

骨唾液酸蛋白(BSP)的结构与功能

董 燕 杨连生

王 捷

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641) (广州军区总医院肿瘤分子生物学研究所 广州 510010)

摘要 骨唾液酸蛋白(Bone sialoprotein,简称 BSP)是细胞外基质中的一种糖蛋白,主要分布在矿化组织中,参与骨代谢,但近年研究发现 BSP 在癌细胞的骨转移中发挥作用并对血管生成有促进作用。本文对 BSP 的结构与功能及研究状况作一介绍。

关键词 骨唾液酸蛋白 肿瘤

骨唾液酸蛋白(Bone sialoprotein,简称 BSP)是细胞外基质中的一种酸性糖蛋白,其组织分布相对局限,主要分布在矿化组织(如骨、牙齿)和钙化的软骨与骨的交界区,其含量约占骨细胞外基质中非胶原蛋白质的 15%^[1]。BSP 作为骨细胞外基质参与骨代谢,血清 BSP 浓度可反映破骨细胞活性和骨吸收过程,在一些骨代谢性疾病,如多发性骨髓瘤(MM)、无症状或良性甲状旁腺机能亢进症(HPT)、Paget 病,以及骨转移瘤病人中,血清 BSP 水平明显升高^[2]。自 1994 年首次发现 BSP 在乳腺癌细胞中表达后,BSP 就引起研究者注意,并随后在其他易发生骨转移的癌细胞中也确定有 BSP 的表达,而从 BSP 的组织局限性来分析,它在癌细胞中的表达就应该与肿瘤的骨转移有关。此外,BSP 也具有刺激血管生成、促进血管内壁增生的作用,因而也怀疑它与冠状动脉硬化、冠心病等心血管疾病有关。本文试就目前 BSP 的研究情况作一综述。

1 结构和功能

骨唾液酸蛋白(BSP)是一个大的糖基化和磷酸化蛋白质,富含唾液酸,唾液酸是神经氨酸的酰基化衍生物,在 BSP 中为糖链末端的 N-乙酰神经氨酸^[1]。其平均分子量是 70~80 kDa,核心蛋白部分约为 33~34 kDa,大约含 50%的碳水化合物,既有 O-糖链也有 N-糖链,且糖链结构为复杂型。BSP 基因序列分析结果显示,它是由 317 个氨基酸组成的分泌蛋白,包含一个 16 个氨基酸的疏水信号序列,引导蛋白进入内质网并分泌到胞外^[3]。在电子显微镜下可观察到 BSP 呈小球形并连有丝状结构,推测球状部分是蛋白质缺乏聚糖的 C 端结构,丝状结构是蛋白质高度糖基化的 N 端结构^[1]。哺乳动物的 BSP 具有高度保守区域。

从一级结构分析可知 BSP 是阴离子蛋白,含硫酸酪氨酸、酸性氨基酸富集区。靠近 N-端的谷氨酸富集区被认为是具有结合羟磷灰石(HA)的作用^[4],在组织钙化中表现为双重调节作用,一方面能促进羟磷灰石(HA)聚集形成晶核,另一方面它又能吸附于 HA 晶体表面而表现出抑制 HA 晶体生长的特性。

BSP 上靠近 G 端有 RGD 细胞识别序列,即精甘-天(门)冬氨酸结构,这一结构也存在于其他一些具有细胞粘附作用的细胞外基质蛋白中,并已确定是通过与整合素家族中受体识别介导细胞粘附和细胞迁移作用。在 BSP 上 RGD 细胞识别序列是通过与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 识别介导细胞表面与细胞外基质的粘附作用^[5,6,7],并发现 BSP 细胞粘附作用不仅与 RGD 三肽有关,也与其侧面的高度保守区域及 EPRGDNYR 肽的三级结构有关^[8],因为细胞粘附实验表明变性 BSP 与细胞的结合能力减弱,环形的含 RGD 的 BSP 片段与细胞的粘附能力明显强于相应的线性片段^[9]。除 RGD 之外的细胞粘附位点定位于酪氨酸富集区^[10]。

2 BSP 与血管生成

血管生成是指从已存在的血管中形成新的毛细血管,对生长和组织修复有重要意义,并与一些疾病有关,如牛皮癣、关节炎和癌症^[11]。在血管生成因子刺激下,内皮细胞首先增殖,然后内皮下基底膜降解并向其下的细胞外基质转移^[12]。血管生成不仅依赖血管生成因子也和血管粘附分子有关。而 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素受体与内皮细胞生物活性和血管生成有关,这些整合素是含有 RGD 细胞结合序列的多种细胞外基质配体的受体。研究发现 $\alpha_v\beta_3$ 受体在静止血管中不表达,但在血管生成过程中有很强

的表达上调现象,表明细胞可能是与一些新表达的细胞外基质配体发生作用。在骨组织中 BSP 通过 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体介导成骨细胞和破骨细胞的粘附作用,而 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的配体在血管生成中发挥重要作用,因而推断 BSP 与新血管生成有关,并已在研究中证实,用特定的抗整合素抗体或含 RGD 多肽进行干扰,能诱导内皮细胞的程序性死亡,并中断毛细血管的生成过程^[13,14,15,16]。

Bellahcene 等^[16]报道了重组人 BSP 能促进人脐带血管内皮细胞(HUVECs)的粘附性和趋药性转移,这一过程涉及到 HUVECs、 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体和 BSP 的 RGD 序列的作用,并证明 HUVECs 通过 RGD 序列与 BSP 粘附, $\alpha_v\beta_3$ 的单克隆抗体阻止 BSP 介导的 HUVECs 的粘附和转移,并抑制 BSP 的血管生成活性,而 $\alpha_v\beta_3$ 抗体不具这一作用。重组人 BSP 和含 RGD BSP 重组片段都能刺激血管生成。

3 BSP 与癌细胞的骨转移

BSP 的表达明显局限于骨相关细胞和滋养层中,而在肿瘤中也有 BSP 表达就提示 BSP 在肿瘤向骨转移过程中发挥作用。原发性乳腺癌病人的血清 BSP 升高可提示早期骨转移,并且与预后不良有明显相关性^[17],术前血清 BSP 升高的乳癌病人在术后发生骨转移的危险性高^[18]。Bellahcene 首次阐述了 BSP 在人乳腺癌转移组织中的表达^[9],随后又在其他一些癌症中发现 BSP 的表达,如骨肉瘤、破骨细胞瘤、口腔癌和前列腺癌等。Sasaguri 用致癌物 DMBA 局部作用于仓鼠颊囊诱导形成的鳞状细胞癌中可检测到 BSP 的表达^[20]。

尽管在不同的人癌组织中经常观察到 BSP 的表达,但在转化组织中 BSP 诱导表达的机理还不明确。大部分的增殖和转移反应与 BSP 的 RGD 序列相关,但也只是在转移反应中发挥部分作用,它同时与羟磷灰石聚集形成晶体有关^[21]。当 BSP 主链上带有外源的 EPRGDNYR 氨基酸序列,而不是在纤连蛋白中普遍存在的 GRGDS 时,在微克分子浓度下能强烈抑制乳癌细胞和骨细胞外基质的粘附作用^[10],并且环状结构比线性结构更有效,另外,主链结构上 RGD 三肽的改变或去除其侧面的 NYR 序列能明显降低其抑制能力。因而带有 EPRGDNYR 序列的环状结构有望成为体内抗肿瘤细胞与骨粘附的制剂。

转移的肿瘤细胞就象生长中的胎盘滋养层具有侵入性,能避免免疫监视而存活。补体一直被认为

是在肿瘤监视机制中发挥重要作用。H 因子能调节补体介导的细胞溶解,但它在侵入组织中被劫持就使得细胞能逃避补体的作用。BSP、OPN(骨桥蛋白)能和补体因子 H 形成紧密的复合体,有可能导致补体不能发挥作用。Fedarko 报道了重组 BSP 和 OPN 能阻止鼠白血病细胞被人补体系统的攻击^[22],表现出这一特征的还有人 MCF 7 乳癌细胞和 U-226 骨髓瘤细胞。在使用特定多肽和抗体阻断 BSP 和 OPN 的活性实验中确定了肿瘤细胞逃避监视的这一机制。

4 BSP 基因表达的调控

BSP 基因的表达局限在矿化组织中,是由成骨细胞、破骨细胞以及其他一些骨相关细胞合成和分泌的,仓鼠的非矿化组织中检测不到 BSP 的表达^[20],而它也在易发生骨转移的癌细胞中表达,因而 BSP 基因表达的调控不仅影响到成骨细胞的分化,也影响到骨基质的矿化和肿瘤的转移。人 BSP 基因位于第四号染色体长臂上,总长度不超过 11.1Kb,是单拷贝基因,具一个 951 个碱基的开放读码框序列^[3]。

BSP 基因表达的顺式作用元件还不十分清楚。Benson 等^[23]在鼠的 BSP 启动子上初步确定一成纤维细胞特异性顺式作用元件,受一系列与骨生成有关的因子的调节,并指出成骨细胞特异性表达 BSP 需要启动子上的一个发育同源结构域结合元件。人、鼠等的 BSP 基因已被克隆和部分测序,它们的启动子包含一个高度保守区(BSP box),位于转录起始位点上游的 nt-370 碱基处,这一区域有一 TATA 元件(-24~-29),并与一维生素 D 反应元件重叠,另外还有调控位点 CCAAT box(-50~-46)和一个 AP-2(-447~-440),转化生长因子 β (TGF β) 激活元件与 AP-2 位点重叠。再往上游有一糖皮质激素反应元件与 AP-1 位点重叠。

甲状旁腺素(PTH)作用于胚成骨细胞可使胞内 BSP 的 mRNA 水平提高 2~4 倍,并通过改变胞内 cAMP/PKA 水平实现,成骨细胞特异性表达 BSP 需要启动子上的一个发育同源结构域结合元件^[24]。IFN- α 表现出在时间和剂量依赖性的抑制甲状旁腺/甲状旁腺受体(PTH/PTHrP)基因的表达,但对其它成纤维细胞标记物如 BSP 无影响。成纤维细胞生长因子 2(FGF2)对骨生长发挥局部调节作用,静脉注射 FGF2 刺激骨的形成和矿化,也促进 BSP 的表达。在骨生长过程中糖皮质激素促进成纤维细胞的

分化和骨基质的形成,这一过程与其对 BSP 基因表达的诱导有关^[25]。地塞米松可刺激 BSP 的表达,而钙三醇则抑制其表达。Cbfa 因子(Cbfa1, 2, 3)介导失控型 BSP 启动子的抑制,在有 Cbfa 因子表达的原鸡属成纤维细胞中,内源 BSP 基因的表达发生了下调^[26]。

5 重组 BSP 表达的研究

利用基因工程技术表达 BSP 可用于研究其功能及作用机制,目前重组人 BSP 已在大肠杆菌细胞和哺乳动物细胞中表达,以酵母表达系统来表达 BSP 还未见报道。Stubbs 等^[19]用质粒 pET-15b 和 pET-22b、*E. coli* BL-21 细胞实现了 BSP 的胞内表达,但奇怪的是应用上述载体和其他一些载体都不能得到全长 BSP,只得到一些具有空间折叠的未修饰的 BSP 片段。经羟磷灰石吸附实验验证,这些 BSP 片段能与羟磷灰石(HA)结合,抑制 HA 晶体的生长,但较天然 BSP 分子的抑制能力要弱,这仍能说明其 HA 结合能力是与蛋白质结构直接相关的。此外,包括磷酸化、硫酸化和糖基化的转录后修饰可能直接或间接地影响 BSP 同羟基磷灰石晶体表面的吸附。

Wuttke 等^[1]用 BSP 表达质粒转染人胚胎肾细胞(EBNA-293, Invitrogen),获得重组 BSP 蛋白,与骨 BSP 相比较,二者具有相似的二级结构,碳水化合物分析显示重组蛋白糖基化程度较高,骨 BSP 与羟磷灰石的亲和能力高于重组 BSP,这可能与骨 BSP 中寡聚糖上带有更多的 N-乙酰神经氨酸(NeuAc)有关。

6 结语

综上所述, BSP 是具细胞粘附性能的细胞外基质,参与细胞粘附、细胞转移和信号识别,不仅能介导成纤维细胞、成骨细胞和破骨细胞粘附于固体基质表面,其表达以及与相关的整合素/受体作用还直接影响癌转化细胞的转移能力,并对血管生成有促进作用。那么阻断 BSP 活性是否能抑制肿瘤的骨转移以及是否有临床应用价值?从目前的研究情况来看, BSP 的作用机制还不十分清楚,而 RGD 序列的结构类似物已表现出抑制乳癌细胞和骨细胞外基质的粘附作用,因而更深入地研究 BSP 的作用机制,找到安全有效地阻断 BSP 活性的药物,探索其作为药物治疗靶子的可行性,对临床治疗有重要意

义。

参考文献

- [1] Wuttke M., Müller S., Nische D. P., et al. *J. Biol. Chem.* 2001, 276(39): 36839– 36848
- [2] Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, et al. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 1996, 81: 3289– 3296
- [3] Fisher WL, McBride OW, Temine JD, et al. *J. Biol. Chem.* 1990, 265(4): 2347– 2351.
- [4] Hunter CK, Goldberg HA. *Biochem J.* 1994, 302: 175– 179.
- [5] Oldberg A., Franzen A., Heinegård D., et al. *J. Biol. Chem.* 1988, 263: 19433– 19436.
- [6] Miyauchi A., Alvarez J., Greenfield E. M., et al., *J. Biol. Chem.* 1991, 266 (30), 20369– 20374.
- [7] Ross F. P., Chappel J., Alvarez J. I., et al. *J. Biol. Chem.* 1993, 268 (13), 9901– 9907.
- [8] Vander P. G., Vloedgraven H. J., Ivanov, B., et al. *Cancer Research*, 1996, 56 (8), 1948– 1955.
- [9] Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, et al. *Nat Med.* 1996; 2: 529– 533.
- [10] John T. Stubbs III, Keith P., et al. *J. Bone and Mineral R.* 1997, 12 (8), 1210– 1222.
- [11] Folkman J. *Nat Med.* 1995, 1: 27– 31.
- [12] Brooks PC. *Eur. J. Cancer.* 1996, 32A: 2423– 2429.
- [13] Brooks PC, Clark RA, Cheres DA. *Science.* 1994, 264: 569– 571.
- [14] Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. *Cdl.* 1994, 79: 1157– 1164.
- [15] Drake CJ, Cheres DA, Little CD. *J Cdl Sci.* 1995, 108: 2655– 2661.
- [16] Bellahcene A., Bonjean K., Fohr B., et al. *Cellular Biology*, 2000, 86(8): 885.
- [17] Bellahcene, A., Meriard, S., Bufalino, R., et al. *Inter. J. Cancer* 1996, 69 (4), 350– 353.
- [18] Diel IJ, Solomayer EF, Seibel MJ, et al. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5(12): 3914
- [19] Bellahcene, A., Merville, M. P., Castronovo, V., *Cancer Research*, 1994, 54 (11), 2823– 2826.
- [20] Sasaguria K., Garss B., Sobek J., et al. *Archives of Oral Biology*, 2000, 45: 551– 562.
- [21] Castronovo, V., Bellahcene, A., *Inter. J. Oncology*, 1998, 12 (2), 305– 308.
- [22] Fedarko N. S., Fohr B., Robey P. G., *J. Biol. Chem.* 2000, 275 (22): 16666– 16672.
- [23] M. Douglas Benson, Jeffrey L. Bargeon, *J. Biol. Chem.* 2000, 275 (18), 13907– 13917.
- [24] E. Tsuda Futami, A. Shioi, et al. *Bone*, 1998, 23(3): 205– 211.
- [25] Sodek J, Kim RH, Ogata Y, et al. *Connect Tissue Res* 1995, 32: 209– 217.
- [26] Javed A., George L. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(8): 2891– 2905.

Research Progress on Bone Sialoprotein

Dong Yan¹ Yang Liansheng¹ Wang Jie²

(1 South China University of Technology 510406) (2 Institute of Molecular Biology in Military Hospital, Guangzhou 510010)

Abstract Bone sialoprotein (BSP) is a glycoprotein of extracellular matrix, existing almost exclusively in mineralized connective tissues. BSP was thought to be related to bone metabolism, but now it has been observed to mediate the metastasis of tumour cells to bone. It also plays a critical role in human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis.

Key words Bone sialoprotein, Tumor

(接第 89 页)

开, 阳光温暖而灿烂, 平均气温 20~ 25℃。会议还将为与会代表和随从人员安排适宜的旅游观光路线。

会议出席

有意提交摘要与会者请认真填写后附的回执表格进行注册, 并与摘要标题一起寄回。提交摘要的正式语言为英语。与会者也可通过如下网址进行网上注册:

<http://www.biotech2003.cheneng.tsinghua.edu.cn>

<http://www.biotech.org.cn>

主办单位

中国生物工程学会

日本生物工程学会

韩国生物技术与工程学会

联系方式

有意与会者请按如下地址进行通信联系:

北京清华大学化工系

曹竹安 教授, 于慧敏 博士

邮编: 100084

E. mail: cbiotech@tsinghua.edu.cn

Fax: 010-62770304