

羧化不全骨钙素 ——值得关注的骨代谢生化指标

周波 闫丽娅(审校)

近年来,维生素 K 依赖性骨蛋白——骨钙素,尤其是骨钙素羧化程度与骨健康的关系在骨代谢生化指标的研究中引起广泛关注。一些研究结果发现血清羧化不全骨钙素(undercarboxylated osteocalcin, ucOC)水平是反映机体维生素 K 营养状态的敏感指标,而且与骨转换、骨密度和髌部骨折有关,提出是否可能用 ucOC 作为预测髌部骨折危险性的生化指标。现将有关研究概述如下。

一、骨钙素和羧化不全骨钙素

骨钙素(osteocalcin, Bone Gla protein, BGP)是由成骨细胞和成牙质骨细胞合成的特殊骨蛋白。骨钙素在骨组织中含丰富,占非胶原蛋白的 15%~20%,占骨蛋白的 1%~2%。骨钙素由成骨细胞合成后,约 20%从骨组织直接进入血液,因此血中骨钙素的浓度和羧化程度可以反映骨中骨钙素的状态^[1]。骨钙素含 49 个氨基酸残基,分别在 17, 21, 24 位置上含有一个谷氨酸残基^[2]。在维生素 K 依赖性羧化酶的作用下,3 个谷氨酸残基羧化为羧化谷氨酸(Gla)^[3],骨钙素被激活, Gla 中 α -螺旋与羟磷灰石中的钙离子紧密结合,一起沉积在骨组织中,促进骨矿化。骨钙素和羟磷灰石的结合能力与骨钙素的羧化程度有关,无论骨钙素结构中含有 3 个、2 个或 1 个没有羧化的谷氨酸残基,都将降低其与羟磷灰石的结合能力^[4]。将含有未羧化谷氨酸残基的骨钙素称为羧化不全骨钙素。

骨钙素的合成受维生素 D 和维生素 K 的共同调节。维生素 D 直接在基因转录水平发挥作用^[5],其中主要是 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 起作用,骨钙素的合成与细胞中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的浓度有关。Price 等^[6]发现在骨肉瘤细胞中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可使骨钙素合成增加 6 倍。Koshihara 等^[7]在人类成骨细胞实验中,观察到在 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在时维生素 K_2 可促进矿化,认为 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 促进骨钙素产生主要是通过促进维生素 K_2 对骨钙素的羧化作用,促进骨钙沉积。维生素 K 参与蛋白质的翻译后羧化修饰过程。维生素 K 以辅酶的形式发挥作用,其辅酶活性形式是氢醌(K_2H),反应时被分子氧氧化为环氧化合物(KO),提供能量,使底物蛋白谷氨酸残基的 γ -位结合 CO_2 ,变成 γ -羧化谷氨酸, KO 形式的维生素 K 在二硫醇依赖性还原酶的作用下,重新转变为 KH 形式,构成体内“维生素 K-循环”。

二、羧化不全骨钙素与人体维生素 K 营养状态

最近大量研究表明机体维生素 K 营养状态与骨质疏松有关^[8],血清 ucOC 水平是反映机体维生素 K 营养状态的敏感指标。

人群流行病学调查发现绝经后的妇女血清 ucOC 水平随年龄而增加,尤其是 70 岁以后的老年妇女^[9-12]。Plantalech 等^[9]发现绝经前和绝经后妇女血清骨钙素水平没有显著性差异,但血清骨钙素与羟磷灰石的结合能力绝经后妇女比绝经前妇女低 50%。Sokoll 等^[13]对健康成人进行研究,将血浆 ucOC 与其它能反映维生素 K 营养状态的生化指标如:血浆维生素 K 浓度、血浆维生素 K 抗凝蛋白 II (凝血因子 II) (Protein induced by vitamin K antagonists II, or protein-induced VK absence- II, PIVKA- II) 浓度、尿中谷氨酸与尿肌酐排出率等进行比较。结果发现:血浆 ucOC 能较好地反映维生素 K 营养状态,与血浆维生素 K 浓度呈显著负相关,而且在叶绿醌(VK_1)耗竭和补充实验中血浆 ucOC 比其它指标变化更明显。当尿中谷氨酸与尿肌酐排出率无变化时血浆 ucOC 水平已显著下降。

Binkey 等^[14]给 112 名老年男女和青年男女每天补充 $1000\mu\text{g}$ 叶绿醌,1 周后血浆 ucOC 从 7.8%降至 3.4%,没有性别和年龄的差异。同时未观察到 I 型胶原蛋白代谢产物和骨碱性磷酸酶的变化。Sokoll 等^[15]研究了 9 个青年(5 男、4 女)受试者,当膳食叶绿醌含量从 $100\mu\text{g}/\text{d}$ 增加到 $490\mu\text{g}/\text{d}$, 4 d 后血清 ucOC 从 21.9%降到 12.8%,而膳食叶绿醌含量恢复 $100\mu\text{g}/\text{d}$, 4 d 后血清 ucOC 又增到 16.7%,试验其间血浆维生素 K 和 24 h 尿谷氨酸与尿肌酐排出率也有相应的变化。他们还观察了该人群血清骨钙素和 ucOC 1 d 24 h 的变化情况,发现增加膳食叶绿醌对总骨钙素 1 d 内血清浓度变化影响不明显,而主要影响 ucOC 浓度变化^[16]。Booth 等^[17]用富含维生素 K_1 的食物(绿菜花)和维生素 K_1 强化植物油,使受试者每日维生素 K 摄入量超过推荐的人体每日 VK 供给量标准的 5 倍。5 d 后血浆 ucOC 水平明显下降。而尿谷氨酸与尿肌酐排出率没有变化。

胆囊纤维病变的病人由于脂肪吸收障碍,维生素 K 营养状态较差。Beker 等^[18]给胆囊纤维病变的病人每周口服 5 mg 维生素 K_1 , 4 周后血浆 ucOC 百分比明显低于对照组病人。

香豆类类药物(warfarin)主要是阻断维生素 K 循环,使蛋白产生缺乏 Gla 残基或没有 Gla 残基的骨钙素,它是临床上

作者单位: 110034, 沈阳, 沈阳医学院预防医学系

广泛应用的抗凝剂。长期口服香豆素药物的病人血清中 ucOC 明显高于对照组^[18-21]。许多实验通过口服香豆素钠盐来改变维生素 K 状态,也显示出血浆 ucOC 对抗凝剂敏感。一个实验口服香豆素 30 mg/d 后 72h 采血^[19],另一个实验是同剂量长期治疗后采血^[20],血浆 ucOC 都明显增加。Sokol 等^[21]发现每天口服 1 mg 香豆素,7 d 后,实验组血浆 ucOC 水平增加 170%,而后每天补充 5 mg 叶绿醌,2 d 后血浆 ucOC 恢复正常。但在整个实验期,总骨钙素浓度和凝血时间没有变化。

ucOC 与人体维生素 D 营养状态的关系目前人体研究的结果不尽一致。尽管 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 调节骨钙素的合成,但没有发现血浆 ucOC 水平与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 有关系。Szulc 等^[11]观察到老年妇女血清 ucOC 与 25 羟维生素 D 成负相关。而 Takahashi 等^[25]对老年妇女和老年椎骨和髌部骨折的妇女分别补充 VK + VD、VK、VD 4 星期、VK + VD 和 VK 组 ucOC 均显著降低,而 V D 组 ucOC 没有变化,可见 VD 不影响骨钙素的羧化状态。

三、ucOC 与髌部骨密度及髌部骨折危险性

许多研究显示 ucOC 可能是反映老年人髌部骨折和骨状态的生化指标。Szulc^[22]对 98 名老年妇女调查发现血浆 ucOC 水平与髌部骨密度呈负相关。Szulc 等^[11]对 195 名 70 ~ 101 岁的老年妇女跟踪调查 18 个月,发现血清 ucOC 水平高者髌部骨折危险性是血清 ucOC 正常者的 5.9 倍,而血清甲状旁腺素浓度、25 - 羟维生素 D、碱性磷酸酶和总骨钙素在髌部骨折组和对照组间无显著性差异,提出血清 ucOC 水平是预测老年妇女骨折危险性的生化指标。而后为进一步确证所观察的结果,他们又对一个大样本调查中的 183 名 70 ~ 79 岁老年妇女进行了 3 年前瞻性研究,其中 30 人发生髌部骨折,经年龄和血清甲状旁腺素浓度调整后血清 ucOC 水平高者髌部骨折危险性是血清 ucOC 正常者的 3 倍^[23]。Vergnand 等^[24]更突出强调了 ucOC 的重要性,他们对 7598 名 75 岁以上老年妇女进行了 22 个月前瞻性调查研究,发现血清 ucOC 高者髌部骨折危险性增加 2 倍,对髌部骨矿含量低而且血清 ucOC 高者髌部骨折危险性比对照组增加 5 倍。但血清总骨钙素与髌部骨折危险性无关,可见血清 ucOC 的变化比总骨钙素变化敏感。Takahashi 等^[25]测定了 204 名妇女血清 ucOC 和总骨钙素,其中 43 名经绝前妇女,48 名经绝后健康妇女,89 名骨质疏松性椎骨骨折患者,24 名髌部骨折患者,发现髌部骨折的老年妇女血清 ucOC 明显低于同龄健康妇女和椎骨骨折妇女的血清 ucOC。但 Liu 等^[10]调查了 257 名 60 ~ 99 岁妇女,其中 22 例有髌部骨折病史,没有发现有髌部骨折病史组血清 ucOC 水平比对照组高。

四、ucOC 的测定

尽管 ucOC 有较重要的生理意义,但尚没有理想的测定方法。目前主要有两大类方法,一类是间接方法,主要利用羧化骨钙素能与羟磷灰石或硫酸钡强力结合,而 ucOC 与羟磷灰石或硫酸钡不结合或结合力弱,用羟磷灰石或硫酸钡沉淀血清或血浆后 ucOC 留在上清液中。首先用放射免疫法

(RIA)或酶联免疫法(ELISA)测定血清或血浆中骨钙素浓度,再用同样方法测定用羟磷灰石或硫酸钡沉淀血清或血浆后上清液中的 ucOC,常以 ucOC 占骨钙素的百分比即 ucOC(%)表示^[21]。另一类是直接方法——酶联免疫法^[24],是用一种或两种单克隆抗体直接测定血清或血浆中 ucOC,以 ucOC 的绝对值表示。无论哪种方法目前都不能准确测定血浆 ucOC 中含有 1 个、2 个或 3 个羧化谷氨酸残基的 ucOC 的比例。

血浆中骨钙素在一些因素的作用下(包括采血处理过程,血液贮存条件等)可能分解成 5 种片段(1 ~ 19, 20 ~ 43, 45 ~ 49, 1 ~ 43 和 20 ~ 29)^[26],有些试剂盒只能检测完整骨钙素,有些试剂盒还可检出大的片段。在用羟磷灰石或硫酸钡沉淀时,所加试剂的状态和量对测定结果影响较大。Gundberg 等^[20]和 Sokoll 等^[21]均对上述方法进行了比较研究,发现不同的试剂盒、不同来源的羟磷灰石或硫酸钡试剂及试剂的浓度对测定结果的影响较大,所得值甚至相差 5 倍。羟磷灰石沉淀法测定的 ucOC 值仅是酶联免疫法测定值的 67%,但酶联免疫法也有可能受血中其它因子影响使 ucOC 测定值偏高。

由于测定 ucOC 的方法尚不完善,不同实验室的结果可比性较差,因此对不同文献做比较时应从其所用试剂盒和方法等多方面加以考虑。

五、有待于进一步研究的问题

虽然近年来关于 ucOC 的研究取得了许多进展,但仍有以下问题有待于进一步研究。

(1)目前 ucOC 的人群研究资料主要是老年女性,所得的结果也不一致,尚需进一步研究,尤其应增加对男性的研究。

(2)目前血清或血浆中 ucOC 的检测方法尚不成熟,而且不能测出究竟 1 个、2 个还是 3 个谷氨酸残基没有羧化,需尽快建立敏感、有效和准确的方法。

(3)是否可将血中 ucOC 水平作为预测髌部骨折危险性的生化指标尚需进行人群大样本的长期前瞻性研究。

参 考 文 献

- 1 Price PA, Williamson MK, Lothringer JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem*, 1981;256:12760-12766.
- 2 Hruschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975;72:3925-3929.
- 3 Guylaine Ferland. Vitamin K-dependent protein: an update. *Nutri Rev*, 1998;56:223-230.
- 4 Price PA. Vitamin K-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function. *Vitam Horm*, 1985;42:65-108.
- 5 Hruschka PV, Lian JB, Cole DEC, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein; vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 1989;69:990-1047.
- 6 Price PA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol*, 1981;225:1160-11663.
- 7 Koshihara Y, Hoshi K, Ishibashi H, et al. Vitamin K2 Promotes 1 α 25

- (OH)₂ vitamin D3-induced mineralization in human periosteal osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59:466-473.
- 8 Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr*, 1995, 125:1812-1821.
- 9 Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud M, et al. Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone Gla protein) in elderly women. *J Bone Min Res*, 1991, 11:1211-1215.
- 10 Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int*, 1998, 62:286-289.
- 11 Szulc P, Chapuy MC, meunier PJ, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest*, 1993, 91:1769-1774.
- 12 Knapen. MHJ, Hamulyak K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone Gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann Intern med*, 1989, 111:1001-1005.
- 13 Sokoll LJ, Sadowski. JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63:566-573.
- 14 Binkley NC, Krueger DC, Engelke JA, et al. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under- γ -carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72:1523-1528.
- 15 Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, et al. Changes in serum osteocalcin, plasma phyloquinone, and urinary γ -carboxyglutamic acid in response to altered intake of dietary phyloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr*, 1997, 65:779-784.
- 16 Sokoll LJ, Booth SL, Davidson KW, et al. Diurnal variation in total and undercarboxylated osteocalcin influence of increased dietary phyloquinone. *Calcif Tissue Int*, 1998, 62:447-452.
- 17 Booth. SL, Erien-Morse M, Dallal GE, et al. Response of vitamin K status to different intakes and sources of phyloquinone-rich foods: comparison of younger and older adults. *Am J Clin Nutr*, 1999, 70:368-377.
- 18 Beker LT, Ahrens RA, Fink RJ, et al. Effect of vitamin K1 supplementation on vitamin K status in cystic fibrosis patients. *J Pedia Gastroenterol Nutr*, 1997, 24:512-517.
- 19 Markus J, Seibel, MD. Serum undercarboxylated osteocalcin and the risk of hip fracture (Editorial). *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82:717-718.
- 20 Gundberg CM, Nieman SD, Abrams N, et al. Vitamin K status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83:3258-3266.
- 21 Sokoll LJ, Erien M, Marian E. undercarboxylated osteocalcin and development of a method to determine vitamin K status. *Clin Chem*, 1995, 41:1121-1128.
- 22 Szulc P, Arlot M, Chapuy MC, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin correlates with hip bone mineral density in elderly women. *J Bone Mine Res*, 1994, 9:1591-1595.
- 23 Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow-up study. *Bone*, 1996, 18:487-488.
- 24 Vergnaud P, Garnero P, Meunier. PJ, et al. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women; the EPIDOS study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82:719-924.
- 25 Takahashi M, Naitou K, Ohishi T, et al. Effect of vitamin K/or D on undercarboxylated and intact osteocalcin in osteoporotic patients with vertebral or hip fractures. *Clin Endocrinol*, 2001, 54:219-224.
- 26 Farrugia W, Melick RA. Metabolism of osteocalcin. *Calcif Tissue Int*, 1986, 39:234-238.