

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.04.0428

· 综述 ·

骨形态发生蛋白 2 在黄韧带骨化发生和发展中的作用

袁佳滨¹, 孙凯强², 史建刚^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院脊柱外科, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)长征医院脊柱外科, 上海 200003

[摘要] 黄韧带骨化是胸椎管狭窄的主要原因, 其起病隐匿, 出现症状时多造成脊髓严重压迫, 临床治疗效果不理想, 因此亟需研发针对黄韧带骨化早期诊治和预后监测的有效手段。骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 属于转录生长因子 β 家族成员, 在胚胎发育早期阶段诱导间充质干细胞成骨分化和软骨内成骨过程中发挥关键调节作用。研究表明黄韧带骨化, 尤其是连续多水平的黄韧带骨化与 BMP-2 关系密切。本文对 BMP-2 在黄韧带骨化发生和发展中的作用机制作一综述, 希望能为黄韧带骨化的早期诊治和预后监测提供新的思路。

[关键词] 黄韧带骨化; 骨形态发生蛋白质; 发病机制; 诊断; 靶向治疗; 预后

[中图分类号] R 686.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2018)04-0428-05

Role of bone morphogenetic protein 2 in occurrence and development of ligamentum flavum ossification

YUAN Jia-bin¹, SUN Kai-qiang², SHI Jian-gang^{2*}

1. Department of Spine Surgery, Changhai Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Spine Surgery, Changzheng Hospital, Navy Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

[Abstract] The ossification of ligamentum flavum (OLF) is a major cause of thoracic spinal stenosis. Due to insidious onset, OLF usually results in severe compression of spinal cord when discovered, and the clinical outcomes are poor. Therefore, novel and effective diagnostic and therapeutic approaches for OLF are greatly needed. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), a member of the transforming growth factor β family, possesses a critical role in the differentiation of mesenchymal stem cells towards osteoblastic lineage and endochondral ossification in the early stage of embryonic development. Increasing researches revealed that OLF, especially the continuous multilevel ossification, correlates closely with BMP-2. In this review, we summarized the advances on the role of BMP-2 in the occurrence and development of OLF, and prospected the application of BMP-2 as a potential target in the diagnosis, therapy and prognosis monitoring of OLF.

[Key words] ossification of ligamenta flava; bone morphogenetic protein 2; pathogenesis; diagnosis; targeted therapy; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(4): 428-432]

黄韧带骨化 (ossification of ligamentum flavum, OLF) 首次由 Polgar 教授于 1920 年提出^[1], 之后逐渐被人们关注。据统计, 在胸椎管狭窄的病因中 OLF 占 72.3%^[2]。临床流行病学研究表明, 胸椎 OLF 主要发生在东亚人群, 日本、中国、韩国是高发国家^[3]。这些区域性差异表明遗传因素可能在 OLF 发生、发展中起一定作用。OLF 主要发生在下胸椎, 由于其进展缓慢, 早期患者一般无任何明显症状, 一旦出现症状, 脊髓压迫已较严重,

错过保守治疗的时间窗。外科手术是 OLF 的有效治疗手段, 然而多种并发症如脑脊液漏、神经功能恶化等仍然给临床治疗和患者预后造成巨大困难。因此目前临床亟需研发针对 OLF 早期诊治和预后监测的有效手段。

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 在哺乳动物早期发育成骨过程中具有关键的调控作用^[4]。研究发现肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor β , $TGF-\beta$) /BMP 基因突变与后

[收稿日期] 2017-10-12 [接受日期] 2018-03-28

[作者简介] 袁佳滨, 硕士生. E-mail: smmuyuan@163.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885631, E-mail: changzhengspine@smmu.edu.cn

纵韧带骨化 (ossification of posterior longitudinal ligament, OPLL) 有关^[5]。有研究表明, *BMP* 基因突变可能在 OLF 发病机制中也起着关键作用, 并且已经证明重组 *BMP-2* 蛋白能够在动物体内和体外诱导 OLF 形成^[6-8]。因此本文主要就 *BMP-2* 在 OLF 发生和发展中的作用机制进行综述, 希望能为 OLF 的早期诊治和预后监测提供更多新的思路。

1 OLF 发生的病理过程

从解剖学角度讲, 黄韧带主要由两侧的囊状部分和中间的椎板间部分组成。正常情况下黄韧带的主要成分是弹性纤维, 对脊柱提供稳定和保护作用^[9]。骨化通常最先发生在韧带囊状部分, 然后逐渐增厚并对脊髓造成压迫。双侧骨化块最后融合形成中央结节型骨化块^[10]。OLF 是一种软骨内成骨, 骨化首先从成纤维细胞增殖开始, 然后向软骨细胞分化, 最后软骨细胞进一步转化为成骨细胞, 完成整个骨化过程^[11]。Okada 等^[12]在对患者手术切除的黄韧带组织观察中发现, 骨化常常发生在囊状部分血管分布丰富的区域; 骨化的黄韧带中正常弹力纤维减少且排列极不规则, 而胶原纤维数量明显增加; 肿胀的胶原纤维周围可见大量增殖的软骨细胞, 靠近钙化区的软骨细胞增殖明显。骨化组织周围的胶原纤维主要是 II 型胶原纤维, 这是软骨细胞的标志, 且常在软骨能被检测到之前已能够被检测到^[13]。

2 BMP 的生物学功能

BMP 属于 *TGF-β* 家族成员, 主要由骨祖细胞、成骨细胞、软骨细胞和血小板等合成, 在细胞增殖和分化、细胞凋亡以及成骨反应等过程中都起着关键作用。研究表明, 多种 *BMP* 参与软骨内成骨, 在诱导间充质干细胞向成骨细胞分化过程中起调控作用^[14]。*BMP-2* 是第 1 个被美国食品药品监督管理局认可用作骨移植替代物的 *BMP*^[15]。

3 BMP-2 介导骨形成机制

BMP-2 通过诱导间充质干细胞的骨分化实现软骨内成骨, 是维持骨、软骨形成和成人骨稳态的关键调节因子, 目前多用于骨折固定、关节融合和椎体骨质缺损等的治疗^[16]。*BMP-2* 蛋白直接与受体结合后启动成骨相关信号通路, 骨形态发

生蛋白受体 (bone morphogenetic protein receptor, *BMPR*) II 首先被磷酸化激活, 然后进一步激活 *BMPR* I。受体相关的酶使得受体调控的 *Smad* 蛋白 (receptor-regulated *Smad* protein, R-*Smad*; 通常为 *Smad1/5/8*) 磷酸化激活, 并同时向细胞核移动。磷酸化的 R-*Smad* 与辅助型 *Smad* (通常为 *Smad4*) 结合形成异源二聚体复合物使转导信号持久, 继而转移到细胞核中结合相应的转录因子, 如远端缺失同源盒 5 (distal-less homeobox 5, *Dlx5*) 以启动转录^[17]。*BMP-2* 参与骨形成的另一途径是直接诱导成骨细胞中的成骨转录因子 *Runt* 相关转录因子 2 (*Runt*-related transcription factor 2, *Runx2*) 表达激活成骨细胞, 使得骨分化效应加强, 同时介导 II 型胶原蛋白和纤维粘连蛋白的产生^[18]。研究表明, *BMP-2* 的启动子序列中也存在 *Runx2* 结合位点, 因此推测在成骨过程中两者可能存在正反馈效应^[19]。

4 BMP-2 参与 OLF

OLF、OPLL 和弥漫性特发性骨质增生症 (diffuse idiopathic skeletal hyperostosis, *DISH*) 都属于脊柱韧带骨化疾病, 且均属于软骨内成骨。研究发现, 很多基因位点参与韧带骨化的发生和发展^[20]。*BMP-2* 是成骨的关键因子, 在胚胎发育早期骨形成中发挥关键调节作用。*BMP-2* 参与 OPLL 研究已经较为充分, *BMP-2* 与 OLF 的关系也越来越受到研究者的重视^[21]。

4.1 临床病理研究 Hayashi 等^[22]在人体骨化黄韧带中发现, *BMPR* 在钙化区周围成熟和未成熟的软骨细胞以及钙化组织远处的梭形细胞和圆细胞中均有表达, 且与 *BMP-2* 共存于骨化的黄韧带组织中, 而在对照组中仅在韧带与骨相连区域发现 *BMP-2* 及其受体少量表达。研究还发现, 病变范围较大的 OLF 患者多合并 OPLL 和 *DISH*, 提示 OLF 也可能像其他脊柱韧带骨化一样具有基因易感性。Qu 等^[23]在对 OLF 患者基因研究中发现, 在 *TGF-β*/*BMP* 信号通路中存在 39 个可能的致病基因突变, 大多数突变都出现在连续多节段 OLF 患者组中, 且有 6 例 (6/71) 患者均出现 2 个 *BMP-2* (NM_001200.3) 外显子区域中的错义突变, c.460C>G:p.(R154G) 和 c.584G>T:p.(R195M)。蛋白质印迹分析发现, 突变 *BMP-2* 基

因转染的细胞中成骨标志物碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 表达在第 7 天时上调, 成骨活性明显高于对照组。

Ning 等^[24]对患者骨化黄韧带细胞施加循环牵力, 发现多水平 OLF 患者黄韧带细胞 BMP-2 的 mRNA 及其蛋白表达水平明显高于单水平 OLF 患者; 单水平 OLF 患者黄韧带细胞成骨相关基因表达在牵力作用时间延长后也会增加, 但与对照组比较差异无统计学意义。这些提示单水平和多水平 OLF 可能具有不同的发病机制, 这与两者不同的临床进展和预后^[25]相一致。因此, 我们推测 BMP-2 基因在多水平 OLF 的发生、发展中起着关键作用, 可使其对机械牵力等因素的敏感性增加。对于单水平 OLF, 由于其多发生在下胸椎 ($T_9 \sim T_{12}$), 此处属于胸腰关节区, 脊柱后部张力大, 椎体旋转范围大, 相关结构更容易退化^[2]。我们推测其发病可能与长期的轴向负荷过载和反复旋转牵拉使得成骨相关基因如 BMP-2 过度激活有关。

4.2 动物研究 Tsukamoto 等^[26]通过对大鼠尾椎施加反复的牵力发现, 牵力负荷轻的组别以小圆细胞增殖为主, 在负荷增加和时间延长后则以由编织骨形成的软骨组织为主; 免疫组化染色发现, BMP-2 在异位钙化组织周围的圆细胞和成纤维细胞中表达, 而在成熟的软骨样细胞中不表达, 表明 BMP-2 可能参与韧带细胞向软骨细胞或骨细胞转化过程。Hoshi 等^[27]向大鼠模型硬膜外间隙中注射重组人 BMP-2, 1 周后韧带细胞开始向软骨细胞分化; 第 2 周在 II 型胶原富集区发现大量的软骨细胞, 且这些软骨细胞大量表达 BMP-2。到第 6 周时韧带组织完全被骨组织取代, 并且其病理变化和临床患者骨化黄韧带变化相似, 说明 BMP-2 在 OLF 过程中起关键作用, 且能够诱导 BMP-2 的表达。

4.3 其他相关成骨因子 一些转录因子如性别决定相关高迁移率簇蛋白盒基因 9 (SRY-related high mobility group-box gene 9, Sox9)、Runx2、肌节同源异型框基因 2 (muscle segment homeobox homolog 2, Msx2) 等也在成纤维细胞向软骨细胞和骨细胞的病理性转变时起作用。Uchida 等^[28]发现, 在骨化黄韧带组织中 Sox9 主要在增殖的软骨细胞中表达, 在肥大的软骨细胞中表达减少, 其主要通过调节 II 型胶原蛋白基因的表达参与软骨分

化和软骨形成过程, 同时 Sox9 的表达受 BMP-2 的调节。作为 BMP-2 的下游转录因子, Runx2 是 ALP 基因启动子的关键调节因子, 能增强 BMP-2 特异性 Smad 的效应^[29]。研究发现 Runx2 也广泛存在于骨化的韧带组织中, 在增殖和肥大的软骨细胞中均有表达, 且 Runx2 在中国汉族 OLF 人群中具有基因多态性^[30]。Msx2 存在于增殖的软骨细胞中, 但是在骨化韧带周围的间充质细胞中呈强阳性^[28]。这些转录因子在 OLF 过程中均与 BMP-2 相互作用^[31]。OLF 过程伴随着血管增生, 长期损伤积累导致黄韧带产生大量的毛细血管, 构成韧带骨化的基础^[32-33]。研究发现, 钙化区肥大的软骨细胞能够通过分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 调节血管生成, 特别是在骨化前区更明显^[34-35]。并且也通过与 BMP-2 之间信号转导交联方式参与成骨细胞分化^[36]。

根据以上研究, 我们推测在 OLF 发生和发展过程中多种因素尤其力学因素等激活了 BMP-2 基因。在 BMP-2 的作用下, 参与启动纤维细胞转变为成纤维细胞和圆细胞, 随后进一步调节这 2 种细胞向纤维软骨细胞和软骨细胞分化。在成骨过程中 BMP-2 同时调控 Sox9、促进软骨分化和 II 型胶原蛋白形成。最后阶段 BMP-2 和 Runx2 正反馈作用协同促进软骨成熟和成骨细胞形成, 而在整个骨化过程中 Msx2 介导成熟的间充质细胞分化、VEGF 促进新生血管形成, 同时与 BMP-2 相互作用为成骨提供相应支持作用。

5 小结

综上所述, BMP-2 在 OLF 发生和发展中起着关键作用。在连续多水平 OLF 患者中 BMP-2 基因效应明显, 分析原因可能是错义突变使 BMP-2 过度激活导致相关蛋白表达增加。而单水平的 OLF 可能与长期的轴向负荷过载和反复旋转牵拉等使 BMP-2 过度激活有关。临床上 OLF 具有发现晚和容易复发的特点, 且致瘫发生率高, 因此我们提出临床上可以通过检测患者血液中 BMP-2 基因及其产物变化, 以及研制针对 BMP-2 的靶向药物实现 OLF 的早期诊治并监测预后。

[参考文献]

- [1] 戴力扬. 黄韧带骨化症[J]. 中华外科杂志, 1989, 27:

- 99-102.
- [2] HOU X, SUN C, LIU X, LIU Z, QI Q, GUO Z, et al. Clinical features of thoracic spinal stenosis-associated myelopathy: a retrospective analysis of 427 cases[J]. *Clin Spine Surg*, 2016, 29: 86-89.
- [3] GUO J J, LUK K D, KARPPINEN J, YANG H, CHEUNG K M. Prevalence, distribution, and morphology of ossification of the ligamentum flavum: a population study of one thousand seven hundred thirty-six magnetic resonance imaging scans[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35: 51-56.
- [4] CHEN G, DENG C, LI Y P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8: 272-288.
- [5] JEKARL D W, PAEK C M, AN Y J, KIM Y J, KIM M, KIM Y, et al. *TGFBR2* gene polymorphism is associated with ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. *J Clin Neurosci*, 2013, 20: 453-456.
- [6] HOU X F, FAN D W, SUN C G, CHEN Z Q. Recombinant human bone morphogenetic protein-2-induced ossification of the ligamentum flavum in rats and the associated global modification of histone H3[J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21: 334-341.
- [7] CHAO Y H, HUANG S Y, YANG R C, SUN J S. Tissue transglutaminase is involved in mechanical load-induced osteogenic differentiation of human ligamentum flavum cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2016, 57: 307-318.
- [8] YANG I H, KIM H, KWON U H, LEE K I, JUN J A, KIM J H, et al. *De novo* osteogenesis from human ligamentum flavum by adenovirus-mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfer[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30: 2749-2754.
- [9] TRIVEDI P, BEHARI S, PAUL L, BANERJI D, JAIN V K, CHHABRA D K. Thoracic myelopathy secondary to ossified ligamentum flavum[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2001, 143: 775-782.
- [10] TANAKA Y, SATO T, AIZAWA T. Surgery for ossification of the ligamentum flavum[M]// YONENOBU K, NAKAMURA K, TOYAMA Y. OPLL. Japan: Springer, 2006: 265-269.
- [11] ZHONG Z M, CHEN J T. Phenotypic characterization of ligamentum flavum cells from patients with ossification of ligamentum flavum[J]. *Yonsei Med J*, 2009, 50: 375-379.
- [12] OKADA K, OKA S, TOHGE K, ONO K, YONENOBU K, HOSOYA T. Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum. Clinicopathologic study and surgical treatment[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991, 16: 280-287.
- [13] CHEAH K S, LAU E T, AU P K, TAM P P. Expression of the mouse alpha 1 (II) collagen gene is not restricted to cartilage during development[J]. *Development*, 1991, 111: 945-953.
- [14] CARREIRA A C, ALVES G G, ZAMBUZZI W F, SOGAYAR M C, GRANJEIRO J M. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 561: 64-73.
- [15] ONG K L, VILLARRAGA M L, LAU E, CARREON L Y, KURTZ S M, GLASSMAN S D. Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35: 1794-1800.
- [16] CAHILL K S, CHI J H, DAY A, CLAUS E B. Prevalence, complications, and hospital charges associated with use of bone-morphogenetic proteins in spinal fusion procedures[J]. *JAMA*, 2009, 302: 58-66.
- [17] TEN DIJKE P, KORCHYNSKYI O, VALDIMARSDOTTIR G, GOUMANS M J. Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 211: 105-113.
- [18] LEE K S, KIM H J, LI Q L, CHI X Z, UETA C, KOMORI T, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 8783-8792.
- [19] GHOSH-CHOUDHURY N, HARRIS M A, FENG J Q, MUNDY G R, HARRIS S E. Expression of the *BMP 2* gene during bone cell differentiation[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1994, 4: 345-355.
- [20] 张浩, 刘洋. 脊柱韧带骨化性疾病发病机制的研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25: 553-557.
- [21] 王哲, 王金平, 张俊华, 李靖, 吕荣. 骨形成蛋白在黄韧带骨化中的表达定位[J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23: 341-343.
- [22] HAYASHI K, ISHIDOU Y, YONEMORI K, NAGAMINE T, ORIGUCHI N, MAEDA S, et al. Expression and localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum[J]. *Bone*, 1997, 21: 23-30.
- [23] QU X, CHEN Z, FAN D, XIANG S, SUN C, ZENG Y, et al. Two novel BMP-2 variants identified in patients with thoracic ossification of the ligamentum flavum[J]. *Eur J Hum Genet*, 2017, 25: 565-571.
- [24] NING S, CHEN Z, FAN D, SUN C, ZHANG C, ZENG Y, et al. Genetic differences in osteogenic differentiation potency in the thoracic ossification of the ligamentum flavum under cyclic mechanical stress[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39: 135-143.
- [25] KAWAGUCHI Y, YASUDA T, SEKI S, NAKANO M, KANAMORI M, SUMI S, et al. Variables affecting postsurgical prognosis of thoracic myelopathy caused by

- ossification of the ligamentum flavum[J]. *Spine J*, 2013, 13: 1095-1107.
- [26] TSUKAMOTO N, MAEDA T, MIURA H, JINGUSHI S, HOSOKAWA A, HARIMAYA K, et al. Repetitive tensile stress to rat caudal vertebrae inducing cartilage formation in the spinal ligaments: a possible role of mechanical stress in the development of ossification of the spinal ligaments[J]. *J Neurosurg Spine*, 2006, 5: 234-242.
- [27] HOSHI K, AMIZUKA N, SAKOU T, KUROKAWA T, OZAWA H. Fibroblasts of spinal ligaments pathologically differentiate into chondrocytes induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2: morphological examinations for ossification of spinal ligaments[J]. *Bone*, 1997, 21: 155-162.
- [28] UCHIDA K, YAYAMA T, CAI H X, NAKAJIMA H, SUGITA D, GUERRERO A R, et al. Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13: R144.
- [29] XUE T, MAO Z, LIN L, HOU Y, WEI X, FU X, et al. Non-virus-mediated transfer of siRNAs against Runx2 and Smad4 inhibit heterotopic ossification in rats[J]. *Gene Ther*, 2010, 17: 370-379.
- [30] LIU Y, ZHAO Y, CHEN Y, SHI G, YUAN W. RUNX2 polymorphisms associated with OPLL and OLF in the Han population[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2010, 468: 3333-3341.
- [31] FRISCH J, REY-RICO A, VENKATESAN J K, SCHMITT G, MADRY H, CUCCHIARINI M. rAAV-mediated overexpression of sox9, TGF- β and IGF- I in minipig bone marrow aspirates to enhance the chondrogenic processes for cartilage repair[J]. *Gene Ther*, 2016, 23: 247-255.
- [32] 董兴成,贾连顺,陈雄生. 脊柱黄韧带骨化的发病机制及研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20: 4970-4978.
- [33] 侯晓飞,陈仲强. 胸椎黄韧带骨化的病理学及发病机制研究进展[J]. *中国微创外科杂志*, 2014: 945-947.
- [34] HUR J W, BAE T, YE S, KIM J H, LEE S, KIM K, et al. Myofibroblast in the ligamentum flavum hypertrophic activity[J]. *Eur Spine J*, 2017, 26: 2021-2030.
- [35] YAYAMA T, UCHIDA K, KOBAYASHI S, KOKUBO Y, SATO R, NAKAJIMA H, et al. Thoracic ossification of the human ligamentum flavum: histopathological and immunohistochemical findings around the ossified lesion[J]. *J Neurosurg Spine*, 2007, 7: 184-193.
- [36] ARYAL R, CHEN X P, FANG C, HU Y C. Bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in bone tissue regeneration: new insight and perspectives[J]. *Orthop Surg*, 2014, 6: 171-178.

[本文编辑] 尹 茶

