

# 含 RGD三肽的骨基质非胶原蛋白 在骨质疏松症中的研究进展

张 岩<sup>1</sup> 黄文秀<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>香港理工大学深圳研究院 深圳市中药药理学及分子药理学研究重点实验室, 深圳 518057

<sup>2</sup>香港理工大学应用生物与化学技术系, 香港 红磡)

**摘要** 骨基质非胶原蛋白 是对于骨的生长、再生、发育等有重要作用的蛋白质, 其中包含一类在结构上都含有 RGD(精氨酸 甘氨酸 天冬氨酸)三肽的蛋白。近来研究表明, RGD蛋白在骨基质的形成、矿化, 以及介导细胞-细胞、细胞-基质的相互作用中发挥关键作用。本文对骨基质中主要的 RGD蛋白的骨生物活性, 以及与骨质疏松症关系方面的最新研究进展作一简述。

**关键词** 骨桥蛋白; 骨唾液酸蛋白; 纤维粘连蛋白; 骨质疏松

**中图分类号** R336

骨是由各种类型的骨细胞以及胞外基质构筑而成。如图 1所示, 在骨基质中除了钙磷结晶盐等无机质外, 其余为有机质成分。骨有机质中大量存在的为骨胶原蛋白(含量大约为 90%), 剩下的一小部分(大约 10%)为没有固定形态的非胶原蛋白, 虽然它们含量少, 但具有重要的生物活性。在骨非胶原蛋白中, 有一类蛋白在结构上具有共性, 即都含有 RGD(精氨酸 甘氨酸 天冬氨酸)的氨基酸序列, 在功能上都具有支持细胞粘附和介导基质矿化的作用。这类蛋白包括骨桥蛋白(osteopontin OPN)、骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein BSP)、纤维粘连蛋白(fibronectin FN)等, OPN和 BSP同为 SIBLING家族成员, 而 FN则不是。到目前为止, 这些蛋白在体内的生物功能仍不十分清楚, 本文综述了上述三种蛋白的骨生物活性及其与骨质疏松症关系方面的研究进展。

## 一、骨桥蛋白

骨桥蛋白在骨组织主要表达于骨内膜成骨细胞, 近来, 在破骨细胞中也发现了完整的 OPN mRNA。OPN不仅广泛分布于钙化组织, 而且在 T淋巴

细胞、神经组织、肾脏、循环系统也都有表达, 表明 OPN的体内作用不仅仅是结构骨架分子, 而且发挥着类似细胞因子的作用, 介导着细胞间信号转导<sup>[1]</sup>。OPN在结构上除了具有 RGD三肽序列外, 结构上另外的一个特异性在于含有 10~12个连续的天冬氨酸残基, 使 OPN局部带有高负电性, 这在 OPN与骨及其它组织钙化基质的结合中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。另外, OPN的分子构型能够依赖于钙离子浓度而发生转换, 从而暴露不同的结合位点, 与细胞表面跨膜异二聚体糖蛋白  $\alpha$ 、 $\beta$  链构成的各种整合素受体或是胞外基质蛋白结合, 这从结构变化上解释了 OPN功能多样化的原因。

日常生活中减少对骨骼的机械应力, 能够加速骨丢失, 增加骨折风险, 这种废用性骨质疏松症常见于长期卧床病人以及太空宇航员<sup>[3]</sup>。近年对 OPN基因敲除小鼠的研究使人们对此类骨质疏松症的发生机制有了更深入的认识。采用尾吊模型造成野生型(Wild type)小鼠骨量丢失、尿液骨吸收生化指标脱氧吡啶交联(DPD)水平升高, 而 OPN(-/-)小鼠骨量及 DPD没有发生变化, 组织形态计量学对 NOc/

6 Gaborit M, Steenman M, Lamirault G. Human atrial ion channel and transporter subunit gene expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005; 112: 471~481.

7 Ferron L, Capuano V, Derubak E, et al. Functional and molecular characterization of a T-type  $Ca^{2+}$  channel during fetal and postnatal rat heart development. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 533~546.

8 Huang B, Qin D, Deng L, et al. Reexpression of T-type

$Ca^{2+}$  channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 442~449.

9 Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003; 83: 117~161.

10 Hebach JF, Khler A, Wettwer E, et al. T-type and tetraotoxin-sensitive  $Ca^{2+}$  currents coexist in guinea pig ventricular myocytes and are both blocked by mibefradil. *Circ Res* 2000; 86: 628~635.

B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、S/BS、BFR、MAR等指标的考察结果表明, OPN是机械刺激的感受基因, 在应力变化致骨质疏松的过程中, OPN是其中介导骨形成减少、骨吸收增加的重要调节蛋白 (Ishijima等, 2001)。进一步通过 DNA芯片对骨髓细胞 9586个基因表达分析, OPN(-/-)抑制 Nfkb1、P53的基因表达, 然而上调 Bax的基因表达<sup>[4]</sup>, 这个结果也证明了以上观点。万玉民等 (2005) 利用水平轴回转模拟失重, 发现小鼠颅骨成骨细胞表面 OPN表达明显减少, 而且培养液中细胞分泌的碱性磷酸酶 (ALP)活性以及骨钙素 (OCN)都显著下降, 通过体外实验证实包括 OPN在内的骨基质蛋白表达水平的下降是应力应变负荷降低导致骨量丢失的根本原因。

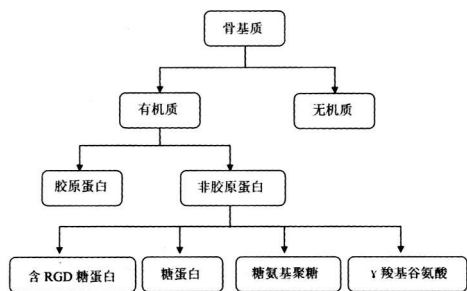


图 1 骨基质主要构成

绝经后中老年妇女由于体内雌激素水平迅速下降而导致骨质疏松症的发生, 她们是原发性骨质疏松症的主要患病人群。通过对 OPN(-/-)小鼠切除卵巢 (OVX)模拟绝经后妇女骨质疏松 (POP)的研究中, 对 OPN在 POP发展进程中的作用有了最新认识。首先, OPN基因敲除的 OVX小鼠卵巢发生明显萎缩, 表明 OPN(-/-)小鼠体内的雌激素系统与 Wild type小鼠一致; Micro-CT技术分析发现, OPN基因敲除的 OVX小鼠长骨松质骨骨量没有下降; 经组织形态计量学定量, 代表骨形成参数的 BFR骨吸收参数 NOc都没有增加, 说明 OPN基因缺陷抑制 OVX引起的小鼠高骨转换。此研究表明 OPN介导了雌激素缺乏引起 POP的发生, 这也可以解释人类 OPN基因多型性的存在, 是绝经后妇女患 POP风险性不一致的其中一个原因。另外, Davey(2000)、Ramamurthy(2001)在研究 OVX大鼠长骨的基因表达时发现, 雌激素缺乏还可进一步提高骨 OPN的表达, OPN与破骨细胞表面的  $\alpha\beta3$ 整合素结合, 使破骨细胞的骨吸收功能发挥至最强。

大量动物实验和临床研究证实, 甲状旁腺激素 (PTH)有促进成骨作用, 能防止骨质流失, PTH(1-34)已作为治疗骨质疏松症的药物广泛应用于临

床。研究显示, OPN在 PTH的促成骨作用中起重要作用。按  $80\mu\text{g/kg}$ 剂量给小鼠皮下注射 PTH(1-34)持续 4周, 发现 Wild type小鼠只有松质骨量增加, 而 OPN基因敲除小鼠不仅松质骨量明显增加, 而且皮质骨量、全骨骨密度也都显著增加, 具体表现在皮质骨外膜的矿化沉积速率 (MAR)、BFR显著提高<sup>[5]</sup>。对取自小鼠胫骨的骨髓细胞进行体外培养, 发现 OPN(-/-)组小鼠经 PTH处理后, 骨髓细胞的矿化结节形成增多<sup>[5]</sup>。体外培养骨细胞还揭示 OPN(-/-)通过抑制骨膜局部破骨细胞的数量, 而防止 PTH诱导的骨吸收 (Ihara等, 2001)。因此认为 PTH对骨组织的双重作用与 OPN的调节密切相关。

### 二、骨唾液酸蛋白

与其它非胶原蛋白相比, 骨唾液酸蛋白的组织分布相对局限, 主要存在于骨组织中的成骨细胞、破骨细胞中, 在软骨细胞及牙骨质线中也有大量贮存<sup>[6]</sup>。原发性乳腺癌病人, 血清 BSP升高可提示早期骨转移。Die等 (1998)通过对 388例乳腺癌患者研究表明, 血清 BSP浓度高于  $24\text{ng/m}$ 的病人比血清 BSP浓度低于  $24\text{ng/m}$ 的病人肿瘤骨转移的发病率高 94倍。检测 BSP的蛋白表达还可预测非小细胞肺癌患者发生骨转移的风险<sup>[7]</sup>, 并可反映骨关节病患者关节局部软骨下骨基质转换的改变。体外细胞培养提示, 磷酸化的 BSP能启动和调节矿物质在基质内的沉积并促进细胞附着及前成骨细胞的增生, 但其确切机制尚未完全阐明。Wang等 (1998)首次报道 BSP明胶复合物在大鼠颅骨骨缺损部位的成骨作用。对 BSP与不同载体结合后在骨缺损部位的成骨活性的研究, 表明 BSP在大鼠体内的成骨活性具有组织依赖性, 提示局部微环境和反应细胞的特性可能对 BSP的成骨活性有调节作用。通过四点弯曲设备对 C57Bl/6J小鼠的胫骨每天加以频率  $2\text{Hz}$   $6\sim 9\text{N}$ 的载荷, 循环 36次, 连续作用 12天, 其总骨密度、皮质骨密度都显著增高, 对骨的基因表达分析结果显示, BSP mRNA表达在载荷作用 4天、8天、12天比对照组提高 2~8倍, 说明骨密度 (BMD)的升高与 BSP的作用直接相关<sup>[8]</sup>。然而, BSP与 BMD的关系还存在质疑。Fassbender等 (2000)对 170例骨质疏松患者的临床研究显示, 血清 BSP水平与血清骨转换指标 B-ALP ( $r=0.532$ )、OCN ( $r=0.588$ )都存在很好的正相关, 而与血清雌激素水平及股骨颈、腰椎的 BMD成负相关。同 B-ALP、OCN类似, 血清 BSP水平也被学者推荐作为评定骨质疏松症的生化指标 (Heis等, 2004)。

### 三、纤维粘连蛋白

纤维粘连蛋白广泛存在于血浆及动物组织中, 在骨组织, 主要存在于皮质骨、松质骨、胶原纤维、骨膜及骨内膜, 在骨髓巨核细胞也有表达。由于其结构的复杂性及重要的生化活性使它成为矿化基质中最有意义的蛋白之一。它由两个分子量为 250 kD 的亚基组成。每个亚基都含有 9 个不同功能区, 包括两个纤维结合位点、两个肝素结合位点, 以及明胶、胶原、DNA 及细胞表面亲和位点各一个。亚基由 3 个不同的重复序列构成。I 型重复序列在 N 端和 C 端亚基的 40~50 氨基酸长度之间产生一个二硫环, II 型重复序列构成中心蛋白, 有一个 90 个氨基酸的环。在亚基之间有 EIIA、EIII 和 V 三个区, 它们部分或全部被切开或插入, 从而形成不同类型的纤维粘连蛋白。

体外实验表明, 成骨细胞经电磁场刺激 (磁场强度 2 mT 频率 75 Hz) (Fassina 等, 2006) 或是 Ti6Al7Nb (Osathanon 等, 2006)、谷氨酰氨酶 (Al-Jalal 等, 2006) 处理后, 都能够通过增加 FN 的分泌、表达, 延长成骨细胞的生存周期, 促进成骨细胞的成熟、分化, 加快矿化基质形成、集结、堆积<sup>[9]</sup>。已经证实, 低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (LRP5) 在成骨细胞表达丰富, 而 LRP5 基因点突变人群的骨密度成病理性升高, 这与体内 Wnt 信号转导增强, 造成下游蛋白 FN 表达升高有关 (Boyd 等, 2002)。Ponik 等 (2004) 通过两种体外生物模型揭示了 FN 在机械负荷增加骨量中的生物学意义。实验中, 体外培养 MC3T3-E1 成骨细胞系, 模型一: 系统中加入小牛血清蛋白 (BSA); 模型二: 系统中加入可溶性 RGDs 肽。系统中所加两种物质都能够抑制 FN 介导的细胞粘附。当给予系统流变切应力后, 模型二中前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 分泌和环氧合酶-2 表达明显下降; 而模型一中, 虽然 BSA 局部抑制细胞粘附, 但系统中 FN 合成增加, 净效应是细胞粘附增强, 环氧合酶-2 表达增多。实验表明, 机械信号转化为生化信号的转导途径过程中, 骨细胞通过感应流体切应力, 并在 FN 作用下, 诱导骨形成。另一方面, 在原代培养大鼠成骨细胞系统中, 免疫荧光分析显示 PGE<sub>2</sub> 诱导 FN 聚集, 蛋白印迹杂交显示 PGE<sub>2</sub> 上调 FN 表达, PGE<sub>2</sub> 还能提高转染细胞 FN 启动子区的活性<sup>[10]</sup>。将 PGE<sub>2</sub> 局部灌注于胫骨的干垢端, 发现 FN 表达明显增多, 且松质骨体积提高<sup>[10]</sup>。体内、外实验证明, FN 参与了前列腺素调控骨生成的生理生化过程。

综上所述, 含 RGD 结构的骨基质非胶原蛋白通

过其特有的 RGD 三肽序列, 介导了细胞-细胞、细胞-基质蛋白、细胞-矿化组织的粘附。近年来对此类蛋白与骨质疏松症关系的研究使人们认识到它们对骨代谢的重要调控作用, 然而, 对于其细胞内下游信号转导以及是否还具有其它功能, 尚需进一步研究。了解此类蛋白在骨质疏松症中的作用, 对于明晰骨质疏松症发生的分子机制, 开发新型抗骨质疏松症生化药物, 具有重要意义。

### 参 考 文 献

1. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1161~1170.
2. Wang L, Qiu SR, Zachowicz W, et al. Modulation of calcium oxalate crystallization by linear aspartic acid-rich peptides. *Langmuir* 2006; 22: 7279~7285.
3. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Interventions to prevent bone loss in astronauts during space flight. *Keio J Med* 2005; 54: 55~59.
4. Ishijima M, Ezura Y, Tsuji K, et al. Osteopontin is associated with nuclear factor kappaB gene expression during tail suspension-induced bone loss. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3075~3083.
5. Kishikawa K, Ishijima M, Rittling SR, et al. Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* 2003; 144: 2132~2140.
6. Golovkova V, Li XR, Saunders TL, et al. A rat  $\alpha$ 1 dentin sialoprotein-phosphophoryn (DSP-PP) promoter directs spatial and temporal LacZ activity in mouse tissues. *Dev Biol* 2006; 289: 507~516.
7. Papotti M, Kalebic T, Volante M, et al. Bone sialoprotein is predictive of bone metastases in resectable non-small-cell lung cancer: a retrospective case-control study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4818~4824.
8. Kesavan C, Mchan S, Oberholzer S, et al. Mechanical loading-induced gene expression and BMD changes are different in two inbred mouse strains. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1951~1957.
9. Kennedy SB, Washburn NR, Simon CG Jr, et al. Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation. *Biomaterials* 2006; 27: 3817~3824.
10. Tang CH, Yang RS, Fu WM. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates fibronectin expression through EP1 receptor, Phospholipase C protein kinase Calpha and c-Src pathway in primary cultured rat osteoblasts. *J Biol Chem* 2005; 280: 22907~22916.