

骨科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000354

骨形态发生蛋白在椎间盘退变修复中的作用机制研究进展

周 栩, 权正学

(重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016)

【摘要】椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)主要见于腰椎间盘突出、椎管狭窄等疾病,其引起的肌肉劳损、腰背疼痛等症状严重困扰患者的正常生活。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)已被证实是一类与骨形成及软骨形成具有密切相关性的生长因子,在椎间盘组织的发展形成与功能维持中发挥的效应吸引了大量研究者探索其机理,而通过基因治疗的途径早期防治 IDD 是目前的研究热点之一,本文就 BMPs 在 IDD 修复过程中作用机制的研究进展进行综述。

【关键词】骨形态发生蛋白;椎间盘退变;基因治疗

【中图分类号】R681.5⁺3

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-03-10

Research progresses of mechanism of bone morphogenetic proteins in the repairing of intervertebral disc degeneration

Zhou Xu, Quan Zhengxue

(Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Intervertebral disc degeneration(IDD) is mainly seen in the lumbar disc herniation, spinal stenosis and other spinal diseases and may cause symptoms like muscle strain and back pain, seriously bothering the normal lives of patients. Bone morphogenetic protein(BMP) is a kind of protein proven to be closely related with bone formation and cartilage formation. The effect of BMP on the development and function maintaining of intervertebral disc has attracted a large number of researchers to explore its mechanism. The preventive treatment of IDD by gene therapy is one of the current research hotspots. The research progresses of mechanism of BMP in the repairing of intervertebral disc degeneration were reviewed in this article.

【Key words】bone morphogenetic protein; intervertebral disc degeneration; gene therapy

1 椎间盘结构及退变机制

椎间盘位于脊柱相邻椎体之间,主要由外周的纤维环、中央的胶冻状髓核、相邻椎间盘和椎体之间的软骨终板组成。纤维环外层为类成纤维细胞,纤维环内层和髓核大多为类软骨细胞,其成分主要为胶原纤维、弹性纤维和蛋白多糖,其中髓核的含水量可达 80%以上,而从结构上看髓核组织包括髓核细胞和细胞外基质,髓核细胞数量很少而细胞外基质含量相对较丰富^[1]。椎间盘是人体最大的无血管组织,血液中的营养物质主要通过软骨终板弥散进入椎间盘。正常情况下,细胞外基质合成和降解处于动态平衡,维持椎间盘的健康状态,当降解率超过合成率之后,髓核中蛋白多糖和Ⅱ型胶原

含量逐渐减少,最终蛋白多糖和水分从髓核内流失、髓核纤维化、纤维环承受重力增加从而导致纤维环撕裂,使退变的发生概率增高^[2]。因此,研究发现椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)的这一椎间盘退变的特征后,恢复椎间盘中蛋白多糖和Ⅱ型胶原蛋白的产生成为治疗 IDD 的重要因素。

2 骨形态发生蛋白及其作用机制概述

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的成员,是 1 种酸性蛋白质,具备丰富的生物学作用,能够调控不同类型的细胞(包括成骨细胞、软骨细胞、神经元细胞和上皮细胞等)的增殖、分化和凋亡,在促进骨形成、组织损伤的修复中发挥着重要作用^[3],是目前发现的成骨及成软骨活性最强的生物蛋白。分子细胞生物学家通过一系列实验阐明了 BMPs 引起骨形成的部分机制:当 BMPs 与间质细胞的表面受体相结合后,1 个 BMP 信号级联被激活,信号通过特

作者介绍:周 栩, Email: zxvin@163.com,

研究方向:脊柱外科。

通信作者:权正学, Email: quanzx18@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81272039)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1107.001.html>
(2014-07-15)

殊的蛋白质传递至细胞核,引起相关基因表达,合成与软骨形成与骨形成相关的大分子蛋白,诱导间质细胞转变为软骨细胞或成骨细胞^[4]。现已证实多功能间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)经 BMP-2、4、6、7、9 等诱导后能分化为成骨细胞^[5],BMPs 刺激成骨分化的生物学效应是其在 IDD 修复中发挥作用的重要依据。

3 BMPs 在 IDD 修复中作用机制的实验研究

目前,已有大量实验围绕 BMPs 的成骨分化作用研究 IDD 的修复机制。Kim 等^[6]利用藻酸盐载体进行人体椎间盘细胞的三维培养,通过中国仓鼠卵巢细胞 BMP-2 cDNA 基因转导制备重组人骨形态发生蛋白-2(recombinant human bone morphogenetic protein, rhBMP-2),用 rhBMP-2 干预的椎间盘细胞后进行培养,检测发现蛋白多糖合成增加, I、II 型胶原表达量也有所增加。

对 BMP-7 的研究方面,Wei 等^[7]报告了 rhBMP-7 可以抑制体外培养的传代髓核细胞的凋亡,这种抗凋亡作用可能是通过抑制 caspase-3(半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶)的活性所致。Milbrandt 和 Sucato^[8]研究证实 BMP-7 能够促细胞基质合成和抑制 IDD,从而提高细胞合成和增殖能力,在此基础上,李涛和刘强^[9]通过免疫组化染色检测 BMP-7 在腰椎间盘突出组与脊柱侧弯对照组的表达,发现 BMP-7 在退变椎间盘髓核中表达明显增加,其表达强度明显高于脊柱侧弯组。

建立退变椎间盘动物模型也是常见的研究策略。Sobajima 等^[10]对新西兰兔进行腰椎前路穿刺建立退变动物模型,然后分别于穿刺后 3、6、12 周获取椎间盘组织进行检测,发现 BMP-2 和 BMP-7 的表达随着时间增加而逐渐升高,因此推测椎间盘受损伤后,细胞自身的损伤修复能力加强使 BMP-2、7 的表达量增加,但这一代偿性变化并不能逆转椎间盘的退变趋势。Murakami 和 Sowa 等^[11-12]分别进行实验发现相似的结果:将新西兰兔分为 6 个月的低龄组和 1 年以上的中高龄组,分别处死后取椎间盘组织行 PCR 检测发现:中、高龄组兔椎间盘内 BMP-2 和 BMP-7 的 mRNA 均呈现高表达水平,与低龄组兔相比 BMP-2 含量明显增加,这一结果表明动物体内正向调控成骨作用的 BMPs 其表达量可能与年龄呈正相关。虽然 BMPs 的表达随年龄增加而不断上调,但由于年龄增加退变进一步发展,增加的 BMPs 表达量始终无法阻止椎间盘细胞分解代谢加快的趋势,最终导致椎间盘的退变程度不断加重。

而与以上发现 BMPs 随年龄增加而表达增高的实验不同,Hino 等^[13]在进行小鼠实验时发现 BMP 家族中最特殊的一种蛋白:BMP-3,随着小鼠年龄增长 BMP-3 的表达呈现出下降的趋势,表现为抑制成骨调控作用,是种负向调节因子。

Haschtmann 等^[14]认为:以退变椎间盘模型、细胞或组织碎片为实验材料,其效度有限且根据采用的实验模型的不同会出现争议性结论,因此采用了完全的兔椎间盘外植体作为实验对象,在 BMP-2 或 TGF- β 3 浓度为 1 μ g/ml 的 DMEM-F12 培养基中进行培养,21 d 后 RT-PCR 检测发现纤维环的蛋白多糖、胶原酶基因表达量增加,证明这两类细胞因子具

有骨性诱导作用。

4 BMPs 治疗 IDD 的相关研究

由以上的研究不难发现,BMPs 在 IDD 的发展过程中扮演了重要角色,由于人体自身的代偿能力有限,通过基因治疗的方式弥补代偿能力的不足,有望成为延缓 IDD 或恢复受损椎间盘的有效途径。基因工程技术是文献中提出的 BMPs 治疗 IDD 主要应用方式(如应用腺病毒介导的基因转导)。在所有成员中,BMP-2、BMP-4、BMP-7、BMP-9、BMP-12、BMP-14 等均有研究指出其与 IDD 的相关性,其中,BMP-2 和 BMP-7 在治疗策略的研究中倍受青睐,也是仅有的通过美国食品和药物管理局(FDA)认证批准应用于腰椎手术的人类重组生长因子^[15]。

Gilbertson^[16]采用 rhBMP-2、rhBMP-12 及腺病毒转染的 BMP-12(Ad-BMP-12)分别干预平面培养的髓核细胞和纤维环细胞,发现 rhBMP-2、12 可以增加髓核细胞基质合成而对纤维环细胞无明显作用;而 Ad-BMP-12 则能同时使 2 种细胞的基质合成水平增加,因此可能应用于椎间盘以促进基质生成,但还需要进一步研究来证实 rhBMP-12 是否能应用于 IDD 中产生保护或修复作用。

亦有实验者从 BMPs 与其他因子联合作用的途径着手进行研究。Cho 等^[17]研究 BMP-2 与 TGF- β 两种细胞因子联合作用对猪椎间盘纤维环的影响,实验结果发现两者联合治疗的最小剂量刺激产生的蛋白多糖增加量高于两者单独作用的蛋白多糖增加量,证明 BMP-2 与 TGF- β 能够刺激椎间盘蛋白多糖的产生且两者具有协同效应。Kim 等^[18]发现牛髓核细胞在 BMP-7 和胰岛素生长因子-1 联合作用下,Smad1/2/3/5/8 等信号传导途径被大量激活,其效应与 BMP 联合 TGF- β 的作用相似。Ellman 等^[19]通过其研究证明乳铁素联合 BMP-7 有维持体内椎间盘代谢平衡的潜在疗效,从而为 IDD 所致腰痛提供了新的治疗方案。Steven 等^[20]提出,正常椎间盘细胞外基质(extracellular matrix, ECM)处于合成与分解的动态平衡状态,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一种能促进 ECM 降解的细胞因子,而基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 的特异性拮抗剂,以腺病毒为载体将 AAV2-BMP2 及 AAV2-TIMP1 联合导入兔退变椎间盘髓核后,通过 MRI 和免疫组织化学法评估椎间盘的退变情况,发现联合导入两种因子后能够改善兔体内椎间盘的退变程度。Than 等^[21]认为,未来的研究可能会使 BMPs 成为 IDD 突出所致腰背部疼痛的主要保守治疗方式,以上实验结果也证实了运用 BMPs 基因治疗 IDD 这一途径的可行性,并为进行更深入研究提供了有力依据。

5 存在的问题与展望

虽然相关的动物实验结果证实了 BMPs 治疗 IDD 的潜力,但运用于临床治疗仍存在一些尚待解决的问题。

Wang 等^[2]研究指出体外应用 BMP-14(GDF-5)能有效诱导椎间盘细胞活化增殖、胶原蛋白合成增加,而较高剂量的 GDF-5 则会引起相邻椎体和结缔组织的炎症反应,这表明 GDF-5 的正面效应可能取决于与药物的剂量。Wallach 等^[23]在评估腺病毒转染安全性的实验中对退变兔椎间盘模型注射不同浓度和作用时间的 Ad-BMP-2 和 Ad-TGF- β ,高浓度实验组出现了两侧肢体末端麻木的结果。Danniel 等^[24]在浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 BMP-2 或 TGF- β 3 中培养兔椎间盘外植体 21 d 后,出现了纤维环骨化的现象,而检测蛋白多糖等指标发现 IDD 程度并无明显改善。由以上实验结果不难看出,BMPs 作用椎间盘细胞的最佳浓度、持续时间以及和其他细胞因子之间的协同关系等基础研究中发现的问题,在临床应用时会转变为体外注射生长因子的最适剂量、注射疗程及反复注射引发的并发症等难题。同时,由于腺病毒载体转染、转录有肿瘤发生的风险,导致基因治疗运用于临床试验的困难,Epstein^[25]在其最新文章中评论称 BMP 为“未经临床试验认可的药物”(off-label)。

虽然它存在着一定的局限性,但大量的活体及离体试验已然证明 BMPs 不仅广泛存在于人体椎间盘中,并且其表达量的增加能够增加椎间盘细胞外基质的合成,有效延缓椎间盘的退变过程,而未来运用组织工程技术联合多种生物学治疗的技术可能会成为临床应用 BMP 治疗 IDD 的全新途径。因此,BMP 蛋白家族广阔的临床应用前景值得科研工作者进行更深入的探索。

参 考 文 献

- [1] Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, et al. Ex vivo observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs[J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(1): 10-19.
- [2] Jackson AR, Gu WY. Transport properties of cartilaginous tissues[J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2009, 5(1): 40.
- [3] Moghaddam A, Elleser C, Biglari B, et al. Clinical application of BMP 7 in long bone non-unions[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2010, 130(1): 71-76.
- [4] Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83-A s(Pt1): s1-s6.
- [5] Shah P, Keppler L, Rutkowski J. Bone morphogenetic protein: an elixir for bone grafting—a review[J]. *J Oral Implantol*, 2012, 38(6): 767-778.
- [6] Kim DJ, Moon SH, Kim H, et al. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells[J]. *Spine*, 2008, 28(24): 2679-2684.
- [7] Wei A, Brisby H, Chuang SA, et al. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis[J]. *Spine*, 2008, 8(3): 466-474.
- [8] Milbrandt TA, Sucato DJ. The position of the aorta relative to the spine in patients with left thoracic scoliosis: a comparison with normal patients[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2007, 32(12): E348-E353.
- [9] 李涛, 刘强. IL-17 与 BMP-7 在退变腰椎间盘髓核组织中的表达及其意义[J]. *中国现代医生*, 2011, 49(6): 1-2.
- [10] Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction[J]. *The Spine Journal*, 2005, 5(1): 14-23.
- [11] Murakami H, Yoon ST, Attallah-Wasif ES, et al. The expression of anabolic cytokines in intervertebral discs in age-related degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(16): 1770-1774.
- [12] Sowa G, Vadalà G, Studer R, et al. Characterization of intervertebral disc aging: longitudinal analysis of a rabbit model by magnetic resonance imaging, histology, and gene expression[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008, 33(17): 1821-1828.
- [13] Hino J, Kangawa K, Matsuo H, et al. Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions[J]. *Front Biosci*, 2004, 9(1): 1520-1529.
- [14] Haschtmann D, Ferguson SJ, Stoyanov JV. BMP-2 and TGF- β 3 do not prevent spontaneous degeneration in rabbit disc explants but induce ossification of the annulus fibrosus[J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(9): 1724-1733.
- [15] Maerz T, Harry Herkowitz H, Kevin Baker K. Molecular and genetic advances in the regeneration of the intervertebral disc[J]. *Surg Neurol Int*, 2013, 4(s2): s94-s105.
- [16] Gilbertson L, Ahn SH, Teng PN, et al. The effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2, recombinant human bone morphogenetic protein-13, and adenoviral bone morphogenetic protein-12 on matrix synthesis in human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells[J]. *Spine J*, 2008, 8(3): 449-456.
- [17] Cho H, Lee S, Park SH, et al. Synergistic Effect of Combined Growth Factors in porcine intervertebral disc degeneration[J]. *Connective tissue research*, 2013, 54(3): 181-186.
- [18] Kim JS, Ellman MB, An HS, et al. Insulin-like growth factor 1 synergizes with bone morphogenetic protein 7-mediated anabolism in bovine intervertebral disc cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(12): 3706-3715.
- [19] Ellman MB, Kim J, An HS, et al. Lactoferricin enhances BMP7-stimulated anabolic pathways in intervertebral disc cells[J]. *Gene*, 2013, 524(2): 282-291.
- [20] Leckie SK, Bechara BP, Hartman RA, et al. Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. *Spine J*, 2012, 12(1): 7-20.
- [21] Than KD, Rahman SU, Vanaman MJ, et al. Bone morphogenetic proteins and degenerative disk disease[J]. *Neurosurgery*, 2012, 70(4): 996-1002.
- [22] Wang H, Kroeber M, Hanke M, et al. Release of active and depot GDF-5 after adenovirus-mediated overexpression stimulates rabbit and human intervertebral disc cells[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2004, 82(2): 126-134.
- [23] Wallach CJ, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene transfer: a pilot study[J]. *Spine J*, 2006, 6(2): 107-112.
- [24] Danniel H, Stephen J, Jivko V, et al. BMP-2 and TGF- β do not prevent spontaneous degeneration in rabbit disc explants but induce ossification of the annulus fibrosus[J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(9): 1724-1733.
- [25] Epstein NE. Commentary on research of bone morphogenetic protein discussed in review article: genetic advances in the regeneration of the intervertebral disc[J]. *Surg Neurol Int*, 2013, 4(s2): s106-s108.

(责任编辑: 冉明会)