

骨桥蛋白与心血管疾病

杨淑莉, 韩 梅, 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 河北省石家庄市 050017)

[主题词] 骨桥蛋白; 动脉粥样硬化; 再狭窄

[摘 要] 骨桥蛋白是细胞外基质中一种重要的功能蛋白, 由多种组织细胞合成与分泌。在心血管系统中, 骨桥蛋白通过与血管内皮和平滑肌细胞表面的受体 integrin $\alpha_v\beta_3$ 相互作用而介导细胞粘附、增殖和迁移, 进而参与血管内皮损伤所导致的心血管病的发生与发展过程。本文从分子生物学角度对骨桥蛋白的结构、功能、基因表达调控及与心血管疾病的关系进行综述。

[中图分类号] Q513. 2

[文献标识码] A

骨桥蛋白(osteopontin)是细胞外基质中一种重要的功能性蛋白, 因其介导骨组织细胞与骨基质的连接、参与骨基质矿化和重吸收过程而得名^[1]。在许多非矿化组织中, 如肾脏、大脑、内耳、胆囊、胰腺及上皮细胞中, 骨桥蛋白也有不同程度的表达。近年骨桥蛋白作为一种机体反应蛋白, 在抗炎和损伤修复过程中的重要作用逐渐引起人们的关注。

1 骨桥蛋白的分子结构

骨桥蛋白是一种相对分子质量约为 44 kDa 的分泌型糖基化磷蛋白, 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有很高的比例。骨桥蛋白分子中约含有 30 个寡糖基, 其中 10 个是唾液酸。氨基酸序列分析表明, 骨桥蛋白分子含有特异的 RGD(Arg- Gly- Asp) 基元——细胞粘附功能域, 该基元是骨桥蛋白分子发挥粘附功能的结构基础, 具有高度保守性, 如果变异或缺失, 将丧失促粘附功能。结构分析证实, 骨桥蛋白多肽链的二级结构中包括 8 个 α 螺旋和 6 个 β 折叠结构, 高度保守的 RGD 基元两端各有一个 β 折叠结构。近来揭示, 骨桥蛋白分子氨基端区域与外分泌有关, 羧基端区域参与粘附功能的调节^[2]。骨桥蛋白含有 13 个磷酸化位点(12 个丝氨酸, 1 个苏氨酸)、1 个 N- 糖基化位

点和 5~ 6 个 O- 糖基化位点。多种蛋白激酶, 如酪氨酸蛋白激酶 II、蛋白激酶 C 等能够催化骨桥蛋白分子中的不同丝氨酸和苏氨酸残基发生磷酸化, 这可能是调节骨桥蛋白分子功能的方式之一。例如磷酸化的骨桥蛋白是羟磷灰石晶体形成的抑制剂, 其脱磷酸化形式则失去抑制羟磷灰石晶体形成的功能, 对破骨细胞的粘附作用也较磷酸化骨桥蛋白显著降低。骨桥蛋白能够被凝血酶水解成两个大小不同的肽段, 该酶的作用位点在 RGD 基元羧基端第 6 个氨基酸残基所构成的肽键。研究证明, 与完整的骨桥蛋白分子相比, 含 RGD 基元的骨桥蛋白氨基端片段促粘附功能反而加强^[3]。由此推测, 去除 RGD 基元的骨桥蛋白羧基端片段可能具有抑制其粘附功能的作用。

2 骨桥蛋白的基因结构及其表达调控

迄今为止, 已克隆出大鼠、小鼠、猪、牛、鸡及人等多种动物骨桥蛋白 cDNA。序列分析显示, 不同种属的骨桥蛋白 cDNA 具有中度同源性, 但在氨基末端区域、羧基末端区域和含 RGD 基元的 50 个氨基酸序列区域呈高度保守。骨桥蛋白基因是一个独立编码基因, 含 7 个外显子和 6 个内含子。人的骨桥蛋白基因定位于第 4 号染色体, 小鼠和大鼠的骨桥蛋白基因定位于第 5 号染色体, 猪的骨桥蛋白基因定位于第 8 号染色体。人的骨桥蛋白结构与其它种属有一定差别, 与牛相比, 前者在第 3 个内含子前插入一段约 1.8 kb 的碱基序

[作者简介] 杨淑莉, 女, 26 岁, 生物化学与分子生物学硕士研究生。韩梅, 女, 39 岁, 博士研究生导师。

列;与小鼠相比,人的骨桥蛋白基因在第4外显子前插入一段约1 750 bp的碱基序列^[4]。

骨桥蛋白基因的表达具有组织细胞特异性,并且受多种激素、生长因子、肿瘤促进剂及原癌基因表达产物的调控。已经证明,骨桥蛋白基因5'上游-94~-80、-124~-115及-439~-409序列为启动子或增强子顺式作用元件,它们与相应的反式作用因子结合后,增强骨桥蛋白基因的表达,但在三者中,后者的作用较前二者弱。-107~-105区域为负调控元件,该元件与相应的反式作用因子结合后,降低骨桥蛋白的表达活性。在骨桥蛋白基因启动子区域中,包含一个TATA盒(-28~-22)、一个反向的CCAAT盒(-55~-50)、一个GC盒(-100~-93)及多种转录因子,如AP1-5、PEA-3、PEA-1及Ets的结合位点。肿瘤促进剂佛波酯可通过激活多种转录调控因子而增强骨桥蛋白基因表达。此外,在转录水平上骨桥蛋白的表达还受1,25-(OH)₂Vit D₃的调控。已证实牛(-698~-684)、猪(-1892~-1878)和小鼠(-758~-741)的骨桥蛋白基因上游转录调控区均含有可被1,25-(OH)₂Vit D₃识别的顺式作用元件。目前,人的骨桥蛋白基因的1,25-(OH)₂Vit D₃反应元件尚未被确定。诸多生长因子和细胞因子也可调控骨桥蛋白基因的转录。在骨组织中,IL-1 α 、TNF α 、1,25-(OH)₂Vit D₃等均能刺激破骨细胞大量合成并分泌骨桥蛋白。在心血管系统中,一系列参与动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的活性因子,如PDGF、bFGF、EGF、TGF β 、AngII等能够刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞表达骨桥蛋白分子。

3 骨桥蛋白的生理功能

骨桥蛋白作为一种基质功能性非胶原蛋白,主要通过两种机制发挥细胞信号分子的作用。一是以分子内RGD基元与整合蛋白(integrin)家族分子结合;二是与细胞表面粘附性糖蛋白CD44以非RGD依赖方式结合。两种作用方式均通过激活细胞内特异性信号传导系统而介导细胞粘附、迁移和增殖。

integrin家族是一类由 α 、 β 两条多肽链以非共价键连接而成的不均一二聚体,包括integrin $\alpha_1\beta_1$ 、integrin $\alpha_2\beta_1$ 、integrin $\alpha_3\beta_1$ 、integrin $\alpha_v\beta_3$ 、integrin $\alpha_v\beta_5$ 等,主要功能是介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间的粘附。其中,integrin $\alpha_v\beta_3$ 是骨桥蛋白的主要受体。正常情况下血管内皮细胞及平滑肌细胞表面均检测不到integrin $\alpha_v\beta_3$,在动脉粥样硬化及血管再狭窄的血管内皮及平滑肌细胞表面integrin $\alpha_v\beta_3$ 呈高表达状态,且表达时空与骨桥蛋白的表达时空相一致^[5]。生理条件下,骨桥蛋白与integrin $\alpha_v\beta_3$ 的结合与微环境中Ca²⁺浓度有关,RGD基元周围的氨基酸残基带有大量负电荷,其 β 折叠片层结构也对Ca²⁺浓度极为敏感,提示Ca²⁺是影响骨桥蛋白分子与integrin $\alpha_v\beta_3$ 受体结合的关键因素。

CD44是细胞表面的一种粘附性糖蛋白,包含多种变体。CD44与骨桥蛋白的结合不受含RGD基元的多肽竞争性抑制,与Ca²⁺浓度无关,但能够被透明质酸盐竞争性阻断,说明CD44与骨桥蛋白分子的结合是非RGD基元依赖性的^[6]。

骨桥蛋白具有多种生理功能,成骨细胞、破骨细胞、骨细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞及多种肿瘤细胞均能合成并分泌骨桥蛋白分子。在离体实验中,磷酸化的骨桥蛋白分子是羟磷灰石晶体形成的抑制剂,可介导破骨细胞粘附到骨组织上,发挥溶骨作用。骨桥蛋白在心血管系统中的作用也逐渐被证实。利用差异显示技术证明,骨桥蛋白是血管平滑肌细胞由收缩型向合成型转换的标志基因^[7]。血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因的表达能够促使其发生增殖与迁移。另外,骨桥蛋白作为多种细胞的粘附性基质,能够促进包括血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞在内的多种细胞与细胞外基质发生粘附,为新生内膜的形成奠定基础^[8]。

4 骨桥蛋白与心血管疾病

近年来,人们对心血管系统疾病的发生机理有了新的认识,认为动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄是动脉壁对损伤的一种保护性反应。血管损伤部位新生内膜的形成是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄病理过程中的重要事件之一,其发生发展过程与骨桥蛋白的功能密切相关。有资料显示,在一系列参与动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的细胞因子中,PDGF、bFGF、EGF、TGF β 、IL-1、AngII均能够刺激血管内皮细胞和平滑肌细胞过度表达骨桥蛋白^[9-11]。原位杂交免疫组织化学和Western blot检测结果显示,不仅粥样硬化和再狭窄病变部位的血管内皮细胞和平滑肌细胞内骨桥蛋白mRNA呈高表达状态^[12],而且细胞外基质中的骨桥蛋白含量也明显升高。在动物实验模型中,血管内皮损伤后,内皮细胞与平滑肌细胞内骨桥蛋白mRNA表达迅速上调,8 h后达到高峰,持续14天后开始下降,6周左右恢复至正常水平,这与新生内膜形成的时程相一致。利用抗骨桥蛋白抗体或抗integrin $\alpha_v\beta_3$ 抗体抑制骨桥蛋白的作用则可抑制血管平滑肌细胞的表型转化、迁移和增殖,进而抑制新生内膜的形成^[5,13]。

动脉钙化是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的常见并发症之一。免疫组织化学研究发现,在动脉粥样硬化及再狭窄的钙化区域内,血管内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞均高度表达骨桥蛋白分子,尤以巨噬细胞为甚,这是机体的一种保护性反应。研究发现,骨桥蛋白能够抑制动脉钙化的发生,其作用机理是该蛋白可直接与羟磷灰石晶体表面结合,构成一层蛋白衣,阻止羟磷灰石晶体的进一步成长,从而抑制动脉钙化形成^[14,15]。

综上所述,骨桥蛋白作为一种机体反应性功能蛋白,在动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄及动脉钙化发生过程中起重要作用,应用骨桥蛋白及其抑制剂可能有助于心血管疾病的防治,但目前对骨桥蛋白及其抑制剂的认识及二者在临床应用方面的许多问题尚待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-

- Asp cell- binding sequence [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 8 819- 823
- [2] 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**: 1 081- 092
- [3] Senger DR, Perruzzi CA. Cell migration promoted by a potent GRGDS- containing thrombin- cleavage fragment of osteopontin [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1996, **1314**: 13- 24
- [4] Hiiiva N. Setoguchi M. Matsuura K. et al. Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter [J]. *Biochem J*, 1994, **303**: 255- 262
- [5] Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1993, **73**: 193- 204
- [6] Weber GF, Ashkar S, Cantor H. Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation [J]. *Proc Assoc Am Physicians*, 1997, **109**: 1- 9
- [7] Yamamoto M, Aoyagi M, Azuma H. Changes in osteopontin mRNA expression during phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells [J]. *Histochem Cell Biol*, 1997, **107**: 279- 287
- [8] Veinot JP, Srivatsa S, Carlson P. Beta3 integrin- a promiscuous integrin involved in vascular pathology [J]. *Can J Cardiol*, 1999, **15** (7): 762- 770
- [9] 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 白细胞介素- 1 β 和肿瘤坏死因子- α 对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶- 2 骨桥蛋白基因表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, **7** (4): 292- 295
- [10] Wang X, Loudon C, Ohlstein EH, et al. Osteopontin expression in platelet- derived growth factor- stimulated vascular smooth muscle cells and carotid artery after balloon angioplasty [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (11): 1 365- 372
- [11] 石纓, 温进坤. 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, **7**: 1- 3
- [12] Panda D, Kundu GC, Lee BI, et al. Potential roles of osteopontin and alpha v beta 3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(17): 9 308- 313
- [13] Srivatsa SS, Fitzpatrick LA, Tsao PW, et al. Selective alpha v beta 3 integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury: evidence for the functional importance of integrin alpha v beta 3 and osteopontin expression during neointima formation [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, **36** (3): 408- 428
- [14] Demer LL, Tintut Y. Osteopontin between a rock and a hard plaque [J]. *Circ Res*, 1999, **84**: 250- 252
- [15] Wada T, McKee MD, Steitz S, et al. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibition by osteopontin [J]. *Circ Res*, 1999, **84**: 166- 178
- (此文 2000- 01- 10 收到, 2000- 07- 28 修回)
- (此文编辑 文玉珊)