般而言,大鼠 OPN 的多肽主干分子量为 32 kDa,加上磷酸基和糖基则为 42~44 kDa。在不同物种与同一物种的不同细胞中,OPN 的大小与形式也不完全相同。Sodek 等人发现大鼠成熟的成骨细胞中合成 44 kDa 的 OPN,而未分化成熟的前成骨细胞则合成一种 55 kDa 的低磷酸化蛋白,推测这可能是 mRNA 不同剪切的结果^[2]。此外,分泌到细胞外的 OPN 可经凝血酶降解而产生两段不同大小的片段,酶水解位点距 OPN 的功能性序列 RGD 的羧基端仅有 6 个氨基酸的距离。但这些片段的功能尚不清楚。通常 OPN 以磷酸化的形式存在,这与它的功能密切相关,有时也以非磷酸化的形式存在。Chang 等发现小鼠表皮细胞 JB6 在 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的诱导下表达非磷酸

化的 OPN,而在氟波酯(TAP)的诱导下则表达磷酸化的 OPN,并且产生表型的转化(变为非贴壁生长),这提示磷酸化的 OPN 在细胞转化中可能起重要作用^[3]。在 OPN 的结构中存在 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, Arg-Glu-Asp)序列,普遍认为它与细胞表面的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体结合,从而介导细胞的多种生理功能。但是,也有人认为它与整合素受体的结合还需其他基团参与,如 GRGDS(甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸, Gly-Arg-Gly-Asp-Ser)序列。

编码 OPN 的基因已被克隆, cDNA 序列已明确。Crivello JF 等比较分析包括人在内的 6 个不同物种 OPN 的 cDNA 序列时,发现在它们编码 N 末端、C 末端和包括 RGD 序列的约 50 个氨基酸肽段的 3 个区域的基因序列呈现高度的保守性,而其他区域存在不同程度的差异^[4]。同一物种的不同组织来源的 cDNA 序列也存在一定差异,如人的骨细胞与脱膜细胞 cDNA 有 42 个核苷酸的差异,而牛的肾脏细胞与骨细胞的 cDNA 序列存在显著差异,甚至有人推测牛的基因组中存在 2 个拷贝的 cDNA 基因^[5]。目前对小鼠 cDNA 的基因结构认识较为清楚(如图 1),长约 7 kb,包括 7 个外显子,外显子 1 的 5'端上游是启动子区域,转录因子结合位点呈线性分布其中,此外还分布有 TATA box, CCAAT box, GC box 与 Spl 识别序列^[6]。

图 1 小鼠的 OPN 基因结构^[6]

二、OPN 基因的转录调控

OPN 的表达具有组织特异性,分布于骨、肾、皮肤等组织,受到多种激素、生长因子和原癌基因的调节。对体外培养的大鼠骨组织分别给予糖皮质激素和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 后用原位杂交检测到骨 OPN 的 mRNA 表达均明显增强^[7]。而且

已发现 OPN 基因的启动子(-758~-741)存在 9 kb 长的维生素 D 反应元件(vitamin D response element),通过它实现对基因的调节^[8]。降钙素(CT)是能抑制破骨细胞(osteoclast, OC)骨吸收的激素, Haji 发现降钙素作用于兔破骨细胞时引起细胞内 cAMP 与 Ca^{2+} 水平上升, PKC 活性上升,同时 OPN-mRNA 的表达被抑制^[9]。故推测, CT 与 OC 表面受体结合后,通过第二信使的信号传递下调 OPN 的基因转录。甲状

作者单位: 200032 上海, 复旦大学医学院(原上海医科大学)老年医学中心骨代谢研究室

旁腺素(PTH)可在转录水平下调节成骨样细胞的 ROS17/2.8 的基因表达,可能也是通过激活 cAMP 途径实现的。细胞因子 TGF- β 增强 MC3T3E1, ROS17/2.8 等几种成骨细胞株 OPN 基因的转录表达^[10],却抑制 NRK(normal rat kidney)细胞的 OPN 基因表达。这种差异的机理尚不明确。在基因表达的调控分子机理上,已明确了许多转录因子的位点。如 AP-1/PEA-1 结合位点(-718 ~ -712)与原癌基因的作用相关,AP-1 可被 TPA, c-fos, v-raf, v-nos, v-src, c-Ha-ras 等激活;AP-2 则是调节信号传递系统效应的转录因子。OPN 的分布有组织特异性,这是由它的启动子或增强子特点决定的。例如, Pu.1 蛋白是巨噬细胞特异的转录因子,识别启动子 -120 ~ -115 区,而 Ets-1 是淋巴组织特异的转录因子,识别启动子的 -39 ~ -34 区域^[11]。

三、OPN 与骨重建

在骨组织中,OPN 可由骨细胞、破骨细胞和骨细胞分泌,在骨基质的吸收、矿化以及维持骨组织与周围组织的完整性中有着重要作用。

骨吸收时,破骨细胞与骨基质粘附,细胞膜与骨面之间形成亮区,创造了骨吸收的微环境。一般认为 OPN 与 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体之间的相互作用在 OC 对骨基质的粘附过程中非常重要^[12]。在 OC 表面存在 $\alpha_v\beta_3$ 整合素,可以结合特殊顺序 RGD 从而识别 OPN 这一骨基质蛋白。整合素受体被激活后通过信号系统的传递调控某些水解酶基因的表达,为骨吸收创造条件^[13]。Mark 等报道在 OC 与骨基质粘附部位,免疫组化显示 OPN 阳性。在已矿化骨的表面富含 OPN 并形成板层状限制结构(laminae limitantes),这与 OPN 调节粘附作用也是一致的。然而,对 OPN 在骨吸收中的作用方式也存有争议。Jin 等认为成骨细胞受骨吸收刺激因子(如 TNF, IL 等)作用分泌 OPN,通过与破骨细胞上的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素作用而增强 OC 的骨吸收活性^[14]。Terui 则认为 OPN 对 OC 有趋化作用,增强 OC 的聚集^[15]。值得一提的是,OPN 基因缺陷型小鼠会出现骨质疏松症,并且与野生型小鼠相比,能抵抗因卵巢切除引起的骨量减少,而两者在卵巢切除后子宫重量均显著下降^[16,17]。这提示 OPN 是绝经后骨质疏松症发病机理的作用环节之一。

免疫电泳显示,在生长的骨组织的矿化边缘,钙化的软骨,牙齿,动脉粥样斑块的钙化处,肾结石中都有 OPN 存在^[18,19]。它出现在生理性与病理性的钙化组织中,揭示该蛋白与矿化有着密切的关系。研究表明,磷酸化的 OPN 在体外抑制羟磷灰石的形成和晶体的生成,并呈量效关系。但是非磷酸化的 OPN 却无此活性^[20]。因此,不同的磷酸化形式很可能决定了 OPN 与矿盐之间的相互作用。

在骨重建的顺序过程中,由成骨细胞(osteoblast, OB)分泌的 OPN 形成一条粘合线(cement line)覆盖曾被 OC 吸收的骨表面。接着由能分泌胶原的成熟 OB 产生基质,此时 OPN 分布于整个矿化的基质区。在骨形成的末期,OB 分泌的胶原逐渐变细,且 OB 表型改变转为衬里细胞,分泌 OPN 构成骨表面的板层限制结构^[21]。可见,在骨重建过程中,OPN 参

与了基质-基质、基质-细胞间的相互作用。

此外,OPN 可能参与维持骨组织与周围组织的连接。首先,OPN 可同矿化基质中的主要成分 I 型胶原和骨钙素(BGP)相互结合;其次,OPN 是转谷氨酰胺酶的底物,该酶能交联 OPN,诱导 OPN 的分子构像改变,暴露与胶原结合的序列;再者,在韧带、肌腱的骨质附着处 OPN 含量丰富^[22,23]。因此,OPN 可能增强相邻界面间的粘附性。

综上所述,骨桥蛋白 OPN 在骨代谢中担任着重要的作用,但对其的作用机理:例如,骨形成中的确切作用与作用机理如何,如何调节矿盐的生成等尚待深入认识。

参 考 文 献

- Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*, 1998, 30-31: 92-102.
- Sodek J, Chen J, Nagata T, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblast. *Ann NY Acad Sci*, 1995, 760: 223-241.
- Chang PL, Prince CW. 1,25(OH)₂D stimulates synthesis and secretion of non-phosphorylated osteopontin in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res*, 1991, 51: 2144-2150.
- Crivello JF, Delvin E. Isolation and characterization of a cDNA for osteopontin-k, a kidney cell adhesion molecule with high homology to osteopontin. *J Bone Min Res*, 1992, 7: 693-699.
- Kerr JM, Fisher LW, Termine JD, et al. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. *Gene*, 1991, 108: 237-243.
- Behrend EI, Chambers AF, Wilson SM, et al. Comparative analysis of two alternative first exons reported for the mouse OPN gene. *J Biol Chem*, 1993, 268: 11172-11179.
- Chen J, Thomas HF, Sodek J. Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA expression by dexamethasone and 1,25(OH)₂D₃ in rat bone organ cultures. *Connec Tissue Res*, 1996, 34: 41-51.
- Ridall AL. Characterization of the rat osteopontin gene: evidence for two vitamin D response elements. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 760: 59-66.
- Kaji H, Sugimoto T, Migauchi A, et al. Calcitonin inhibits osteopontin mRNA expression isolated rabbit osteoclasts. *Endocrinology*, 1994, 135: 484-487.
- Wrana JL, Kubota T, Zhang Q, et al. Regulation of SPPI/osteopontin expression by TGF- β . *Biochem J*, 1991, 273: 523-531.
- Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*, 1993, 7: 1475-1482.
- Ross FP, Chappel J, Alvarez JL, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha_v\beta_3$ potentiated bone resorption. *J Biol Chem*, 1993, 268: 9901-9907.
- Lakkakorpi PT, Horton MA, Helfrich MH, et al. Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclast to the bone surface. *J Cell Biol*, 1991, 115: 1179-1186.
- Jin C, Miyaura C, Ishimi I, et al. Interleukin 1 regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblast. *Mol Cell Endocrinol*, 1990, 74: 221-228.

(下转第 282 页)

在进行骨密度的检测时,引起检测 BMD 值质量波动的原因可归结为两类^[8]。一类是随机误差,难以从技术上消除。随机误差对测定质量影响不大,所引起的质量波动属于正常波动,这类因素的一个特征是其产生的波动服从统计规律,一般服从正态分布;另一类是异常因素,它们在检测过程中少量存在,并且对检测质量不经常起作用,这类系统性因素对 BMD 的离散度影响很大,并且它是不稳定的,不符合统计规律。

虽然 BMD 测量的正常波动和异常波动交织在一起,但其统计规律是可以掌握的。正常波动是符合统计规律的,如一旦出现异常波动,就必然使波动偏离原来的分布,利用统计技术就可以发现偏移。表征 BMD 值的质量指标,既决定于可以控制的系统因素,又决定于大量不能控制的偶然因素,因此它们的取值带有随机性,在期望值(μ)上下波动,是一个随机变量,因此对检测过程的质量控制问题,就转化为对参数 μ 和 σ 的控制问题^[9]。

统计分析包括:①对目前数据的现状研究^[7,10,11];估计长期漂移的数字校正,并推导出各中心标定的方法;②研究分布趋势对将出现的结果进行估计;包括分层分析发现各中心及各仪器的主要变动因素。

目前,有关 BMD 质量控制统计分析的模式大致有以下 3 种。

1. 各中心 DXA 资料的可比性研究^[1,7,11];主要是比较变异系数(CV),同时通过比较每一中心的体模均值,发现有无差异,计算线性相关系数,并在相应的统计模型下进行校正。

2. 纵向 BMD 值的分析^[1,9];因为几乎所有的 BMD 值的改变并非是一个突变,而是若干个有此趋势的离散值的累积和,故常采用 CUSUM 累积和控制图。

3. 建立在基线和终点之间的 BMD 改变百分率以及改变斜率的模型^[12]。

国内尚未有从统计学角度来对 BMD 检测进行质量控制的文献。鉴于 BMD 检测的重要性,国内如再不开展这方面

的研究,越来越多的骨密度测定不但是资源的浪费,对病人来说更是一种危害,希望本文能使研究者在 BMD 检测的质量控制方面给予重视。

参 考 文 献

- 1 Eric SO, Shelia KO, et al. Longitudinal precision of dual X-ray absorptiometry in a multicenter study. *J Bone Res*, 1991, 6: 191-197.
- 2 Lu Y, Mathur AK, Gluer CC, et al. Application of statistical quality control methods in multicenter longitudinal osteoporosis clinical trials. International conference on statistical methods and statistical computing for quality and productivity improvement. Vol. II, Seoul, Korea: 1995. 478-480.
- 3 Hagiwara S, Engelke K, Yang SO, et al. Dual X-ray absorptiometry forearm software: accuracy and intermachine relationship. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(9): 1425-1427.
- 4 Lu Y, Mathur AK, Fuerst T, et al. Dual X-ray absorptiometry quality control: comparison of visual examination and process-control charts. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(5): 626-637.
- 5 Baran DT, Faulkner KG, Genant HK, et al. Diagnosis and management of osteoporosis: guidelines for the utilization of bone densitometry. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61: 433-440.
- 6 刘忠厚主编. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998: 35-56.
- 7 Gluer CC, Faulkner KG, Engelke K, et al. Quality assurance for bone densitometry research studies: concept and impact. *Osteoporosis Int*, 1993, 3: 227-235.
- 8 Gajardo H, Barrera G. Quality control of bone densitometry: precision, reproducibility, and clinical application. *Rev Med Chil*, 1998, 126: 56-62.
- 9 陈国铭. 统计质量控制. 北京: 中国石化出版社, 1996: 11-88.
- 10 张光, 韩邑, 崔琪, 等. 骨密度定量 CT 测量用固体标准件的研究. *中华放射学杂志*, 1998, 32: 561-563.
- 11 Faulkner KG, McClung MR. Quality control of DXA instruments in multicenter trials. *Osteoporosis Int*, 1995, 5: 218-227.