

骨桥蛋白与生物矿化

孙婕 刘宁 尹国友

中图分类号: R68 文献标识码: C 文章编号: 1006-7108(2008)05-0360-04

摘要: 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是由成骨细胞分泌的一种高度磷酸化的糖蛋白,可以沉积到骨基质中促进破骨细胞黏附或者类骨质矿化,主要作为非胶原性的细胞外基质蛋白分布在矿物组织(如骨和牙骨质)中。成骨细胞黏附到 OPN 上取决于 OPN 具有保守的 RGD(Arg-Gly-Asp)序列,OPN 在黏附、重塑和在生物材料与骨相互作用的骨整合等方面都有非常重要的作用。笔者着重叙述骨桥蛋白的结构、功能与分布以及在生物矿化中的调节作用。

关键词: 骨桥蛋白; 生物矿化

The osteopontin and the biomineralization SUN Jie, LIU Ning, YIN Guoyou. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: Osteopontin is a high phosphorylated glycoprotein believed to be secreted by osteoblasts and deposited into the bone matrix to facilitate osteoclasts adhesion or to initiate osteoid mineralization, mainly as a non-collagen extracellular matrix protein distributed in mineral tissues(bone and cementum). Osteoblast adheres to OPN depending on its conserved RGD(Arg-Gly-Asp) sequence. OPN plays an important role in adhesion, remodeling and osseointegration interaction between biomaterials and bone. The paper mainly introduces the structure, function, distribution of the osteopontin and its regulating effect in biomineralization.

Key words: Osteopontin; Biomineralization

骨桥蛋白是一种分泌型的磷酸化糖蛋白,它可以在人体多种组织中表达,包括肾脏、甲状腺、胃肠道、胸腺、乳腺、免疫系统以及睾丸。骨桥蛋白是由前成骨细胞、成骨细胞和骨细胞合成的,分泌到前骨质中形成骨。早期前成骨细胞合成 OPN 是一个 55 kDa 的低磷酸化蛋白,可能与骨基质的形成有关^[1],成骨细胞可合成 44 kDa 的高磷酸化蛋白,能调节羟基磷灰石晶体生长,因此,OPN 被认为是成骨细胞成熟分化的标志^[2],在早期的生长阶段的表达可以看出骨桥蛋白在骨的形成过程中是重要的组成成分。

1 骨桥蛋白的结构、功能与分布

1.1 骨桥蛋白的结构特点及功能

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种带负电的非胶原性骨基质糖蛋白,OPN 的相对分子质量约 44×10^3 ,约含 300 个氨基酸残基,其中天冬氨酸、丝氨酸

和谷氨酸残基占很高比例,这就赋予了 OPN 具有高的酸性特征,这些特点以及其具有结合 Ca^{2+} 的序列,就可能解释了 OPN 能够结合大量的 Ca^{2+} ($\sim 50 \text{Ca}^{2+} \text{mol}^{-1}$)以及和羟基磷灰石具有高的吸附作用^[3]。RGD 序列具有高度保守性,是促进细胞黏附的蛋白质中的特有结构,重组体 OPN 因其缺少 RGD 序列,因此无黏附功能。integrin 家族是一种跨膜蛋白受体家族,由 α 、 β 两条多肽链以非共价键连接而成的不均一二聚体,具有一个胞外区、跨膜区和一个短小的胞内区,其中胞外区结合蛋白质或细胞外基质(ECM),如纤维连接蛋白、骨桥蛋白、胶原等^[5],而 OPN 通过特异的 RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)序列,同细胞表面的 $\alpha\text{v}\beta_3$ 、 $\alpha\text{v}\beta_1$ 、 $\alpha\text{v}\beta_5$ 相互作用,其中 $\alpha\text{v}\beta_3$ 是 OPN 的主要受体,从而介导细胞-细胞、细胞-基质的相互作用^[6]。在 RGD 序列附近区域(离 RGD 序列仅有 6 个氨基酸残基)存在凝血酶裂解位点,能被凝血酶裂解成大小不同的一个氨基末端片段和一个羧基末端片段。研究发现,OPN 由凝血酶裂解之后暴露出一个亮氨酸-脯氨酸-缬氨酸(LVP)区域能与 $\alpha_4\beta_1$ 相互作用,Yokosaki 等^[7]发现还有一个可与

作者单位: 150030 哈尔滨,东北农业大学乳品科学教育部重点实验室(孙婕、刘宁);台湾大成农牧有限公司(尹国友)

通讯作者: 刘宁,Email: sunjie124@163.com

$\alpha_v\beta_3$ 结合的隐藏的 SVVYGLR 作用域 (serine-valine-valine-tyrosine-glutamic acid-leucine-arginine), 在 OPN 序列中凝血酶裂解区域的保守性, 意味着这种裂解作用在某些生理过程中起重要的作用。实验证实^[8], 分子量为 70 kD 的 OPN 蛋白在凝血酶的作用下水解分裂成 45 和 25 kDa 两个片段, 45 kDa 的片段比 70 kDa 的 OPN 更能刺激细胞黏附和迁移。OPN 还含有大量的磷酸化位点, 多种蛋白激酶, 如酪氨酸蛋白激酶 II、蛋白激酶 C 等能催化 OPN 分子中丝氨酸和苏氨酸残基发生磷酸化, 在酪氨酸残基处发生的是自动的磷酸化作用。骨桥蛋白包含两个保守的 N-末端区域, 同肝磷脂结合同源性可能调节骨桥蛋白同细胞外基质的结合, 还可直接同纤维结合蛋白、

胶原蛋白、骨钙蛋白结合。近年来的研究表明, OPN 分子的氨基端区域与外分泌有关, 羧基端参与黏附功能的调节^[9]。OPN 有许多功能, OPN 的不同生物功能和活性可能与分子量不同和翻译后修饰有关, 其最主要的是通过细胞黏附序列 RGD 识别整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与细胞相结合, 通过一种基质不详的方式与细胞外基质结合以及参与细胞的黏附、迁移和增殖。在体外实验中, 磷酸化的 OPN 分子是羟磷灰石晶体形成的抑制剂, 可介导破骨细胞黏附到骨组织上, 发挥溶骨作用。作为一种新型的细胞因子, OPN 还参与肿瘤的生长转移、炎症与免疫、组织的损伤与修复等。骨桥蛋白的结构如图 1 所示^[10]:

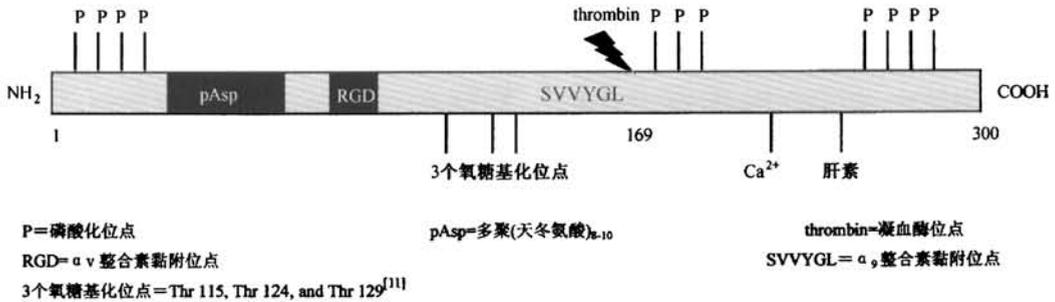


图 1 骨桥蛋白的结构

1.2 骨桥蛋白的分布

骨桥蛋白在健康的人体和动物体中分布是有限的。骨和肾脏中含量最多, 但是机体中的大多数的黏膜上皮细胞中也有骨桥蛋白的表达, 在体液中也有大量的骨桥蛋白, 包括尿液、唾液、乳和胆汁中^[3]。OPN 在骨中的功能反映了这种蛋白质能与基质生物磷灰石(骨中主要的晶体相形式)相互作用。由于在功能上骨桥蛋白具有细胞因子的特点, 因此, 其参与了机体多种病理过程, 近年的研究证实 OPN 在多种肝脏疾病中大量表达, 与非酒精性脂肪肝、各种肝炎、肝纤维化及肝癌的发生发展及预后密切相关^[10,12,13]。同在健康组织中的有限分布相比较, 骨桥蛋白在疾病组织和受伤组织中的研究表明, 在炎症组织和组织重塑中有增量调节的作用, 异位钙化是软组织损伤后经常出现的一种病理反应, 主要表现为局部羟磷灰石晶体的形成, 而在某些重要的器官或组织中出现的异位钙化往往是致命的, 骨桥蛋白分子中大量存在的天冬氨酸和磷酸丝氨酸能够帮助其结合于矿化组织中的钙磷晶体表面, 抑制该晶体的生长钙化过程中, 能够抑制其钙化的进程^[14,15]。病理状态(免疫性疾病、炎症和肿瘤)OPN 表达增强,

如肺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌等, 在动脉狭窄、动脉粥样硬化、肾小管间歇性纤维化、心息梗死、肉芽肿病以及结核病等疾病中骨桥蛋白也都有表达。

2 骨桥蛋白与生物矿化

OPN 由成骨细胞和破骨细胞合成, 存在于类骨质中, 同时在基质界膜和骨黏合线中也有其表达。OPN 促进了骨基质中这两种细胞的黏附, 通过与 $\alpha_v\beta_3$ 整合素相互作用刺激破骨细胞迁移, 提高了足小体的形成和骨的吸收。OPN 在钙化组织中(体内和体外的发现)至少有 3 种不同的功能已经被提了出来: ①调节骨细胞的黏附; ②调节破骨细胞的功能; ③调节基质矿化功能^[10]。

2.1 骨桥蛋白与骨吸收

OPN 是非常重要的由单核细胞衍生的骨吸收细胞、破骨细胞的调节器, 体外研究表明, OPN 指导最初的破骨细胞识别并黏附到骨上, 主要是通过 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体^[16,17], 然后, OPN 再一次通过 $\alpha_v\beta_3$ 调节破骨细胞的功能。骨是可以重塑的, OPN 通过 RGD

序列与细胞表面的整合素(主要为 $\alpha v \beta_3$)相互作用,从而介导破骨细胞黏附到骨上,然后形成密封区域,电镜下观察为亮区,这种黏附是骨吸收的必要条件,破骨细胞分泌质子,酸化局部陷窝吸收的微环境,溶解矿物质,破骨细胞也可以分泌蛋白酶到这个酸性环境中,蛋白酶和其他的水解酶然后就降解胶原蛋白和其他的骨基质蛋白质^[18]。McKee等^[19]认为,OPN首先分布到矿化的胶原基质上,尤其是浓缩的牙骨质(更新的)线也就是限制单板层上,在骨形成和重塑过程中,作为骨细胞黏附相互作用的结构。骨吸收不依赖于黏附的影响,形成的吸收陷窝依赖细胞支架组织再生和极化迁移的破骨细胞,然后在吸收位点形成特殊的膜系统。体内OPN与 $\alpha v \beta_3$ 在破骨细胞里的相互作用,通过磷脂酰肌醇(PtdIns)-3-羟基激酶(PI-3-激酶)产生肌动蛋白凝溶胶蛋白,可以刺激细胞支架的重塑、膜细胞边缘的波动和骨吸收,通过pp60src和rhoA依赖途径,肌动蛋白凝溶胶蛋白与PI3激酶联合导致与肌动蛋白凝溶胶蛋白结合的PtdIns3,4-P2、PtdIns4,5-P2和PtdIns43,4,5-P3的水平增加,刺激了骨吸收^[20-22]。体内的研究进一步证明了OPN与 $\alpha v \beta_3$ 在骨中以多种方式相互作用,用 $\alpha v \beta_3$ 干扰或者由抗体、肽或者模拟肽可以抑制体内骨吸收, $\alpha v \beta_3$ 对抗物在临床实验中可作为骨质疏松的治疗物^[23],而且, $\alpha v \beta_3$ 无效鼠在骨发育时胚胎正常,破骨细胞吸收缺乏使出生后的鼠的骨密度提高。

2.2 骨桥蛋白与生物矿化

免疫电镜显示,在生长的骨组织的矿化边缘,钙化的软骨、牙齿等处,都有OPN存在,它出现在生理性与病理性的钙化组织中,说明OPN与矿化有着密切的关系。细胞所分泌的OPN有磷酸化和未磷酸化的两种形式,其磷酸化与其功能密切相关^[24,25],磷酸化后的OPN与细胞表面整合素受体结合,而未磷酸化OPN则能与CD44受体结合,从而引起不同的效应,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形成,并呈量效关系,非磷酸化的OPN却无此活性,而体内实验表明OPN在骨基质的矿化过程中,主要影响骨基质的矿化速率,而不影响羟磷灰石的结晶生长成核^[5,26]。与OPN调节骨基质中磷酸钙晶体沉积相似,OPN可以紧密的结合包含磷酸钙的矿物质和羟磷灰石。羟磷灰石是磷酸钙相,与骨中或牙齿中取代的生物磷灰石非常相关,在溶液和凝胶研究,以及在基质矿物质细胞培养模型

中,OPN是羟磷灰石晶体形成和生长的潜在的抑制因子。除了翻译后的磷酸化氨基酸残基之外,包含多个酸化的Asp区域的OPN的结构组成是矿化和吸附钙所必须的。许多直接的证据表明,OPN是异位钙化矿化的抑制因子,是骨组织中含量最多的非胶原性蛋白质,而且,OPN在病理性软组织中也有积聚的作用,即异位钙化,例如,动脉粥样硬化异位钙化、肾结石、牙菌斑、以及与肿瘤有关的钙化。研究表明,OPN的积聚归因于一些固有细胞,如平滑肌细胞、上皮细胞和浸润性的巨噬细胞的作用。

3 结论

骨桥蛋白作为一种基质调节蛋白,与骨的矿化和重塑有着密切的关系,但对其是如何调节骨的矿化和重塑的机制研究方面还有待于我们的进一步的研究。

【参考文献】

- [1] Sodek J, Chen J, Nagata T, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 21(760):223-241.
- [2] 刘宏,王勤涛,吴织芬,等. rhBMP-2对犬牙牙周细胞骨桥蛋白表达的影响. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35(5):330-332.
- [3] Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L. Molecular and cellular biology of osteopontin, potential role in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 1995, 3:88-95.
- [4] Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW, et al. Osteopontin roles in implantation and placentation. *Biol Reprod*, 2003, 69(5):458-471.
- [5] 杨淑莉,韩梅,温进坤.骨桥蛋白与心血管疾病. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 4(4):371-373.
- [6] 范哲,李鸿雁,龙毅,等.骨桥蛋白的研究进展. *中国实验诊断学*, 2005, 9(2):307-309.
- [7] Yokosaki Y, Matsura N, Sasaki T, et al. The integrin $\alpha_9 \beta_1$ binds to a novel recognition sequence(SVYGLR) in the thrombin-cleaved amino terminal fragment of osteopontin. *Biol Chem*, 1999, 274(11):36328-36334.
- [8] Johnson GA, Burghardt RC, Joyce MM, et al. Osteopontin is synthesized by uterine lands and a 45-KD cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biol Reprod*, 2003, 69(1):92-98.
- [9] Takahashi K, Takahashi F, Tanabe KK, et al. The carboxyl-terminal fragment of osteopontin suppresses arginine-glycine-aspartic acid-dependent cell adhesion. *J Biochem Mol Biol Int*, 1998, 46(6):1081.
- [10] Cecilia MG, Susan Steitz. Mini review-Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*, 2000, 19(7):615-622.
- [11] Srensen ES, Hqjrur P, Petersen TE. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation

- and three o-glycosylation sites. *Pro Sci*, 1995, 4(5): 2040-2049.
- [12] 郭春霞, 贺永文. 骨桥蛋白与肝脏疾病. 国外医学流行病学传染病学分册, 2005, 32(4): 252-254.
- [13] 张永钢, 韩梅, 温进坤. 骨桥蛋白的病理功能. 中国老年学杂志, 2005, 25(2): 230-232.
- [14] Susan AS, Mei YS, Marc DM, et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol*, 2002, 161(11): 2035-2046.
- [15] Rachit O, Elyse T, Rupak R, et al. Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76(4): 307-315.
- [16] Reinholt FP, Hulthén K, Oldberg C, et al. Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(6): 4473-4475.
- [17] Ross FP, Chappel J, Alvarez JL, et al. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha\beta_3$ potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, 1993, 268(5): 9901-9907.
- [18] Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, et al. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(7): 8156-8160.
- [19] Mckee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: Ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. *Microsc Res Tech*, 1996, 33(2): 141-164.
- [20] Chellaiah M, Hruska K. Osteopontin stimulates gelsolin-associated phosphoinositide levels and phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase. *Mol Biol Cell*, 1996, 7(5): 743-753.
- [21] Chellaiah M, Fitzgerald C, Alvarez U, et al. c-src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 1998, 273(5): 11908-11916.
- [22] Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, et al. Rho-a is critical for osteoclast podosome organization, motility and bone resorption. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 11993-12002.
- [23] Engleman VW, Nickols GA, Ross FP, et al. A peptidomimetic antagonist of the $\alpha\beta_3$ integrin inhibits bone resorption *in vitro* and prevents osteoporosis *in vivo*. *J Clin Invest*, 1997, 99(5): 2284-2293.
- [24] Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 20197-20203.
- [25] Christensen B, Nielsen MS, Haselmann KF, et al. Posttranslationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J*, 2005, 385(1): 1-28.
- [26] Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J*, 1994, 300(6): 723-728.